



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

Plataforma general para construcción, caracterización y prueba de biosensores y sensores químicos.

Tesis que presenta

M.C. Rocío Berenice Domínguez Cruz

para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

en la Especialidad de

Ingeniería Eléctrica

Director de la Tesis: Dr. Roberto Muñoz Guerrero

México, D.F.

Noviembre 2014

Agradecimientos

A Dios, que hizo posible todo.

Quisiera expresar mi cariño y agradecimiento a mis padres, Luz Llanura Cruz Quino y Julián Domínguez Ramón por enseñarme el valor del trabajo, por cuidarme, educarme y animarme todo el tiempo a culminar mis metas. A mis hermanas, Julisa Llanura Domínguez Cruz e Ingrid Esmeralda Domínguez Cruz por ser parte de mi vida y acompañarme y apoyarme siempre sin importar el tiempo o la distancia.

A mi novio José Abraham Téllez Morales por estar conmigo en los momentos buenos, malos y peores y por haber compartido tantas cosas de la vida conmigo a lo largo de estos años.

A mi asesor, Dr. Roberto Muñoz Guerrero. Por su paciencia conmigo y por la calidad humana que siempre mostró dentro y fuera del laboratorio.

A los miembros del jurado Dr. Arturo Vera Hernández, Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado, Dr. Gustavo Adolfo Alonso Silverio y Dr. Jean Louis MARTY por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento al personal del CINVESTAV por todas las facilidades que me brindaron durante mi estancia. A la M.C. Herlinda Araiza Lizarde por el compañerismo, la ayuda y todas las facilidades prestadas durante mi estancia en el laboratorio 11. A Anabel Díaz Mena por el invaluable apoyo administrativo que me brindó al

inicio de mis estudios de doctorado. A la Sra. María Teresa García Camacho por todo el apoyo en las tareas de laboratorio a lo largo de mis estudios.

A los compañeros del laboratorio por la sana convivencia que se generó durante estos años. A mi compañera de cubículo Diana Bueno, por toda su ayuda y la increíble paciencia que mostró al compartir su espacio con alguien tan desordenada como yo.

Un agradecimiento especial a Liz González y Óscar García, por las experiencias inolvidables que compartimos durante el tiempo que vivimos juntos.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados por permitirme formar parte de tan noble institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca gracias a la cual pude cursar mis estudios de doctorado.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema.....	4
1.2 Objetivos.....	6
1.2.1 Objetivo General	6
1.3 Estructura de la tesis	7
2. Antecedentes	9
2.1 Sensores químicos.....	11
2.1.1 Voltamperometría y quimiosensores voltamperométricos	15
2.1.2 Biosensores	19
2.1.2.1 Biosensores enzimáticos	19
2.1.2.2 Inmunosensores	21
2.1.3 Lenguas Electrónicas (Arreglos de sensores)	23
2.2 Métodos de análisis	25
2.2.1 Análisis exploratorio.....	28
2.2.1.1 Análisis de Componentes Principales (PCA).....	28
2.2.1.2 Análisis de Factores Paralelos (PARAFAC).....	29
2.2.2.1 Redes Neuronales Artificiales (ANN).....	31
2.3 Métodos de automatización.....	33
2.3.1 Análisis por inyección de flujo (FIA).....	34
2.3.2 Análisis por inyección secuencial (SIA)	36
2.4 Estado del arte	38
3. Desarrollo experimental.....	42
3.1 Solución propuesta	43
3.2 Determinación de pesticidas organofosforados con biosensores enzimáticos.....	45

3.2.2 Desarrollo.....	46
3.2.2.1 Fabricación del biosensor	46
3.2.2.2 Desarrollo del sistema de flujo utilizando biosensores como método de detección.	49
3.2.2.3 Optimización de los parámetros del sistema de flujo para mediciones en línea	55
3.2.2.4 Mediciones en línea de pesticidas organofosforados en muestras sintéticas y muestras reales.....	59
3.3 Determinación de ácido okadaico empleando inmunosensores.....	60
3.3.1 Desarrollo.....	62
3.3.1.1 Inmunoensayo para la detección de ácido okadaico	62
3.3.1.2 Desarrollo del sistema de flujo utilizando inmunosensores como método de detección.	64
3.3.1.3 Optimización del protocolo de flujo.....	66
3.3.1.4 Mediciones en línea de ácido okadaico.....	67
3.4. Análisis de muestras de café utilizando lenguas electrónicas voltamperométricas.....	67
3.4.1 Desarrollo.....	69
3.4.1.1 Fabricación de sensores.....	69
3.4.1.2 Selección de muestras.	72
3.4.1.3 Preparación de las muestras.....	73
3.4.1.4 Mediciones voltamperométricas.	73
3.5. Análisis de muestras de cerveza.....	74
3.5.1. Desarrollo.....	76
3.5.1.1 Selección y preparación de muestras	76
3.5.1.2 Mediciones amperométricas	77
4. Resultados.....	78
4.1 Detección en línea de pesticidas organofosforados con biosensores enzimáticos.....	78
4.2 Detección en línea de ácido okadaico en muestras de moluscos	87
4.3 Análisis de muestras de café empleando lenguas electrónicas voltamperométricas.....	91
4.3.1 Análisis exploratorio.....	91
4.3.2 Clasificación basada en el método de cultivo	95
4.3.2.1 Clasificación utilizando LDA	96
4.3.2.2 Clasificación utilizando SVM	97
4.3.3 Clasificación de acuerdo al origen geográfico.....	101
4.4 Análisis de muestras de cerveza empleando lenguas electrónicas voltamperométricas.....	105
4.4.1 Análisis de muestras de cerveza diluidas	105

4.4.2 Análisis de muestras de cerveza concentradas.....	109
5. Conclusiones y Perspectivas	113
5.1 Desarrollo de sistemas basados en biosensores.	113
5.2 Desarrollo de sistemas basados en lenguas electrónicas.....	115
5.3 Trabajo a futuro	117
5.4 Productos obtenidos del desarrollo de esta tesis	117
Bibliografía.....	121
Artículos desarrollados como resultado de este trabajo	127

Resumen

En el presente trabajo se desarrolla una nueva propuesta de instrumentación y procesamiento de señales aplicadas al monitoreo de muestras reales utilizando biosensores y lenguas electrónicas. Para lo anterior, se implementó una nueva configuración basada en un sistema de flujo que permitió automatizar la detección en línea de analitos. Asimismo, se aplicaron nuevas técnicas de procesamiento que permitieron relacionar las señales provenientes de los sensores químicos con características específicas de las muestras.

Por un lado, la instrumentación desarrollada fue aplicada a la cuantificación del pesticida organofosforado Clorosifirifos-oxón (CPO) y la biotoxina ácido okadaico (AO) utilizando biosensores. Además de la automatización, en ambos casos se obtuvieron límites de detección de 0.1µg/L para CPO y 0.19 µg/Kg para el AO, los cuales se encuentran en concordancia con los límites de detección aceptados por la regulación europea. Por otro lado, las lenguas electrónicas fueron aplicadas como herramienta de clasificación para muestras de café y cerveza de diferentes regiones del país. El empleo de métodos de aprendizaje supervisado, permitió descifrar eficientemente la información del arreglo de sensores y establecer características distintivas que permitieron discriminar muestras de café de acuerdo a su denominación de origen y al tipo de cultivo utilizada; mientras que las cervezas fueron clasificadas de acuerdo al estilo de fabricación.

Los resultados obtenidos demuestran la eficacia del sistema desarrollado y ponen de relevancia el potencial de los sistemas dedicados basados en biosensores y lenguas electrónicas para el análisis y monitoreo de muestras reales.

Abstract

In the current work, a new proposal for instrumentation and signal processing applied to the monitoring of real samples using biosensors and electronic tongues is presented. Thus, a new flow based system configuration was developed for the on line monitoring of target analytes. In addition, supervised learning algorithms were applied to relate sensor's signals with specific features of real samples.

By one hand, the developed flow system was applied to the detection of organophosphate pesticide Chlorophyrifos oxon (CPO) and to the detection of biotoxin okadaic acid (OA). Besides the autonomous operation, both applications achieved limits of detection (LOD) in good accordance to international regulations. For CPO LOD was 0.1 μ g/L and for OA LOD was 0.19 μ g/Kg. By the other hand, electronic tongues were applied as classification tools for food samples namely coffee and beer. By applying supervised learning algorithms, the chemical information provided by the sensor array was decoded and applied to the discrimination between coffee samples from a given geographical region (designation of origin) and samples cultivated under specific conditions (i.e. yield of crops and organic procedure). For beer samples classification was according with manufacturing process.

The results achieved suggest the potential application of developed system for dedicated on line monitoring based on biosensors and electronic tongues for the assessment of real samples.

Capítulo I

Introducción

1. Introducción

El sensado como método de obtención de información es una función inherente a la actividad humana. Los sentidos biológicos fueron los primeros métodos de adquisición de la información, por lo que sus funciones han sido estudiadas e imitadas por nuevos desarrollos tecnológicos con el fin de crear mecanismos de monitoreo autónomos. Entre las funciones que cuentan con mayor grado de desarrollo tecnológico se encuentran aquellas que registran cambios en los fenómenos físicos como la luz (visión), ondas de sonido (audición) y variaciones de presión y temperatura (tacto). En lo que respecta al olfato y al gusto, se sabe que los estímulos asociados al sabor o al olor están constituidos por múltiples sustancias químicas que al ser evaluadas activan paralelamente miles de receptores que interactúan de forma compleja para emitir una respuesta[1]. Esta particularidad, ha ocasionado que el desarrollo de plataformas de sensado químico sea más lento en comparación a los sistemas de monitoreo para datos físicos.

Aún así, existen diferentes sectores que requieren del análisis y monitoreo confiable sobre diversas variables de interés de origen químico y biológico. Algunos ejemplos son el gran número de pruebas clínicas que se llevan a cabo diariamente en el sector salud, el monitoreo con fines de calidad y control realizado en las industrias alimenticia y farmacéutica, así como la creciente necesidad de monitoreo en el sector ambiental[2, 3]. Para cumplir la demanda de estos y otros sectores, existen desde hace tiempo una gran variedad de métodos instrumentales que han sido utilizados para obtener información de muestras de gran complejidad. Entre los

métodos instrumentales más comunes podemos mencionar la cromatografía líquida y de gases, la espectrofotometría y la espectrometría de masas[4]. Generalmente el análisis instrumental no se enfoca en la composición total de la muestra, sino en la detección de un componente específico o analito. Para determinar la presencia del analito, es necesario descartar componentes de la muestra que no representan un interés para el análisis o que por su naturaleza puedan tener un efecto nocivo sobre el desempeño analítico de los métodos instrumentales. Estas especies, conocidas como interferentes, se eliminan a través de diferentes procesos de extracción o pretratamiento de la muestra. A pesar de los pasos involucrados en su utilización, los métodos instrumentales garantizan la detección confiable de un analito particular con alta sensibilidad y selectividad. Por ello, a pesar de representar un alto costo y un tiempo de análisis elevado, su confiabilidad ha hecho de estas herramientas los métodos analíticos establecidos en la industria y muchos laboratorios científicos.

Paralelamente a los métodos instrumentales, se ha buscado el desarrollo de métodos auxiliares que faciliten el monitoreo de variables de interés y el análisis de muestras complejas de forma simplificada, sin recurrir a la infraestructura de un laboratorio especializado. Para la operación de estos métodos auxiliares, generalmente se utilizan herramientas conocidas como sensores químicos que funcionan bajo los principios de interacción y afinidad molecular. A grandes rasgos, un sensor químico es un elemento capaz de reconocer selectivamente un analito por medio de un receptor sintético. Este reconocimiento selectivo brinda una señal que, idealmente, es directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. Por lo anterior, en condiciones óptimas un sensor químico puede brindar información continua sobre el analito sin la necesidad de una fase de pretratamiento para operar [5].

Para transformar la señal generada durante la interacción del receptor y el analito en una señal eléctrica, el receptor generalmente está unido a un transductor. El uso de transductores permite el almacenamiento de la información contenida en la muestra, además es posible miniaturizarlos para obtener sensores químicos de menores dimensiones, fácil uso, de rápida respuesta, costos menores y adecuados para incorporarse a sistemas de monitoreo *in situ* [6].

A pesar de las ventajas ofrecidas por los sensores químicos, se sabe que cuando existe una fuerte presencia de interferentes en la muestra analizar su respuesta y su desempeño se ven disminuidos[6]. Esta falta de selectividad en la práctica, afecta el número de aplicaciones analíticas y de monitoreo en las cuáles pueden ser empleados y los limita a aplicaciones controladas de laboratorio.

Aunque diferentes grupos de investigación se han enfocado en dotar de mayor selectividad a los receptores sintéticos utilizados en la fabricación de sensores químicos, existen otras aproximaciones para ser utilizadas como herramientas auxiliares de monitoreo. En este sentido, se pueden mencionar dos vertientes que abordan esta problemática con diferentes enfoques. El primero de ellos consiste en utilizar un dispositivo biomimético conocido como lengua electrónica (LE). Las LEs incorporan una matriz de sensores químicos de selectividad pobre y cruzada (*cross-selectivity*) que al interactuar en conjunto crean el equivalente a una “huella dactilar química” que caracteriza a las muestras involucradas en el análisis[7]. Para descifrar la información proveniente del arreglo de sensores, se utilizan métodos de procesamiento que permiten obtener modelos analíticos de calibración que relacionan el conjunto de señales provenientes del arreglo con características específicas de las muestras analizadas o bien con la concentración de algún analito modelo que se encuentre presente en la muestra.

El segundo enfoque de sensado químico, consiste en utilizar materiales biológicos como receptores para obtener dispositivos con alta selectividad llamados biosensores. En realidad los biosensores son un tipo especial de sensor químico, pero para establecer una diferencia entre el tipo de receptor utilizado se suele llamar quimiosensores a los sensores químicos fabricados con receptores sintéticos[8]. Para modelar la respuesta del biosensor a la concentración del analito objetivo, se suele asumir que debido a la alta selectividad biológica del receptor existirá un rango de trabajo específico con comportamiento lineal. Sin embargo, al igual que en los quimiosensores, no es posible asegurar que las interacciones entre el biosensor y el analito obedezcan una relación lineal en todos los casos. Tampoco es posible afirmar que las especies interferentes tengan un efecto nulo sobre el desempeño del biosensor. Debido a esto, es posible encontrar algunos trabajos que proponen el uso de herramientas de

procesamiento avanzado y arreglos de biosensores con diferentes elementos biológicos para lograr atacar problemas relacionados con muestras de mayor complejidad o para modelar las relaciones no lineales entre la respuesta del biosensor y el analito objetivo[9, 10].

Tanto los arreglos de sensores químicos o LEs como los biosensores representan herramientas prometedoras en el campo del sensado químico. Para resaltar su capacidad analítica, resulta importante la inclusión de métodos de procesamiento que permitan descifrar las interacciones que existen entre los sensores y los analitos presentes en la muestras. Aunado a esto, para ser considerados como alternativas de monitoreo aplicables a situaciones reales es necesario contar con instrumentación novedosa, que facilite la detección en línea y proporcionen cierto grado de automatización de las tareas analíticas.

1.1 Planteamiento del problema.

Debido a la gran cantidad de información que los instrumentos modernos de laboratorio son capaces de generar y almacenar, una alternativa que se ha venido utilizando en el análisis instrumental son los beneficios de la extracción de información proveniente de los datos generados durante los procedimientos experimentales. El conjunto de métodos aplicados, conocidos como quimiométricos, tiene generalmente como objetivo obtener modelos de calibración más robustos ante especies interferentes y con un desempeño analítico superior.

A diferencia del análisis instrumental, el campo de los sensores químicos se encuentra en consolidación y tiene aún grandes desafíos por cubrir en cuanto al desarrollo de nuevos elementos sensitivos, al procesamiento de la información que brindan y a la instrumentación necesaria para integrar la detección en un proceso de monitoreo continuo. Por tanto, en contraste con otras técnicas de medición, el tratamiento de las señales provenientes de los sensores químicos y el desarrollo tecnológico de nuevas configuraciones que permitan la integración del análisis en línea permanecen aún como campos abiertos de estudio.

Debido a la selectividad del material biológico, las señales provenientes de los biosensores son generalmente simplificadas en características puntuales como la corriente máxima registrada, el potencial máximo alcanzado o el área total bajo la curva de respuesta para crear

los modelos de calibración del analito[11, 12]. Además de la simplificación de las señales, en el modelo se suele asumir un comportamiento lineal que no siempre corresponde a las características mostradas por el biosensor. La dependencia de una relación lineal y la incorporación sólo de características puntuales en el modelado de la señal limitan en muchos casos el rango del trabajo del biosensor, estableciendo límites de detección elevados, derivas y limitando su aplicación en sistemas de monitoreo dedicados.

En el caso de las LEs, la inclusión de más de un elemento sensitivo involucra de manera inherente el uso de métodos de procesamiento más robustos para la obtención de los modelos de clasificación o cuantificación de muestras. Prueba de ellos son los reportes en la literatura empleando diferentes métodos quimiométricos durante el preprocesamiento de las señales y la fase de construcción de modelos de calibración[13]. Sin embargo, pocos modelos hacen uso de toda la información proporcionada por el arreglo de quimiosensores y en muchos casos se utilizan también características puntuales obtenidas a partir de cada sensor más que el conjunto de señales en su totalidad, lo que deja fuera del procesamiento interacciones importantes entre el arreglo de sensores que podrían brindar información importante sobre la naturaleza de la muestra[14].

Por otro lado, a pesar de que en las últimas décadas se han propuesto nuevos materiales sintéticos y biológicos para la detección, poco se ha hecho para desarrollar tecnología que permita integrar estos dispositivos en sistemas de dedicados de monitoreo que proporcionen información continua acerca de analitos de interés. Por tanto y como una alternativa a la complejidad de los métodos instrumentales actuales, este trabajo tiene como fin presentar estrategias de procesamiento quimiométrico y nuevas configuraciones de instrumentación en flujo enfocadas al desarrollo de sistemas en línea para el análisis de muestras complejas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo es establecer las bases para el desarrollo de sistemas integrales de monitoreo capaces de funcionar como alternativa a las técnicas instrumentales actuales. Para su funcionamiento se propone utilizar herramientas de sensado químico como los biosensores y las LEs e integrarlos como detectores, por medio de la aplicación de nuevas técnicas de procesamiento y del desarrollo nuevas configuraciones en flujo que permitan la integración del proceso analítico. Para probar la eficacia de este nuevo enfoque de monitoreo, se selección de muestras reales tomadas como modelo provenientes de los campos ambiental y alimenticio.

1.2.2 Objetivos Específicos

Además del objetivo general descrito anteriormente se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Fabricación de biosensores electroquímicos basados en enzimas y anticuerpos para el análisis cuantitativo de muestras alimenticias y ambientales.
- Construcción de una LE basada en una matriz de quimiosensores amperométricos para el análisis cualitativo de muestras alimenticias.
- Diseño y construcción de un sistema de automatizado basado en las técnicas de análisis por inyección de flujo (FIA) e inyección secuencial (SIA) que permita realizar las tareas concernientes al manejo de las muestra líquidas de forma autónoma.
- En el caso de los biosensores, por su aplicación cuantitativa, su caracterización se llevara a cabo de manera manual y automática con el fin de evaluar los beneficios que conlleva la automatización del procedimiento analítico.

- Aplicación de métodos multivía para el estudio de la matriz de quimiosensores amperométricos, así como métodos de aprendizaje supervisado para el análisis cualitativo de muestras.
- Aplicación de métodos multivariable para la cuantificación de analitos utilizando biosensores y su comparación con los métodos lineales establecidos como referencia.
- Finalmente, debido a que la miniaturización es una fuerte tendencia dentro del monitoreo, se evaluarán las diferentes técnicas para la compactación del sistema de flujo construido.

1.3 Estructura de la tesis

El presente documento se encuentra dividido en cinco capítulos y dos apéndices. En este primer capítulo se describe de manera general la problemática abordada, así como los objetivos perseguidos con la realización de este trabajo.

En el segundo capítulo se abordan los conceptos fundamentales acerca de cada uno de los elementos utilizados para la realización de la tesis. Se presentan los principios de operación de quimiosensores, biosensores electroquímicos y LEs, los fundamentos de las técnicas de automatización utilizadas y una revisión de los métodos de procesamiento empleados a lo largo de este trabajo. Al final del capítulo se presenta el estado del arte en el campo de sistemas dedicados de monitoreo empleando quimiosensores y biosensores junto con métodos de procesamiento avanzado.

El tercer capítulo presenta la metodología que se llevó a cabo para el desarrollo experimental de este trabajo, incluyendo la fabricación de sensores, el diseño y construcción del sistema automatizado, así como el procedimiento experimental para la obtención de las señales a modelar. En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos al analizar las muestras

seleccionadas con las herramientas de procesamiento propuestas y el sistema de flujo desarrollado.

En el quinto y último capítulo se presenta una discusión de los resultados obtenidos a la luz de los objetivos planteados en este primer capítulo; así mismo, se exponen los potenciales trabajos a futuro derivados de esta tesis.

Finalmente, se anexan los productos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis en revistas internacionales de prestigio.

Capítulo II

Antecedentes

2. Antecedentes

El interés por obtener información química relevante sobre la presencia de un analito o analitos en un conjunto de muestras puede presentarse en diferentes situaciones. Sectores como el alimenticio, farmacológico y ambiental hacen uso de esta información para evaluar la calidad de sus productos o para monitorear el riesgo potencial de algún contaminante dentro de sus procesos[2, 3]. Generalmente, cuando se desea extraer información de naturaleza química se recurre al análisis por medio de métodos instrumentales tradicionales. Aunque existe una gran variedad de estos métodos, el procedimiento para la extracción de información puede ser resumido en los pasos mostrados en la figura 2.1.

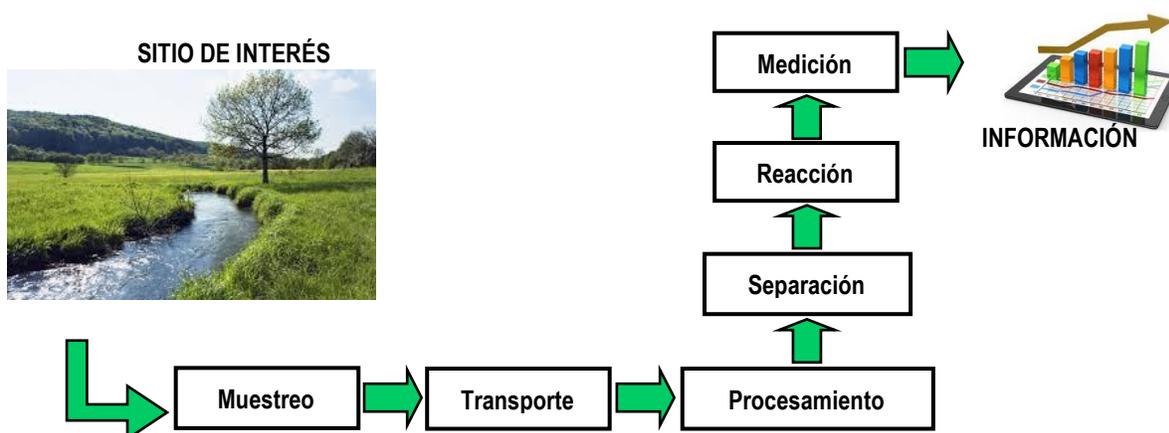


Figura 2.1. Procedimiento para la obtención de información analítica con métodos instrumentales tradicionales.

De acuerdo a la figura 2.1, la primera parte del proceso analítico es la recolección de muestras provenientes de un sitio específico que presenta un interés particular para ser analizado. Ya sea que el sitio de interés se trate, por ejemplo, de un río, una planta de producción o un hospital, el siguiente paso consiste en el traslado de las muestras recolectadas hacia un laboratorio que cuente con la infraestructura necesaria para el procesamiento de las mismas. El procesamiento conlleva etapas que preparan a la muestra para ser medida; esto puede incluir procesos de filtrado y reacción, que ayuden a eliminar componentes indeseados que actúen como interferentes al momento de la medición. Una vez procesada, la muestra puede analizarse con alguno de los métodos instrumentales tradicionales para establecer la presencia del algún analito o analitos en particular [4].

La ventaja de los métodos instrumentales recae en sus bajos límites de detección, la robustez, la sensibilidad, la selectividad que presentan, además de la posibilidad de realizar múltiples determinaciones sobre una misma muestra. Sus resultados son altamente confiables y por lo general son utilizados como referencia en los ámbitos científico e industrial. Sin embargo, existen situaciones en las que es deseable contar con métodos rápidos de análisis que permitan el monitoreo de variables químicas sin la rigurosidad del esquema planteado en la figura 2.1. Lo anterior motivó la investigación y desarrollo de métodos auxiliares pensados para proporcionar un análisis simplificado de variables químicas con tiempos de respuesta cortos, bajo costo de implementación y con la posibilidad de realizar mediciones *in situ* [15].

Dos de los dispositivos que se desarrollaron en base a estas necesidades fueron los biosensores y los arreglos de quimiosensores o lenguas electrónicas (LEs). Estos sistemas de medición auxiliares brindan la posibilidad de simplificar el método analítico propuesto en la figura 2.1 al hacer uso de las reacciones selectivas entre un analito de interés y un receptor específico seleccionado para dicho analito[6]. En muchas ocasiones esto conlleva un procesamiento simplificado o nulo de las muestras para proceder directamente a la etapa de medición. Para calibrar la respuesta de estos dispositivos, se utilizan un conjunto de soluciones patrón con diferentes concentraciones del analito modelo y se registran los valores que entregados ante cada solución. Estos valores son utilizados para construir modelos, generalmente lineales, que permitan cuantificar la presencia del analito en muestras desconocidas. Sin embargo, en

presencia de muestras de mayor complejidad este procedimiento de calibración resulta ser poco efectivo[16].

Este trabajo tiene como tema la integración de biosensores y LEs en sistemas de monitoreo en línea que puedan ser utilizados como auxiliares en el análisis cualitativo y cuantitativo de muestras reales. Para lograr la incorporación de los biosensores y LEs como detectores finales, se requiere la creación de modelos robustos que describan características importantes de cada muestra y establezcan con certeza la presencia de un analito aún en presencia de interferentes. Para lo anterior, se pretende utilizar la información proveniente de las señales generadas en biosensores y LE junto con métodos de procesamiento multivía, multivariable y de aprendizaje supervisado. Aunado al modelado, como parte de la integración se propone la automatización de las diferentes partes de la metodología experimental utilización de técnicas de inyección de flujo.

Por lo anterior, el trabajo desarrollado en esta tesis gira en torno a tres puntos principales. El primero abarca los sensores electroquímicos, que se encargan de brindar información de entrada acerca de las muestras analizadas. El segundo punto se centra en el procesamiento de las señales provenientes de los biosensores o de las LEs para establecer modelos de calibración que relacionen dicha señal con la presencia de un analito específico o con características particulares de las muestras. El tercer punto abarca los métodos de flujo, con los cuáles se lleva a cabo la automatización del proceso de medición. Siguiendo este orden, en este capítulo se presentan a continuación los fundamentos de operación de quimiosensores, biosensores y LE. En el segundo apartado se revisan los métodos de procesamiento multivariable, multivía y de aprendizaje supervisado utilizados en este trabajo para el modelado de las señales electroquímicas. Finalmente se presentan los fundamentos de las diferentes técnicas de flujo utilizadas para la automatización del procedimiento analítico.

2.1 Sensores químicos

De acuerdo con la IUPAC, un sensor químico es un dispositivo que transforma la información química presente en una muestra en una señal con utilidad analítica[5]. El bloque de entrada

del sensor, conocido como receptor, funciona como una capa de reconocimiento selectiva que al detectar la presencia de un analito (información química) genera una señal química. A continuación, un segundo bloque conocido como transductor transforma la señal química en una señal eléctrica que puede ser registrada y almacenada. Con la señal entregada por el sensor es posible establecer una relación que brinde información acerca de la concentración de una especie de interés presente en la muestra. La figura 2.2 muestra un diagrama a bloques de los elementos que se integran en el diseño de un sensor químico, así como su interacción con la muestra

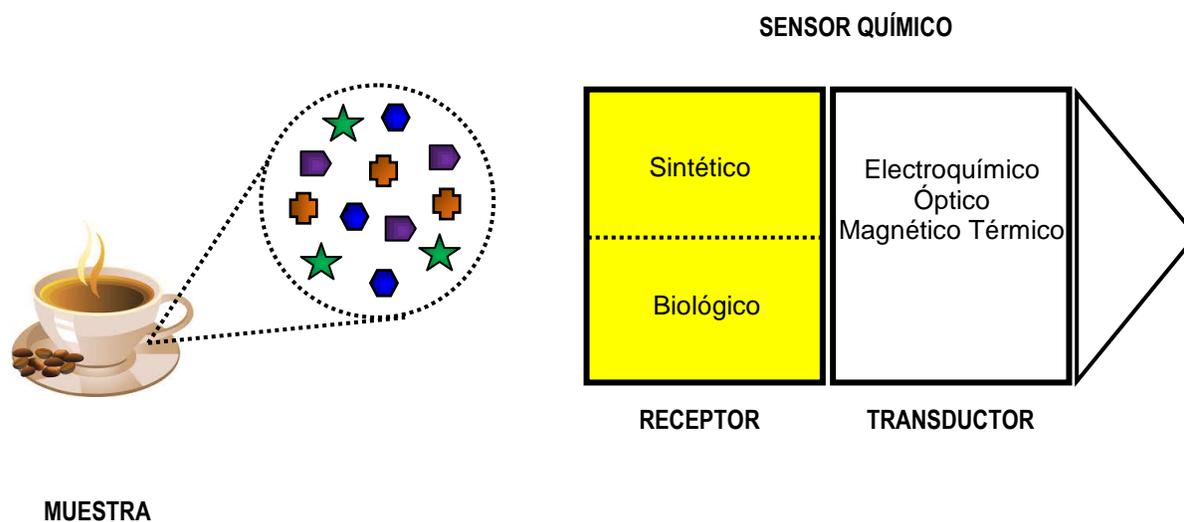


Figura 2.2. Diagrama básico de un sensor químico

Por convención, cuando el receptor es de origen sintético el dispositivo resultante se llama quimiosensor y cuando el receptor es de origen biológico se llama biosensor[17]. Para generar la señal química, el receptor puede actuar bajo principios físicos (como el cambio en la temperatura o la conductividad), puede originar una reacción química con la participación del analito (como una reacción redox en un electrodo metálico) o puede obedecer a un principio bioquímico (como la acción catalítica de una enzima). Además del receptor, los sensores químicos también suelen clasificarse por el transductor utilizado. Aunque los transductores electroquímicos y ópticos son los más reportados en la literatura, existen transductores de otro tipo como los piezoeléctricos, másicos y magnéticos. Sin embargo, en este trabajo solo se utilizaron transductores electroquímicos por lo que en el resto de las secciones se hace

referencia únicamente a este tipo de elementos. Los transductores electroquímicos son aquellos que transforman la interacción que se da entre el receptor y el analito en una medida eléctrica (corriente o voltaje) [17]. Con este tipo de transductores, la interacción del analito con el receptor puede darse en condiciones de corriente nula (potenciometría) o ser el resultado de un estímulo eléctrico aplicado a la muestra (voltamperometría)[4].

Una vez construido el sensor, es necesario evaluar su respuesta ante cambios en la concentración del analito para el que fue diseñado. Para ello, se utilizan un conjunto de muestras llamadas patrones con concentraciones conocidas del analito y se registra la respuesta del sensor ante cada concentración. Además de las concentraciones de analito se suelen añadir concentraciones conocidas de otras especies que funcionen como interferentes para evaluar su efecto en el desempeño del sensor [18]. Al graficar los resultados, generalmente se obtienen las tres zonas de operación mostradas en la figura 2.3.

En la zona 1 existe una alta concentración tanto del analito de interés como de una especie que actúa como interferente, lo que impide que el sensor presente una respuesta selectiva y exhiba únicamente un estado de saturación. En la zona 2, el sensor presenta una respuesta lineal cuantitativa ante incrementos del analito principal. Esta región, conocida como rango dinámico, es generalmente considerada la zona útil de trabajo de sensor y de preferencia debe extenderse varias décadas de respuesta. En la figura 2.3 se puede apreciar que ante una mayor concentración de interferentes el rango dinámico del sensor tiende a disminuir, e incluso, este intervalo puede llegar a ser nulo si la concentración de interferentes equipara o es muy superior a la del analito principal. Finalmente, la zona 3 muestra como la respuesta del sensor se nulifica antes concentraciones sumamente bajas del analito principal.

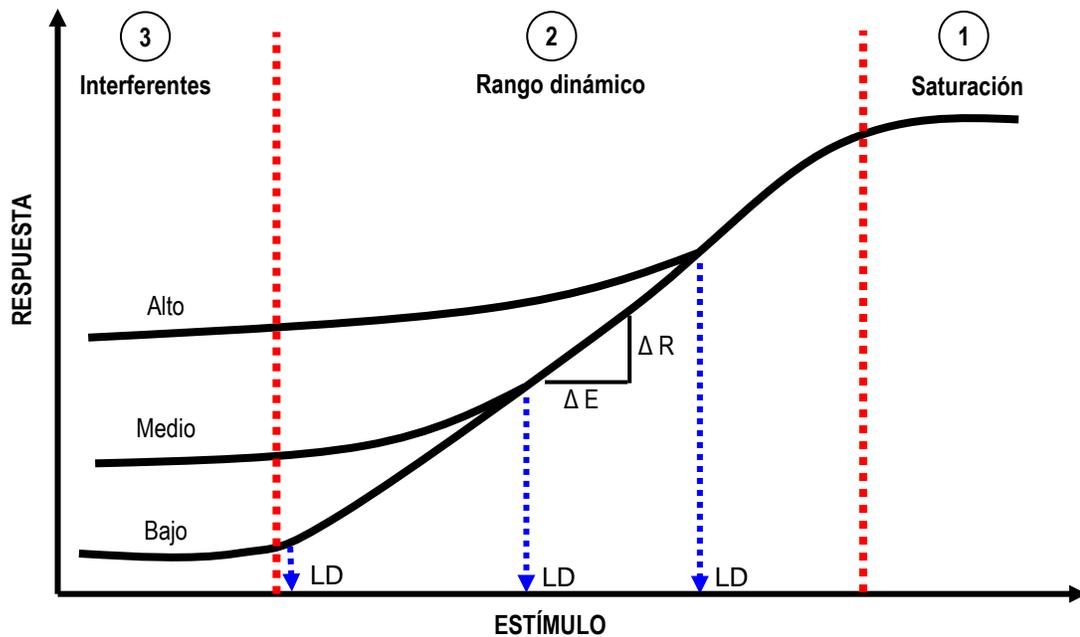


Figura 2.3. Curva de respuesta de un sensor químico

Utilizando la curva de calibración de la figura 2.3 es posible obtener algunas de las características que permiten medir el desempeño de un sensor; a continuación se enlistan algunos de los parámetros más importantes considerados al momento de reportar la caracterización de un sensor químico.

- **Sensibilidad:** el cambio en la señal medida por unidad de concentración ($\Delta R / \Delta E$). En la figura 2.3 puede verse que la sensibilidad corresponde al valor de la pendiente del rango dinámico.
- **Límite de detección:** el valor de concentración más bajo que puede ser detectado por el sensor bajo condiciones definidas. Las flechas de la figura 2.3 muestran como el límite de detección cambia de acuerdo a la concentración de interferentes
- **Rango dinámico:** es el rango de concentraciones comprendidas entre el límite de detección y el límite superior de saturación del sensor. Como se muestra en la figura 2.3, su extensión se ve afectada por la presencia de interferentes en la muestra.

- **Selectividad:** una expresión de la respuesta específica del sensor a un grupo determinado de analitos o a un analito específico.
- **Linealidad:** la desviación relativa del rango dinámico con respecto a la línea recta ideal.
- **Resolución:** la mínima diferencia de concentración que el sensor es capaz de detectar cuando ésta varía dinámicamente.
- **Tiempo de respuesta:** el tiempo que toma al sensor detectar un cambio de valor en la concentración partiendo desde un estado basal (concentración cero).
- **Estabilidad:** período de tiempo durante el cual el sensor mantiene su desempeño sin cambios significativos.

Otras características como ciclo de vida, relación señal a ruido, estabilidad operacional y porcentaje de recuperación son utilizadas a lo largo de este trabajo. Aunque no se definen en este texto, se agregan las referencias adecuadas para su utilización[6, 17, 19].

2.1.1 Voltamperometría y quimiosensores voltamperométricos

La voltamperometría engloba un conjunto de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito de interés puede obtenerse al medir la intensidad de corriente generada en función de un potencial aplicado a una celda electroquímica, tal como se muestra en la configuración de la figura 2.4 [18, 20]. El potencial aplicado funciona como una señal de excitación que favorece la polarización de un electrodo, que se conoce como electrodo indicador o de trabajo.

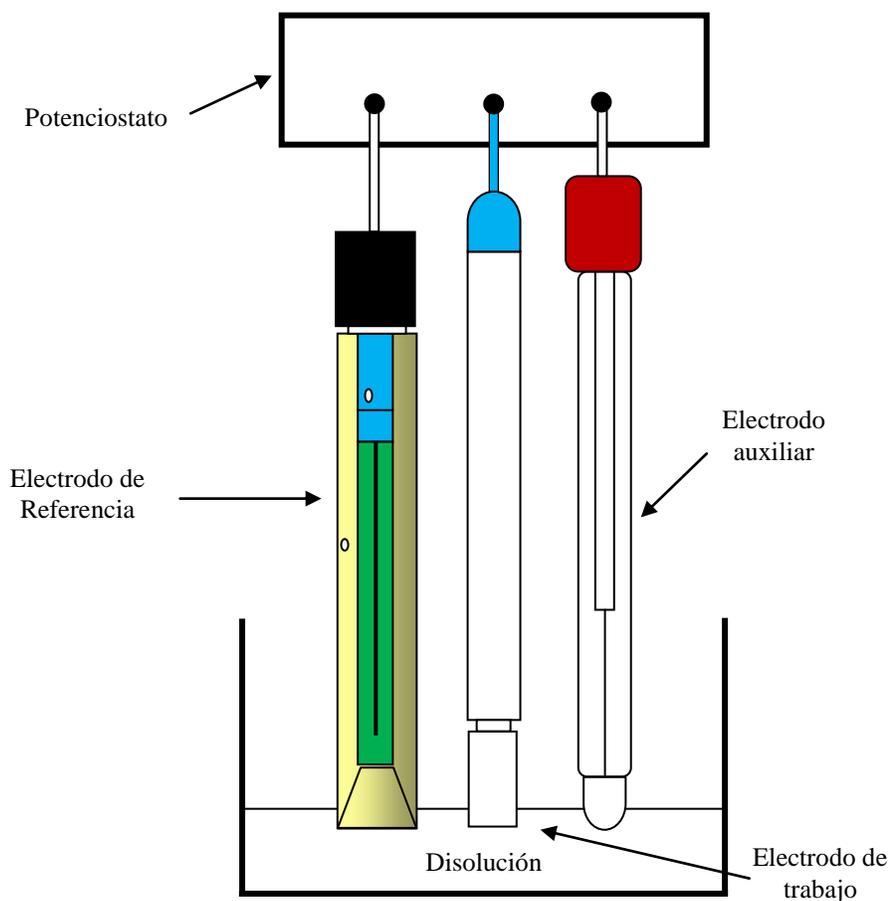


Figura 2.4. Celda electroquímica para mediciones voltamperométricas

Cuando la señal aplicada es un potencial constante la técnica es comúnmente llamada amperometría; sin embargo, además del potencial constante existen otras señales comúnmente utilizadas como excitación que se muestran en la figura 2.5. La primera señal mostrada, es conocida como barrido lineal y consiste en variar linealmente el potencial que es aplicado a la celda. Las señales de excitación B y C se conocen como impulso diferencial y onda cuadrada respectivamente. En este caso, la intensidad se mide en sincronía con la duración de los impulsos aplicados. Finalmente la señal C es una onda triangular que aplica un potencial que se incrementa linealmente hasta un punto máximo y posteriormente disminuye hasta el valor inicial original. Un ventaja de utilizar estas señales de excitación es que no es necesario alcanzar el equilibrio termodinámico para realizar las mediciones, por lo que el tiempo de respuesta suele ser mucho menor que en otros métodos electroquímicos basados en el equilibrio[18].

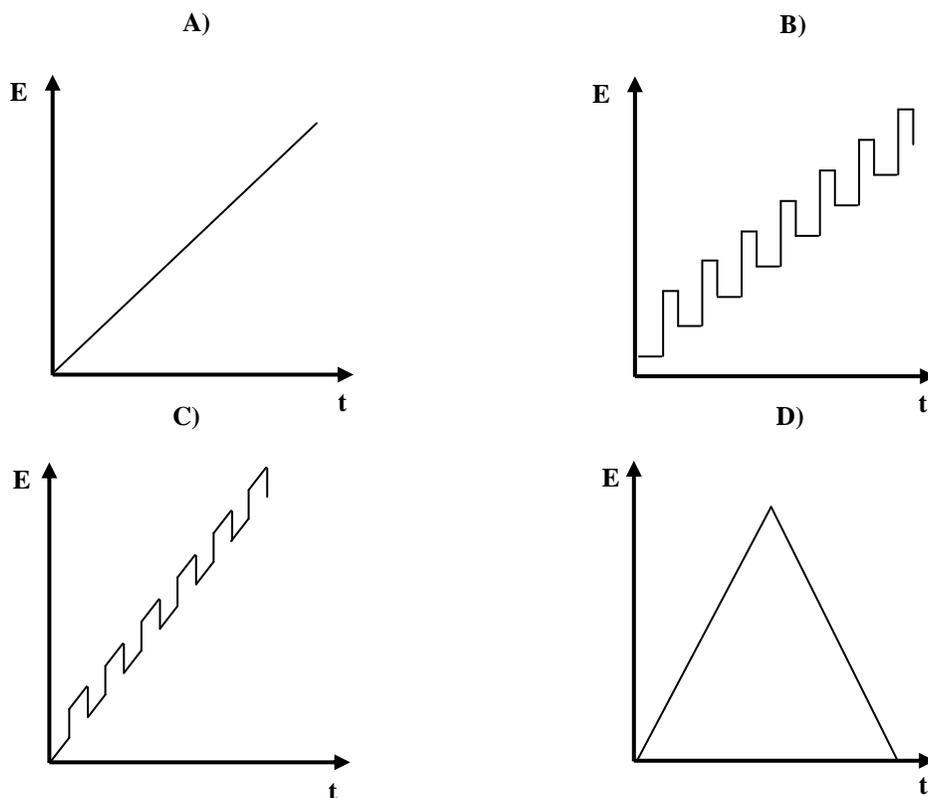


Figura 2.5. Señales de excitación comúnmente utilizadas en voltamperometría

La señal resultante de la técnica voltamperométrica se conoce como voltamperograma. Tradicionalmente, una medida de selectividad presente en el voltamperograma es el potencial de media celda $E_{1/2}$, el cual debe diferir por al menos 200 mV por cada sustancia presente en la celda electroquímica que se desee cuantificar, lo que limita el rango de medición del electrodo[4]. Aunado a esto, al realizar la medición es posible que existan varias especies que posean un comportamiento redox similar, por lo que la señal medida será una contribución de diferentes especies[18]. Para evitar lo anterior se han utilizado materiales adicionales que realicen cierto pre-tratamiento antes de que el analito de interés entre en contacto con el electrodo, como una capa con una membrana selectiva o una monocapa que permita sólo el paso de ciertas moléculas.

En voltamperometría la intensidad de corriente es una medida directa de la velocidad de la reacción electroquímica, que puede ser descrita de acuerdo a la ley de Faraday mostrada en la ecuación 2.1

$$i = nF \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)$$

Donde el cociente diferencial ($\delta c/\delta t$) representa la velocidad de reducción o de oxidación del analito, mientras que n representa el número de moléculas involucradas y F la constante de Faraday. De acuerdo a la ecuación la corriente generada es directamente proporcional a la velocidad de reacción del analito, pero también al número de moléculas involucradas lo que se relaciona directamente con el transporte de masa del analito a la superficie del electrodo. Este transporte se ve afectado por la cantidad de analito en la solución, el área del electrodo y los fenómenos de convección, difusión y migración[18]. Una forma de agilizar el transporte de masa hacia la superficie del electrodo es agitar la solución, utilizar un electrodo rotatorio o un método de inyección de flujo continuo. En estos casos el transporte de masa se ve acelerado y la corriente generada en el electrodo puede expresarse de acuerdo a la ecuación 2.2

$$i = nFA \left(\frac{D}{\delta} \right) C_s$$

En donde A representa el área del electrodo, D el coeficiente de difusión y C_s la concentración del analito en solución.

En esta técnica analítica, los quimiosensores voltamperométricos funcionan como electrodos indicadores. Estos no poseen una selectividad inherente asociada a su receptor, sino que ésta es alcanzada por métodos adicionales como la modificación o adición de los materiales que componen el electrodo indicador[19, 20]. Dentro de los modificadores más comunes se encuentran las nanopartículas metálicas, los nanotubos de carbono y los polímeros conductores como el polipirrol.

2.1.2 Biosensores

Como se vio en el caso de los sensores voltamperométricos, no siempre es posible alcanzar la selectividad por medio de reactivos sintéticos. Lo anterior dio pie al desarrollo de un subgrupo dentro de los sensores químicos conocidos como biosensores. Estos dispositivos pretenden alcanzar una alta selectividad con reactivos de origen biológico, lo que resulta ser altamente conveniente para el reconocimiento de analitos específicos. Aunque existen diferentes tipos, en este trabajo sólo se utilizaron biosensores basados en transductores electroquímicos por lo que la clasificación presentada se da en base al material biológico que se incorporó como receptor[8].

Concretamente, en los siguientes apartados se describen los dos reactivos biológicos empleados en este trabajo: las enzimas y los anticuerpos. Las primeras son utilizadas en los biosensores enzimáticos mientras que los segundos se incorporan en los inmunosensores electroquímicos. Una vez construido, el desempeño de un biosensor puede evaluarse tomando como base los parámetros analíticos de la sección 2.2, por lo que el contenido del texto se centrará en la operación e inmovilización del elemento biológico como receptor.

2.1.2.1 Biosensores enzimáticos

Las enzimas son moléculas proteicas que actúan como catalizadores biológicos en las reacciones químicas. Durante las reacciones, las enzimas se unen a un tipo especial de molécula conocida como sustrato por medio de una zona específica en la enzima conocida como sitio activo. Esta unión se conoce como complejo enzima-sustrato y, una vez terminada la reacción, da como resultado la descomposición del sustrato en nuevos productos[6]. Para realizar la catálisis, las enzimas deben ser activadas por medio de agentes externos llamados activadores, mientras que para regular o frenar su actividad se utilizan los agentes conocidos como inhibidores[2]. Los inhibidores pueden actuar de forma competitiva y no competitiva. En la inhibición competitiva la especie inhibidora compite con el sustrato para ocupar el sitio activo de la enzima bloqueando la formación de producto. En la inhibición no competitiva, el inhibidor se enlaza a la enzima y afecta su estructura alterando su función como catalizador.

En la figura 2.6a se muestra el principio de operación de la enzima en presencia del sustrato. Mientras que en la figura 2.6b y 2.6c se muestra la interacción de la enzima con un inhibidor.

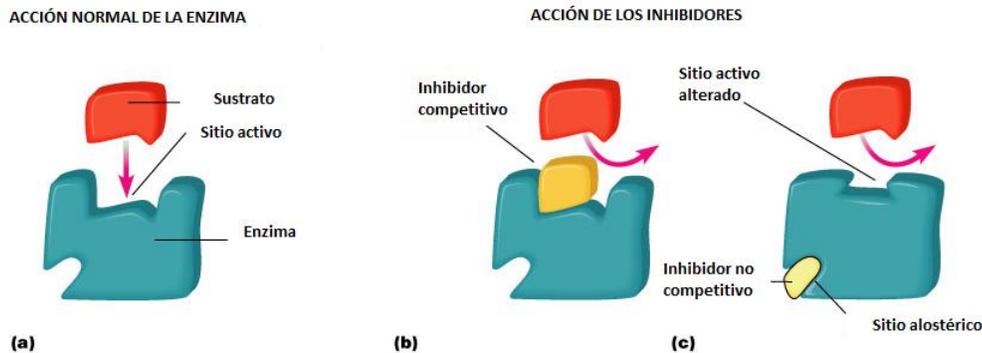


Figura 2.6. (a) Acción de la enzima en presencia de sustrato. (b) Acción del inhibidor competitivo ocupando el sitio activo de la enzima. (c) Acción del inhibidor no competitivo alterando la estructura de la enzima

Los biosensores enzimáticos utilizan los principios de operación mostrados en la figura 2.6 para la detección de analitos. Por un lado, es posible que el analito objetivo actúe como sustrato de la enzima y que su presencia en la muestra se relacione directamente con la cantidad de producto que se genera durante la reacción. Por otro lado, si el analito actúa como inhibidor, se considera que la diferencia entre la actividad de la enzima antes y después de interactuar con la muestra está relacionada con la concentración del analito [2, 12].

Para que la enzima pueda actuar como receptor del biosensor primero debe ser fijada a la superficie del transductor en un proceso conocido como inmovilización. En el caso de los biosensores electroquímicos, el transductor es un electrodo de trabajo dentro de una celda química como la mostrada en la figura 2.4. Para lograr capturar las enzimas directamente en el electrodo de trabajo pueden utilizarse métodos físicos o químicos. Los métodos físicos involucran el encapsulamiento de la enzima en una membrana colocada en la superficie del electrodo y, ya que no se realiza ningún cambio químico, este método no conlleva ninguna alteración en la estructura de la enzima. Por otro lado, los métodos químicos hacen uso de la formación de enlaces covalentes entre el grupo funcional de la enzima y el material del transductor[21]. Algunos ejemplos de estos métodos son el encapsulamiento en

electropolímeros, la adsorción química, los enlaces covalentes y el entrecruzamiento o *cross-linking*.

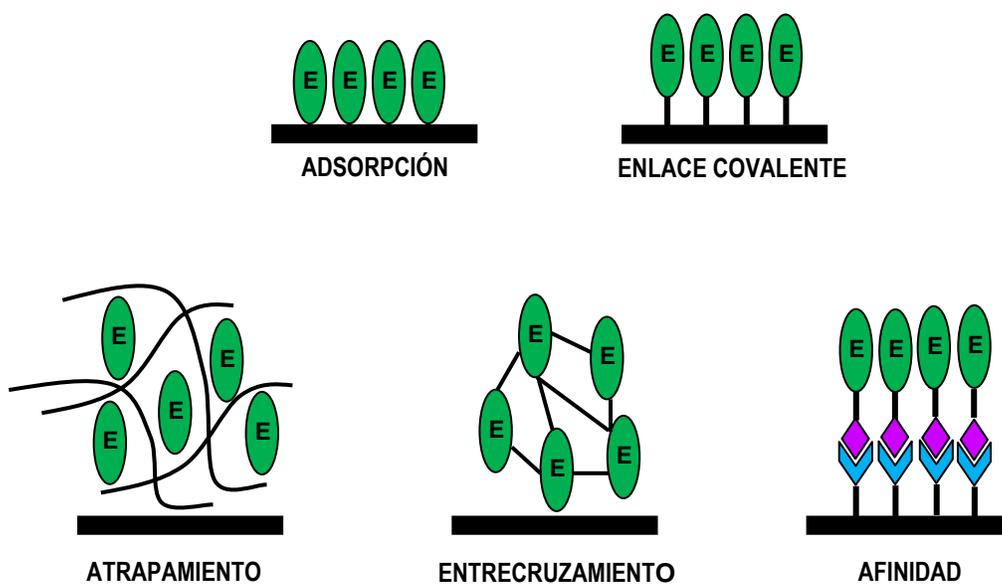


Figura 2.7 Métodos de inmovilización enzimáticos

Una vez fabricados, los biosensores enzimáticos suelen probarse ante diferentes soluciones patrón para obtener una curva de calibración como la mostrada en la figura 2.3 y así obtener los parámetros adecuados para evaluar su desempeño analítico como los enlistados en la sección 2.2.

2.1.2.2 Inmunosensores

Los inmunosensores son biosensores que utilizan anticuerpos como elemento de reconocimiento. Los anticuerpos son glicoproteínas con forma de Y que se producen dentro de un cuerpo anfitrión en respuesta a moléculas foráneas llamadas antígenos. Los antígenos son elementos que el cuerpo reconoce como externos tales como proteínas, compuestos químicos o partículas de materia (por ejemplo polen o polvo)[17]. El reconocimiento molecular de este procedimiento biológico está principalmente determinado por la forma y tamaño de la

molécula receptora y el antígeno específico. En la figura 2.8 se muestra de forma esquemática la interacción entre un anticuerpo y su antígeno.

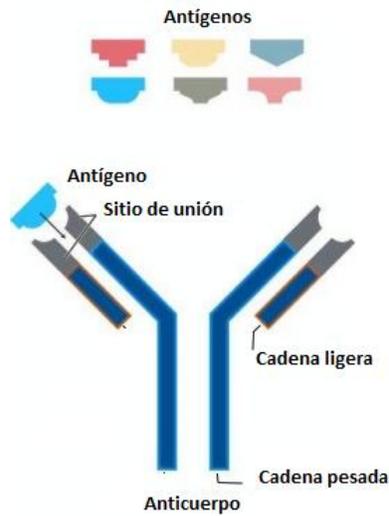


Figura 2.8 Estructura de un anticuerpo y su zona de interacción con el antígeno

Los anticuerpos se usan desde hace tiempo con fines analíticos en un conjunto de técnicas conocidas como inmunoensayos, que son los antecedentes directos de los inmunosensores. Los inmunoensayos utilizan la afinidad que se da en la interacción antígeno-anticuerpo para reconocer un analito específico que puede funcionar como antígeno o como anticuerpo. Para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, existen tres formatos de trabajo llamados directo, indirecto y sándwich los cuáles se muestran en la figura 2.9.

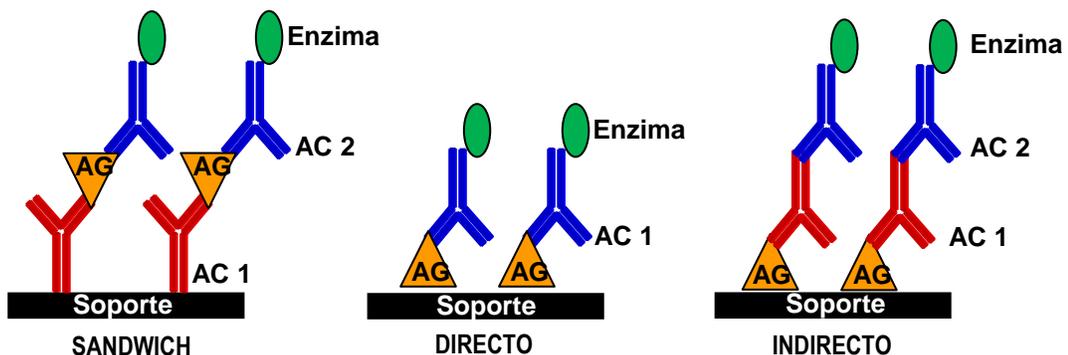


Figura 2.9. Diferentes formatos para el inmunoensayo en donde se aprecia la formación de complejos anticuerpo (AC)-antígeno (AG)

En el formato sándwich el analito que se desea monitorear actúa como antígeno (AG) e interactúa con dos anticuerpos (AC). El primero de ellos se encuentra inmovilizado en un soporte sólido, mientras que el segundo ha sido marcado con una enzima. Ya que por sí solos los complejos antígeno-anticuerpo (AG-AC) no proporcionan ninguna reacción visible, la enzima se utiliza como un marcador para identificar la formación total de complejos y ayudar a realizar la detección. Al final de la interacción, se considera que la actividad final del marcador enzimático está directamente relacionada con la cantidad de AG presente en la muestra[6]. En el formato directo, el AG se encuentra inmovilizado en un soporte e interactúa directamente con un único AC marcado con una enzima. Nuevamente, la formación de complejos AG-AC está relacionada directamente con la actividad del marcador enzimático. Finalmente, en el formato indirecto el AG se encuentra inmovilizado en una superficie sólida en donde interactúa con un primer anticuerpo (AC1) sin marcador enzimático. Una vez formado el primer complejo AG-AC1, se utiliza un segundo anticuerpo (AC2) con un marcador cuya actividad final está relacionada con la presencia total de complejos AG-AC[17].

Aunque existen diferentes marcadores para llevar a cabo la detección, las enzimas se utilizan comúnmente por su bajo costo. Los inmunoensayos basados en enzimas se conocen como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas o *ELISA* por sus siglas en inglés. Los tres formatos descritos anteriormente pueden reproducirse para fabricar un inmunosensor, por lo que el equivalente al soporte sólido sería la superficie del electrodo de trabajo y el analito que se desea monitorear sería el antígeno. Al igual que los biosensores enzimáticos, los inmunosensores suelen probarse ante soluciones patrón con diferentes concentraciones de antígeno para obtener una curva de calibración como la mostrada en la figura 2.3 y así obtener los parámetros adecuados para evaluar su desempeño analítico.

2.1.3 Lenguas Electrónicas (Arreglos de sensores)

Hasta ahora los quimiosensores y biosensores que se han presentado se enfocan en el análisis de las muestras utilizando un único elemento sensitivo. Un enfoque novedoso dentro del área

de los quimiosensores es la expansión de la información de entrada por medio de un arreglo de sensores, lo que se conoce como lenguas electrónica (LE)[7]. Las LE pertenecen a un grupo de sistemas llamados biomiméticos, que intentan establecer un simil de operación con los procesos sensoriales de los mamíferos superiores con fines analíticos tal como sucede con la visión artificial o las narices electrónicas[1].

El principio común de los sistemas biomiméticos recae en la compleja red de receptores presentes en los sistemas sensoriales de los mamíferos superiores. Dicha red, no responde ante un único estímulo de manera puntual, sino que diferentes receptores se activan con diferente intensidad ante un estímulo determinado. Esta información es recopilada por el sistema nervioso y decodificada para interpretar una percepción precisa[1]. Partiendo de lo anterior, las LEs integran una matriz de sensores de pobre o baja selectividad para originar una respuesta cruzada o *cross-sensitivity* que caracterice a cada una de las muestras analizadas. Cada uno de los sensores interactúa de forma paralela con la muestra funcionando como un canal de entrada. La combinación de las diferentes selectividades presentes en el arreglo de sensores, forman un patrón distintivo para cada muestra que ha sido llamado muchas veces “huella digital química” [22].

Sin embargo, para obtener esta información a partir de los datos de entrada, es necesario hacer uso de métodos de procesamiento de señal pues la información obtenida posee un alto grado de complejidad. La figura 2.10 muestra el diagrama general de funcionamiento de una LE y su simil con el sentido del gusto humano.

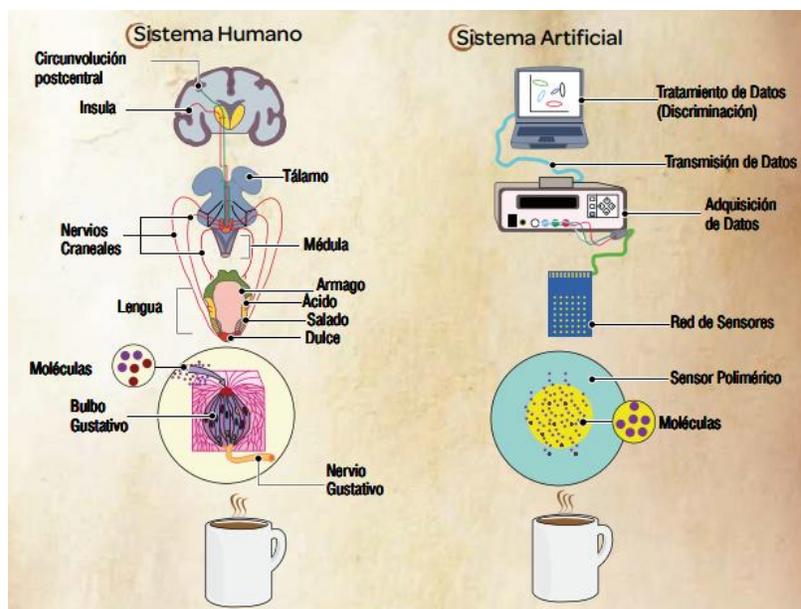


Figura 2.10. LE y su contraparte con el sentido del gusto humano.

A partir de su aparición, muchos trabajos se han dedicado a investigar las ventajas en cuanto a sensibilidad y selectividad que ofrecen las LE en comparación con un único elemento sensitivo[3, 23, 24]. Para la matriz de sensores, se han reportado LE con elementos potenciométricos, amperométricos, conductimétricos e impedimétricos, siendo los primeros los más comunes[17]. Una de las ventajas planteadas por esta tecnología es que, a diferencia de los quimiosensores y biosensores que sólo son capaces de cuantificar un analito a la vez, la naturaleza de las LE las hace multianalito. Sin embargo, para lograr esto un área importante en desarrollo es la aplicación de modelos matemáticos que describan acertadamente la compleja relación entre el conjunto de sensores y el analito o analitos presentes en la muestra. Por lo anterior, se incluye en la siguiente sección una revisión de los métodos utilizados para el modelado de las señales tanto de biosensores como de arreglos de sensores.

2.2 Métodos de análisis

Tradicionalmente, dentro de la Química Analítica, la quimiometría se ha enfocado en la descripción del comportamiento de los sistemas químicos, la optimización mediante el diseño de experimentos y el análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras [25]. Este último

apartado es el que se reporta mayormente en la literatura científica, ya que el gran avance tecnológico experimentado en la electrónica y los sistemas de comunicación han dado como resultado equipos más sofisticados y capaces de obtener gran cantidad de información acerca de las muestras procesadas. Al disponer de una mayor cantidad de registros y medidas, fue necesario contar con métodos capaces de extraer la información relevante presente en el universo de datos (asumiendo que exista dicha información). De acuerdo a Wold la Quimiometría trata de resolver los siguientes problemas: (1) como obtener información química relevante de los datos medidos (2) como representar la información obtenida, y (3) como transformar tal información en datos [26].

Como se mencionó, el avance tecnológico experimentado en las últimas décadas puso a disposición de los analistas químicos instrumentos capaces de obtener gran cantidad de información, al incrementar el número de variables obtenidas en cada medición experimental (tiempo, número de canales, longitudes de onda, etc.) Esto puso de manifiesto una de las características principales del procesamiento quimiométrico: la naturaleza multivariable de los experimentos[25]. Esta información multivariable, ha sido utilizada como información de partida para obtener los modelos de descripción químicos que generalmente empleaban información de puntos estacionarios (por ejemplo potenciales finales o de equilibrio) en diferentes experimentales utilizando métodos de detección tradicionales[27].

La figura 2.11 muestra la evolución en el tamaño de los datos utilizados para el modelado químico. El caso más simple es un escalar, que consiste en un valor puntual de la medición. Un segundo caso consiste en un vector de datos, que corresponde a diferentes medidas tomadas sobre la misma muestra. El siguiente tipo de datos corresponde a una matriz de I filas por J columnas. Generalmente las filas están asociadas con las muestras medidas y las columnas con el número de variables registradas para cada muestra. Un último caso corresponde a un arreglo en forma de bloque que agrega una tercera variable. Este tipo de datos puede verse como un arreglo tridimensional de datos en forma de matrices[28].

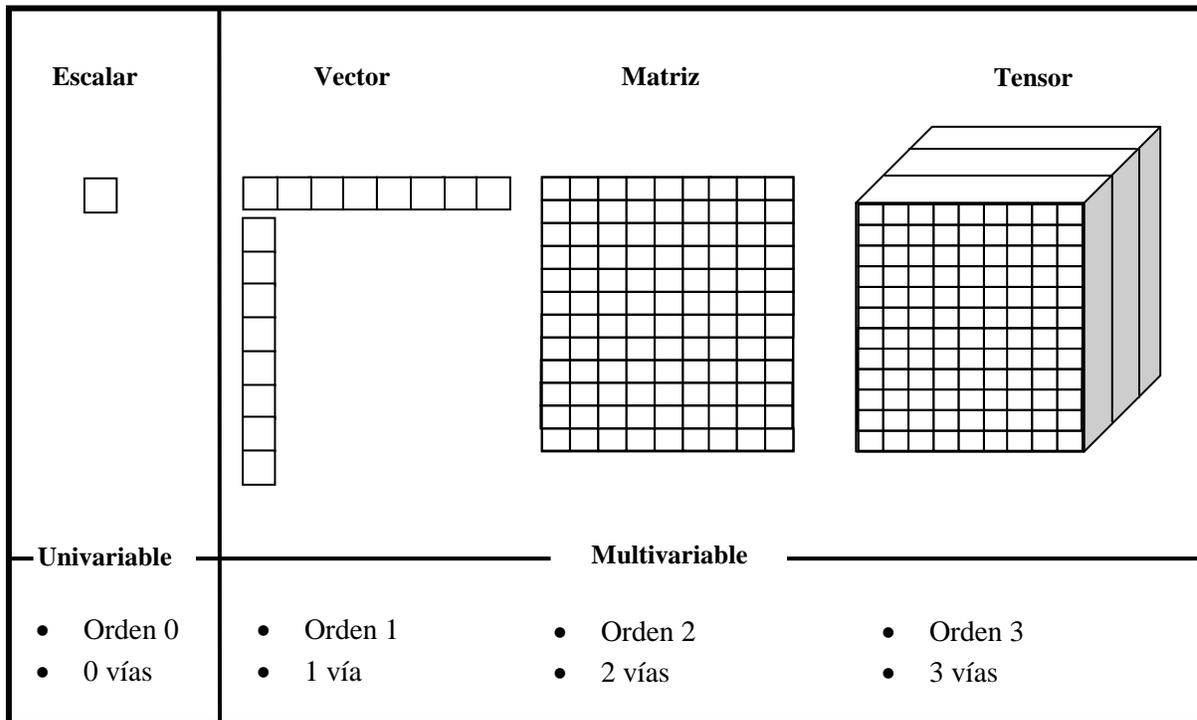


Figura 2.11. Clasificación de los datos de acuerdo a su dimensión

Existe una multitud de métodos publicados en la literatura para extraer información de estas estructuras; sin embargo de acuerdo al objetivo que se persigue en este trabajo es de utilidad distinguir los métodos dedicados al análisis exploratorio de los enfocados al aprendizaje supervisado. Los primeros tienen como objetivo la exploración de tendencias presentes en los datos y los segundos la creación de reglas para discriminar un conjunto de muestras por medio de características definidas [28]. Las secciones siguientes describen las bases de dos modelos exploratorios utilizados para el análisis de datos de 2 y 3 vías conocidos como Análisis por Componentes Principales o *Principal Component Analysis* (PCA) y el Análisis de Factores Paralelos o *Parallel Factor Analysis* (PARAFAC). Para los modelos de aprendizaje supervisado se exponen brevemente las bases de las Redes Neuronales Artificiales o *Artificial Neural Networks* (RNA), las máquinas de soporte vectorial o *Support Vector Machines* (SVM) y el análisis discriminante lineal o *Linear Discriminant Analysis* (LDA).

2.2.1 Análisis exploratorio

Los métodos cualitativos de análisis se centran en la exploración de los datos, generalmente con fines de clasificación y discriminación. Estos métodos también constituyen un buen sistema para visualizar las variaciones entre datos que presentan una gran dimensionalidad. Adicionalmente pueden ser utilizados como un paso de pre-procesamiento de la información, antes de construir un modelo de calibración.

2.2.1.1 Análisis de Componentes Principales (PCA)

Al obtener mayor cantidad de datos durante los experimentales, es posible encontrar que solo una fracción del total contenga información relevante. Para aislar la información relevante del resto de los datos redundantes, se utilizan métodos de compresión que ayudan a reducir la dimensionalidad de los datos. PCA es un modelo lineal que busca encontrar una representación simplificada por medio de variables latentes presentes en los datos [25]. Para utilizar esta clase de modelos es necesario que el número de variables latentes sea menor que el número de variables originales y que la información descartada sea equiparable al ruido. Una vez obtenido el modelo los datos son representados en un nuevo eje que resulta más conveniente para su visualización e interpretación.

El modelo PCA implica la descomposición de una matriz \mathbf{X} de dos dimensiones en un producto de dos matrices \mathbf{T} y \mathbf{P} , como se muestra matemáticamente en la ecuación 2.3 y gráficamente en la figura 2.12. En esta ecuación \mathbf{T} es llamada la matriz de *scores*, \mathbf{P} la matriz de *loadings* y \mathbf{E} la matriz de residuales (idealmente solo ruido). El superíndice A indica el número de componentes totales utilizadas para representar los datos, que debe ser menor que el número de variables originales en la matriz \mathbf{X} [26].

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} = \sum_{a=1}^A t_a p_a^t + \mathbf{E}$$

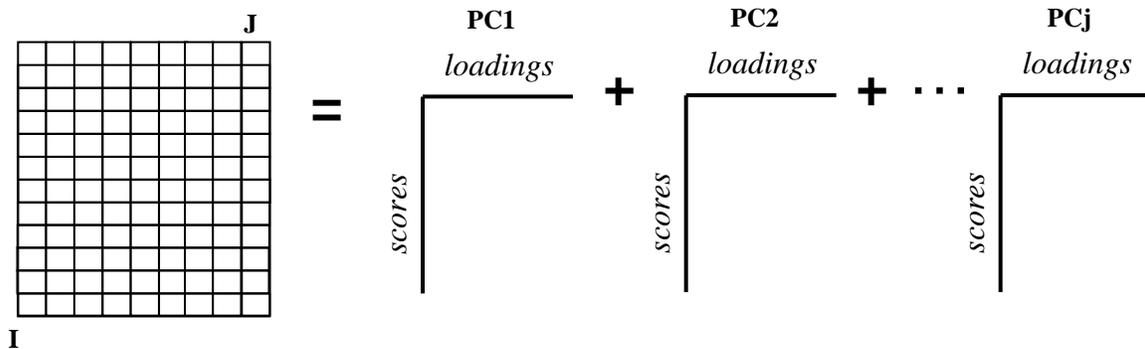


Figura 2.12. Representación del modelo PCA

En el ejemplo mostrado la figura 2.12, la matriz X es representada por un conjunto de datos de 3 variables. Las filas de la matriz X se relacionan con el número de observaciones realizadas, mientras que las columnas representan las variables involucradas. El procedimiento para obtener las componentes principales (PC) de la matriz de datos consiste en calcular una variable latente que contenga la máxima variabilidad de los datos. Esto se logra obteniendo la matriz de covarianza de la matriz X y calculando los eigenvectores y eigenvalores para dicha matriz. Los eigenvectores proporcionan información acerca de la contribución de cada variable (columna) dentro del conjunto de datos, mientras que a partir de los eigenvalores se puede calcular la variabilidad total que porta cada eigenvector. En este punto, es manifiesto que no todos los eigenvectores contribuyen con la misma variabilidad por lo que se escogen aquellos, con la más alta variabilidad y se descarta los que contribuyen de manera nula. Finalmente los datos originales se representan en función de estos eigenvectores, que son a su vez una combinación lineal de las variables originales. La compresión de los datos proviene de conservar solo aquellos PCs que representen la mayor variabilidad de los datos y proyectar los datos originales en función de los PCs escogidos.

2.2.1.2 Análisis de Factores Paralelos (PARAFAC)

El Análisis de Factores Paralelos es parte de los métodos llamados multivía, es decir trabaja con datos agrupados en bloques como los mostrados en la figura 2.11. Su origen se remonta a los años 70's cuando fue propuesto dentro del campo de la psicometría. Es, al igual que

PCA, es un método que intenta representar un conjunto de datos de tres vías en una sumatoria de n componentes llamados factores[26].

Para un conjunto de datos de tres vías, representado por \underline{X} de dimensiones $I \times J \times K$, el modelo de descomposición PARAFAC puede expresarse de acuerdo a la ecuación 2.4 y representarse gráficamente en la figura 2.13

$$x_{ijk} = \sum_{r=1}^R a_{ir} b_{jr} c_{kr} + e_{ijk}$$

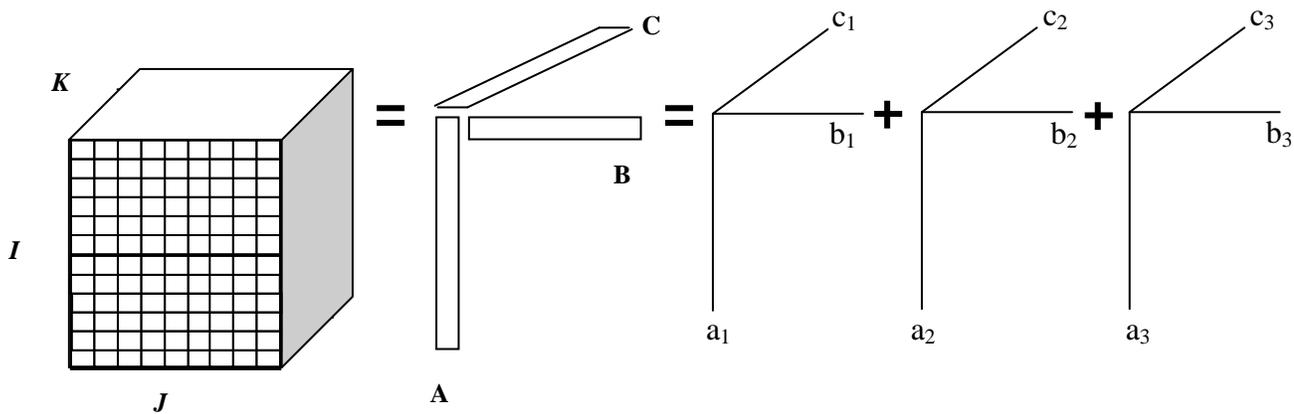


Figura 2.13. Representación del modelo PARAFAC

En la representación de la figura 2.13 la representación simplificada de los datos \underline{X} se representa por medio de los factores \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} que son una simplificación compacta de los datos en las tres vías. A diferencia de PCA, en donde los *loadings* son calculados en base a la dimensión de los datos existentes, en PARAFAC es necesario proponer el número de factores para la representación de los datos[29]. En el ejemplo de la figura 2.13 la representación está dada por tres factores,

2.2.2.1 Redes Neuronales Artificiales (ANN)

Las redes neuronales artificiales son máquinas de aprendizaje que intentan, en su forma más sencilla, emular el funcionamiento del cerebro humano. La aparición de estos modelos matemáticos se remonta a los años 50's cuando se buscaba un modelo representativo de las actividades realizadas por el cerebro humano (reconocimiento de patrones, respuesta a estímulos externos, versatilidad, etc). A lo largo de los años las redes neuronales se han aplicado a campos tan diversos como las finanzas, diagnóstico médico, control de procesos, y para la resolución de problemas de ingeniería, física y química. Su éxito en áreas tan diversas se debe principalmente a que las redes son sofisticados modelos de naturaleza no lineal, que pueden aproximar gran cantidad de funciones. Además, a partir del entrenamiento, son capaces de aprender estructuras representativas presentes dentro de la información.

Las redes neuronales están compuestas por unidades llamadas neuronas que pretenden encontrar una relación funcional entre el conjunto de entradas y su correspondiente salida. Lo anterior puede representarse por medio de la ecuación 2.3

$$y = f(x)$$

En donde x e y representan los vectores de entrada y salida respectivamente, mientras que f representa la relación buscada. Las neuronas son las unidades de procesamiento básicas y pueden conectarse juntas a fin de obtener diversas estructuras llamadas topologías o arquitecturas. Esto determina la manera en que las señales de entrada serán procesadas y posteriormente enviadas a otros elementos de la red. Aunque existe una gran variedad de arquitecturas, la presentada en la figura 2.17 y conocida como perceptrón multicapa (o red de retropropagación) es la más ampliamente utilizada y reportada en la literatura. Su arquitectura básicamente consiste en una capa con tantas neuronas de entrada como datos de entrada se tengan, seguida de una capa o capas intermedias ocultas en donde se lleva a cabo el procesamiento de la información; finalmente una capa de salida que contiene tantas neuronas como componentes de salida se necesite.

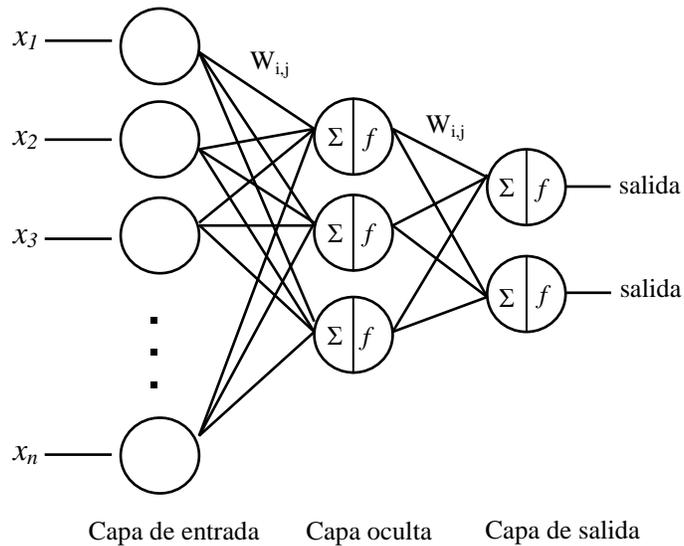


Figura 2.14. Modelo para el perceptrón multicapa

Para realizar el computo de la salida \mathbf{y} es necesario calcular N_o funciones de N_i variables de entrada; cada función es una combinación ponderada de las funciones no lineales presentes en la capa de entrada.

$$y_k(\mathbf{x}) \equiv g \left(\sum_{j=1}^{N_h} w_{kj} f \left(\sum_{i=1}^{N_i} w_{ji} x_i + w_{j0} \right) + w_{k0} \right)$$

Donde y_k representa el k -ésimo componente del vector de salida, w_{kj} y w_{ji} son los pesos de la capa oculta a la salida y de la entrada a la capa oculta respectivamente. Las funciones f y g son llamadas funciones de activación y pueden ser lineales o no lineales. Para encontrar la relación entre los datos de entrada y salida es necesario que los pesos sean ajustados. Para esto se la red se somete a un proceso de aprendizaje en donde un conjunto representativo de los datos es presentado junto con su correspondiente salida.

Existen varios algoritmos de entrenamiento, pero el algoritmo de retropropagación es el más utilizado para las redes multicapa. En este algoritmo, los pesos son ajustados iterativamente de manera que permitan minimizar el valor de una función de coste de error E . Generalmente se emplea un enfoque basado en el método de gradiente descendiente, de acuerdo a los parámetros mostrados en 2.5

$$\Delta w_{ij}(t) = -n \frac{\partial E}{\partial w_{ij}} + \alpha \Delta w_{ij}(t - 1)$$

Los resultados entregados por la red, posterior al proceso de entrenamiento pueden ser evaluados mediante un segundo conjunto de datos (testing set) que se encarga de evaluar la capacidad de generalización de la red ante nuevos valores de entrada.

2.3 Métodos de automatización

Una de las características deseables del proceso analítico es la integración de las partes que lo conforman. Bajo este concepto surgieron los llamados Sistemas Totales de Análisis (*Total Analysis Systems*) que tienen como objetivo integrar los pasos del proceso analítico mostrados en la figura 2.1. En este sentido, los métodos de automatización juegan un papel importante dentro del proceso de integración. Los instrumentos automatizados ofrecen ventajas económicas, incrementan la velocidad de análisis y son capaces de obtener resultados reproducibles[18]. Esto se debe, entre otras cosas, a la elevada precisión con que las máquinas pueden reproducir el instante de tiempo en que se realizó una operación lo que rara vez se consigue con operadores manuales. Así mismo se reduce el error humano al eliminar variables como estados de salud, cansancio o estrés que no afectan a los sistemas automáticos.

Pocos sistemas integran la totalidad de fases involucradas en el procedimiento analítico, pero algunos han conseguido la simplificación de varias etapas del proceso. Por ejemplo, con la introducción de sistemas robóticos, los muestreadores modernos son capaces de elaborar de forma autónoma diversos procedimientos que eran generalmente realizados de forma manual. Estos muestreadores con frecuencia son acoplados a los cromatografos para realizar de forma

autónoma las etapas de separación de las muestras[18]. Como estos, existen diferentes ejemplos de automatización dentro de la Química Analítica, sin embargo las técnicas de inyección en un flujo continuo han sido una de las alternativas más populares desde su aparición a mediados de los 70's debido a su bajo costo y la versatilidad de su implementación[30]. Además, los sistemas de flujo continuo han demostrado ser compatibles con una gran variedad de métodos de detección lo que los hace aptos para campos tan variados como el alimenticio, farmacéutico y ambiental entre otros[31-33]. Las dos técnicas de flujo más populares son el Análisis por Inyección de Flujo o FIA (*Flow Injection Analysis*), el Análisis por Inyección Secuencial o SIA (*Sequential Injection Analysis*) y el Laboratorio en una válvula o LOV (*Lab on Valve*). Por ser las utilizadas en este trabajo, en las siguientes secciones se detallan los principios de operación de las dos primeras técnicas así como algunas de sus ventajas y desventajas.

2.3.1 Análisis por inyección de flujo (FIA)

La técnica de Análisis por Inyección de Flujo (FIA) fue descrita por primera vez en 1975 por Ruzicka y Hasen en Dinamarca[33]. Este método contó con una rápida aceptación, ya que permitió automatizar de manera sencilla y a un bajo costo una gran variedad de procedimientos analíticos manuales. Para construir el sistema, los diferentes elementos se conectan entre sí por medio de tuberías en una configuración conocida como *manifold* que se muestra en la figura 2.17. El elemento primordial del sistema FIA es una bomba peristáltica multicanal encargada de suministrar un flujo constante y controlado. Por uno de los canales de la bomba, se hace circular una solución conocida como portadora o *carrier* que se utiliza para transportar los reactivos a cualquier parte del sistema. El resto de los canales disponibles de la bomba peristáltica pueden transportar otros reactivos necesarios para el procesamiento de la muestra. Mediante una válvula de inyección es posible introducir al flujo continuo una cantidad determinada de la muestra que se desea analizar. La bobina o *coil* es un pequeño reactor en donde la solución portadora, la muestra y los reactivos transportados convergen y pueden interactuar para dar lugar a una especie química detectable. Al final, la especie formada es enviada a una celda de flujo o *flow-trough cell* en donde se lleva a cabo la

medición. Una gran ventaja de este método es que no está limitado a una técnica de medición específica, por lo que puede acoplarse a diferentes métodos instrumentales[33].

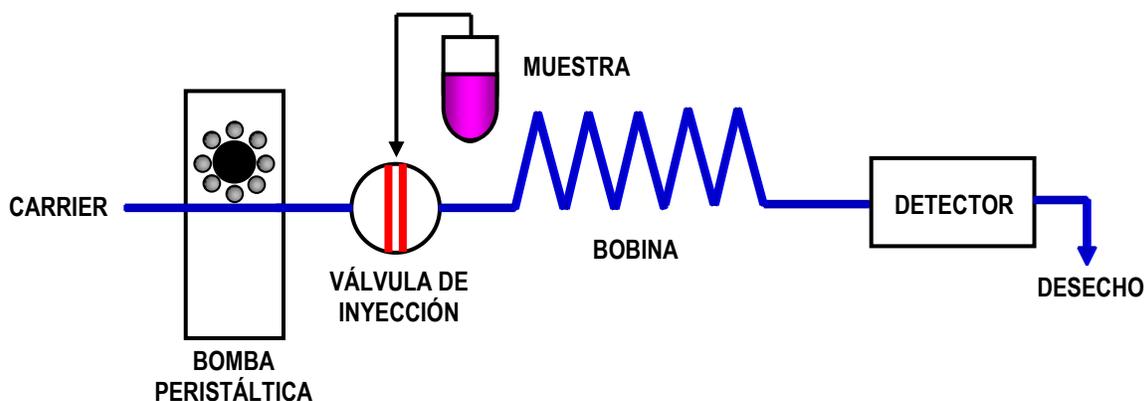


Figura 2.17. Diagrama básico de un sistema de análisis por inyección en flujo

Antes de la aparición de las técnicas de flujo continuo, los métodos automatizados se basaban en la inyección de muestras acuosas junto con un flujo de burbujas de aire que separaban cada elemento. Esto permitía la homogenización de cada muestra por separado y evitaba la contaminación entre reactivos[18]. Sin embargo el uso de tubería con diámetros reducidos (típicamente 0.5 mm de diámetro interno), así como la combinación de flujos laminares y turbulentos a una velocidad controlada permitió la inserción directa de la muestra y los reactivos sin una fase gaseosa adicional. La combinación de los flujos y discontinuidades de la tubería promueve la mezcla entre reactivos, y el flujo continuo de la solución portadora mantiene la integridad de cada muestra evitando la contaminación[34].

Una ventaja más de la técnica FIA es la posibilidad de obtener información dinámica y continua de la interacción entre las especies químicas formadas y el detector. Generalmente las mediciones manuales se centran en puntos estacionarios registrados cuando la reacción ha alcanzado el equilibrio. Sin embargo, en la técnica FIA es posible obtener una señal transitoria producto de la interacción de la muestra con los reactivos en un flujo continuo[30]. Mientras la muestra avanzaba por la tubería, los fenómenos de dispersión axial y radial forman un gradiente de concentración que puede interpretarse como una curva que inicia en la

concentración 0 hasta la concentración máxima presente ($C_{m\acute{a}x}$) [18]. Este fenómeno llamado dispersión controlada se muestra en la figura 2.18.

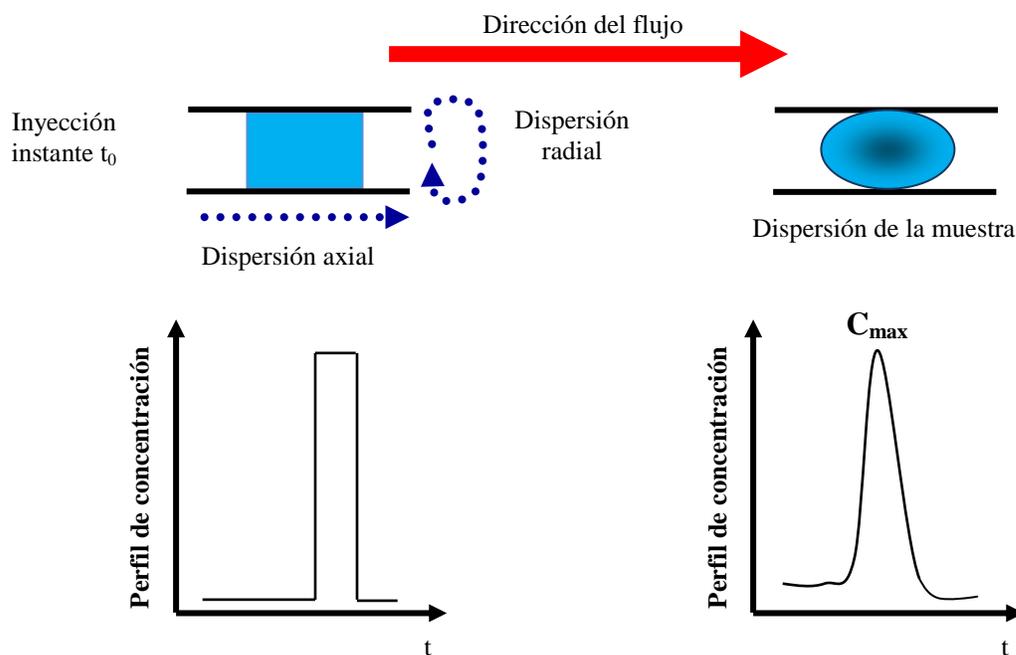


Figura 2.18. Fenómeno de dispersión en un sistema de análisis por inyección en flujo

Para optimizar el desempeño de un sistema FIA es necesario tomar en cuenta los parámetros que afectarán la aparición de la especie química que se desea detectar. Generalmente, los parámetros tomados en cuenta son la el flujo (relacionado directamente con la velocidad seleccionada para la bomba peristáltica), el diámetro interno de la tubería, el volumen de la muestra inyectada y la longitud de la bobina en donde se lleva a cabo la reacción. Cada uno de estos factores posee un efecto sobre la señal medida y antes de iniciar un proceso analítico es recomendable realizar la caracterización del sistema y de cada uno de estos parámetros con algún analito de respuesta conocida.

2.3.2 Análisis por inyección secuencial (SIA)

Aunque desde su creación la técnica FIA había alcanzado gran popularidad, existen ciertos inconvenientes en su implementación inherentes a su principio de operación[33]. La primera

desventaja es la necesidad de un flujo continuo para operar el sistema (aún si las muestras no están siendo procesadas), lo que da como resultado una cantidad elevada de residuos. La segunda desventaja consiste la modificación de la configuración del sistema o *manifold* cuando los procedimientos analíticos involucran un número elevado de reactivos, lo que dificulta su operación [35]. Como respuesta a estos inconvenientes, se propuso una modificación a la técnica FIA conocida como Análisis por Inyección Secuencial o SIA que se considera la segunda generación de los métodos de flujo.

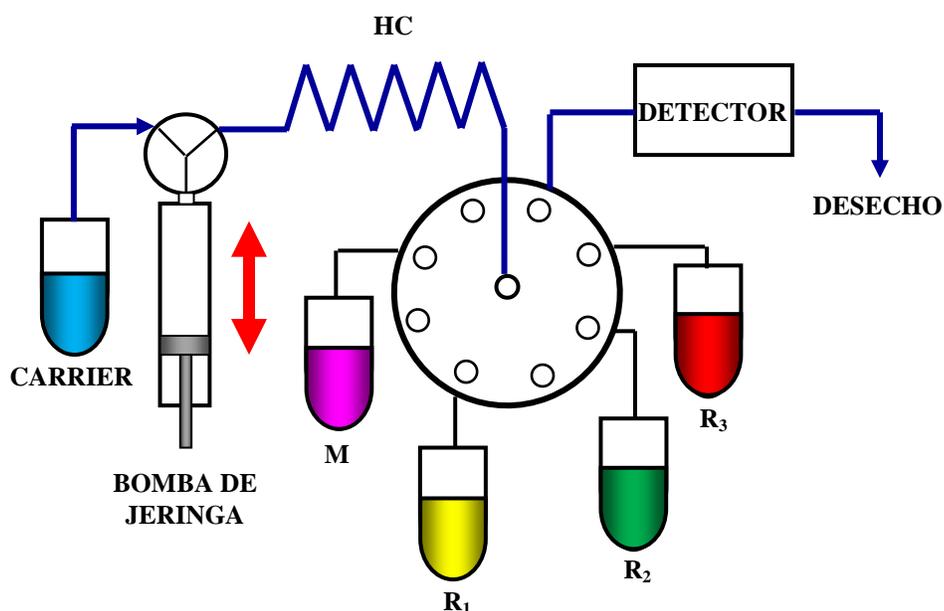


Figura 2.19. Diagrama básico de un sistema de análisis por inyección secuencial

La figura 2.19 muestra la conexión de los elementos utilizados en el *manifold* de la técnica SIA. En principio la bomba peristáltica es reemplazada por una bomba de jeringa que permite manejar volúmenes en el orden de los mililitros y los microlitros, lo que disminuye drásticamente el consumo de reactivos. Para ello, la jeringa maneja los fluidos mediante la activación de un embolo controlado por un motor a pasos de gran precisión. En la figura 2.18 también se observa la inclusión de una válvula multipuerto. Este dispositivo permite el manejo de múltiples reactivos sin la necesidad de alterar el *manifold*, lo que le proporciona a la técnica SIA una gran versatilidad. La bobina de retención o *holding coil* se utiliza para evitar que los reactivos de la válvula multipuerto contaminen la solución portadora, mientras que en el reactor de bobina o *reactor coil* se lleva a cabo la reacción entre la muestra y los reactivos

involucrados para dar como resultado una especie química detectable. Finalmente, al igual que la técnica FIA, la técnica SIA es capaz de acoplarse a un gran número de métodos de detección.

A diferencia de la técnica FIA, en donde se establece un flujo continuo durante todo el procedimiento, la técnica SIA hace uso de lo que se conoce como fluidos programables[36]. Lo anterior, no es sino la manipulación del flujo por medio de la programación y sincronización de los dispositivos involucrados en el *manifold*. En el caso de la bomba de jeringa, es posible manipular la dirección del flujo (aspiración o inyección), la velocidad del pistón (flujo) y el volumen de la muestra que se aspira o inyecta (número de pasos del motor). Adicionalmente, es posible introducir pausas en el manejo de las muestras que funcionen como períodos de incubación. Por otro lado, los puertos de las válvulas pueden ser controlados para funcionar como entradas o salidas del sistema y de esta manera crear varios caminos adicionales para la circulación del flujo. Para lograr esta sincronización entre los elementos del *manifold* existen programas comerciales de compañías como FIALab® y GlobalFIA® que son líderes en fabricación de sistemas de flujo. Sin embargo, es posible desarrollar aplicaciones a la medida en lenguajes como Quick Basic®, Visual Basic® y LabVIEW®[37]

2.4 Estado del arte

La inclusión de información multivariable para la obtención de modelos de predicción más robustos ha sido una tendencia creciente dentro de la Química Analítica desde finales de los 90's.). La mayoría de los primeros enfoques que trataron de abordar este tema se centraron en la obtención de modelos estáticos o *hard models* basados en ecuaciones diferenciales para predecir el comportamiento de un fenómeno químico en particular ante el estímulo de un analito. Sin embargo, el segundo enfoque basado en los llamados modelos flexibles o *soft models* es el que encuentra mayor difusión actualmente. A diferencia de los modelos estáticos, los modelos flexibles no se centran en encontrar un único modelo aplicable a todos los casos sino que tratan de encontrar patrones y tendencias estadísticas para describir un conjunto de datos. Estas tendencias pueden posteriormente utilizadas para resolver alguna tarea de cuantificación o cualificación.

El interés por la inclusión de nueva información en los modelos surgió a raíz de las facilidades prestadas por los modernos métodos instrumentales, así como un avance significativo en el poder computacional de los equipos actuales. Esto motivó la aparición de algoritmos más robustos que permitían el manejo multivariable de los datos. Puesto que los métodos ópticos y cromatográficos se encuentran ampliamente distribuidos en los laboratorios analíticos, la mayoría de la literatura que aborda el modelado multivariable de datos reporta aplicaciones para estas técnicas. Con excepción de las lenguas electrónicas (cuyas características intrínsecas ameritan un modelo multivariable) los sensores electroquímicos incorporan muy poco el análisis quimiométrico en el manejo de sus señales.

Tradicionalmente esto se debe a que durante el desarrollo de un quimiosensor o un biosensor siempre se busca la alta selectividad con el analito, por lo que se espera que el resultado de las mediciones presente características estacionarias que puedan ser fácilmente correlacionadas con la presencia del analito deseado. Existe, sin embargo, una gran cantidad de quimiosensores y biosensores capaces de entregar un registro continuo de su interacción con el analito. Esto implica una gran cantidad de información que generalmente es descartada. Ya que, como se ha mencionado, el objetivo principal de este trabajo es incorporar la información contenida en la fase transitoria de la respuesta de quimiosensores y biosensores al modelo final de respuesta (ya sea cualitativo o cuantitativo) se presenta una revisión del estado del arte en este tema.

Los sensores voltamperométricos no involucran el equilibrio termodinámico del analito en solución, por lo que la señal resultante no posee una fase estacionaria. De acuerdo al potencial de excitación y el material del electrodo de trabajo, la forma resultante de la señal así como su amplitud pueden variar drásticamente.

La evaluación de este tipo de señales en dispositivos aislados o en arreglos de más elementos conlleva generalmente un pre procesamiento de datos por las grandes dimensiones que generalmente presentan los registros originales. La tabla 2.1 muestra una revisión de los trabajos en donde el análisis de datos provenientes de sensores voltamperométricos es utilizado con fines de discriminación y cuantificación.

2.1 Aplicaciones del modelado de la respuesta transitoria en sensores voltamperométricos

Muestra	Tarea	Herramienta de procesamiento	Observaciones	Ref
Mezclas de 4-aminophenol, paracetamol y ácido ascórbico	Cuantificación	WNN	Cuantificación simultánea de tres analitos, aún en presencia de señales altamente traslapadas.	[38]
Mezclas de Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Tl⁺, In³⁺	Cuantificación	WNN	Cuantificación de tres analitos principales y balanceo de 2 especies interferentes.	[39]
Muestras de vino	Cualificación	PCA	Clasificación de muestras de vino de acuerdo a su variedad (blanco, rosado y rojo)	[40]
Muestras de té negro	Cualidades sensoriales	PCA, ANN	Aplicación de diversas técnicas de preprocesamiento y procesamiento para correlacionar características sensoriales como aroma, fuerza y calidad de las hojas	[41]

En cuanto al procesamiento quimiométrico, los biosensores presentan un número reducido de aplicaciones debido principalmente a las reacciones biológicas altamente selectivas que intervienen en su operación. Las principales aplicaciones de modelado implican un arreglo de entrada con material biológico de diferentes orígenes para detectar la presencia de diferentes analitos. En el caso de los biosensores enzimáticos el modelado quimiométricos se ha utilizado con fines de cuantificaciones multianalito utilizando características estacionarias de la señal (máxima amplitud, porcentaje de inhibición). Mientras en el caso de los inmunosensores, la alta especificidad de los anticuerpos ha reducido el modelado a calibraciones no lineales basadas en funciones sigmoideas. En ambos casos la información dinámica es generalmente descartada.

Capítulo III

Desarrollo Experimental

3. Desarrollo experimental

Este capítulo se encuentra dividido en cinco secciones, que corresponden a la solución propuesta por este trabajo y al desarrollo experimental para el análisis de las 4 muestras utilizadas como modelo. Dichas muestras consistieron en agua de lago contaminada con pesticidas, moluscos contaminados con la biotoxina ácido okadaico, así como café y cerveza de diferentes regiones del país. Para poner en contexto la importancia de cada aplicación, se brinda información acerca de la naturaleza de cada una muestra al inicio de cada sección. Posteriormente se presenta el desarrollo experimental llevado a cabo para la fabricación de los biosensores y los quimiosensores que se integran en las LEs. En las aplicaciones que involucran el uso de biosensores, se describe el diseño e implementación de una nueva configuración en flujo que permite la renovación de la capa bioreceptora y simplifica la detección en línea de analitos objetivos. Por otro lado, en el caso de las LEs, además del procedimiento experimental se brinda la información necesaria para establecer un marco de referencia previo a la clasificación de un conjunto de muestras.

Es importante señalar que los experimentales desarrollados con biosensores enzimáticos e inmunosensores electroquímicos se realizaron en el laboratorio IMAGES de la Universidad de Perpignan-Via Domitia, Francia; mientras que los experimentales con arreglos de quimiosensores se realizaron en el laboratorio 11 de la sección de Bioelectrónica del Departamento de Ingeniería Eléctrica del CINVESTAV.

3.1 Solución propuesta

Como se puso de manifiesto en capítulos anteriores, a pesar de la amplia variedad de los métodos instrumentales convencionales en muchos sectores existe la necesidad de contar con dispositivos auxiliares de monitoreo que proporcionen información rápida, confiable y segura sin recurrir a un análisis costoso o exhaustivo. Particularmente existen sectores, como el ambiental y el alimenticio, en donde el uso de esta clase de herramientas es deseable para establecer en tiempo real la presencia de contaminantes o para llevar a cabo la evaluación de productos con fines de control y calidad[2, 3].

En este trabajo, se busca establecer las bases para el desarrollo de sistemas integrales de monitoreo simplificados capaces de funcionar como alternativa a las técnicas instrumentales actuales. Se propone utilizar herramientas de sensado químico como los biosensores y las LEs e integrarlos como detectores, por medio de la aplicación de nuevas técnicas de procesamiento y del desarrollo de instrumentación novedosa que permita tanto la integración del proceso analítico como la mejora en las características de detección de los métodos propuestos. Para probar la aplicabilidad de este nuevo enfoque de monitoreo, los campos ambiental y alimenticio son abordados por medio de la selección de 4 muestras reales tomadas como modelo.

Entre las etapas de diseño, caracterización y obtención de modelos de calibración que conlleva esta propuesta destacan las siguientes:

- Fabricación de sensores. Para las aplicaciones cuantitativas se hará uso de biosensores enzimáticos e inmunosensores electroquímicos utilizando métodos de inmovilización basados en nanopartículas magnéticas, mientras que para las aplicaciones cualitativas se utilizarán arreglos de sensores voltamperométricos basados en *composites*.
- Diseño y desarrollo de nuevos sistemas de flujo que permiten operar de forma autónoma los nanomateriales involucrados en la inmovilización de bioreceptores, así como el resto de las operaciones del desarrollo experimental.

- Evaluación de la eficacia de nuevos modelos de calibración que permitan realizar la cuantificación de analitos específicos de forma selectiva y precisa aún en presencia de interferentes.
- Evaluación de la aplicación de técnicas de aprendizaje supervisado, para la obtención de nuevos modelos de clasificación que permitan discriminar características específicas asociadas a la calidad, estilo o procedencia entre un grupo de muestras.

La figura 3.1 muestra un diagrama de la solución propuesta para el desarrollo de sistemas de monitoreo integral en cada una de las muestras reales seleccionadas:

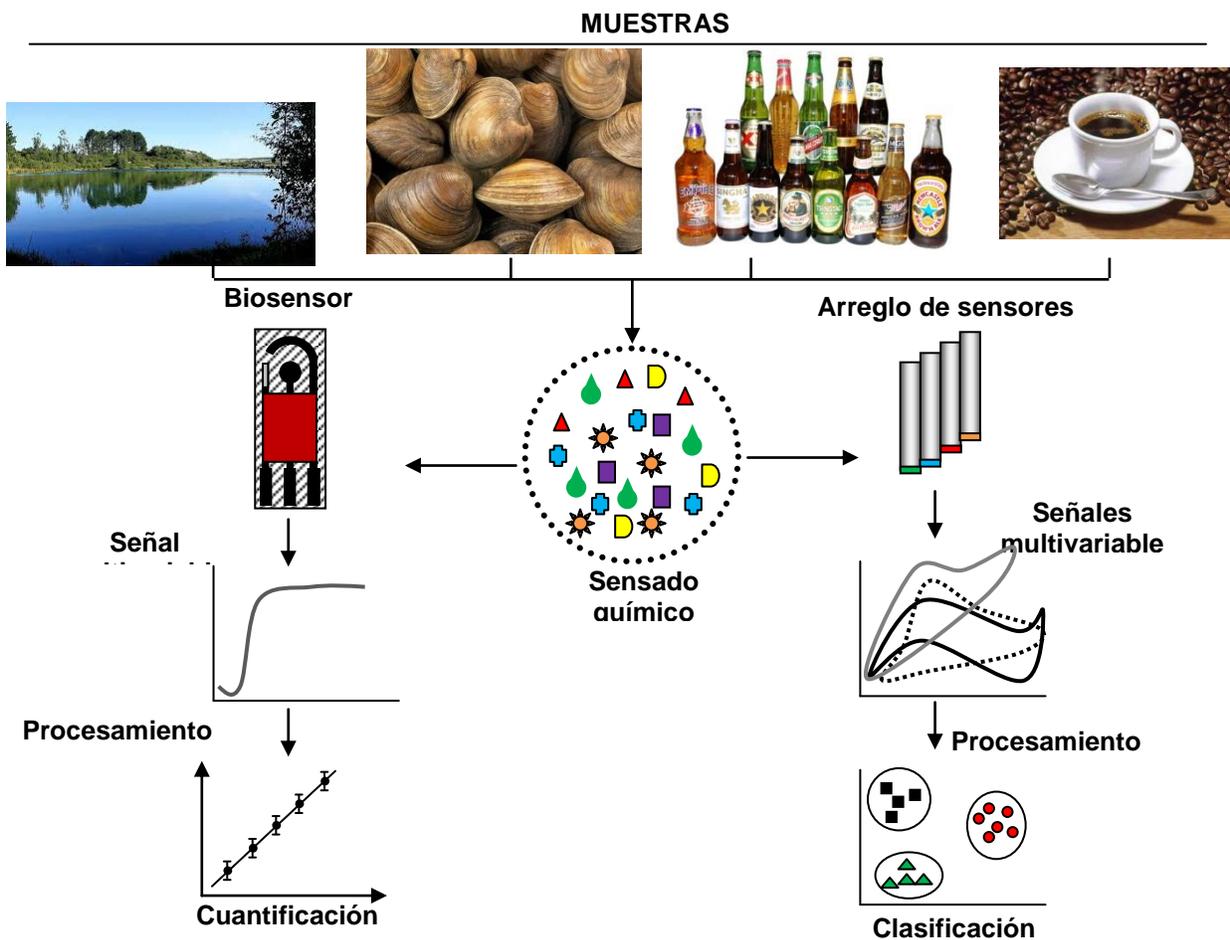


Figura 3.1 Diagrama esquemático de la solución propuesta en este trabajo

3.2 Determinación de pesticidas organofosforados con biosensores enzimáticos

Los pesticidas son compuestos producidos y aplicados por el hombre para el control de plagas. Pueden ser clasificados en base al grupo funcional presente en su estructura molecular (orgánicos, organonitrogenados, organofosforados, organoclorados) o en base a su acción biológica sobre especies específicas (insecticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, etc.)[42]. Desde su aparición en la segunda guerra mundial, su aplicación se ha incrementado exponencialmente debido al aumento de la población mundial y la necesidad de una producción sostenida de alimentos[43]. Sin embargo, está bien documentado que representan un riesgo inherente para la salud humana y al equilibrio ambiental en general, pues enfermedades como el cáncer, el mal de Parkinson y algunos desordenes reproductivos han asociados con la exposición prolongada a estos compuestos[44, 45].

Actualmente, existe un interés mundial por el monitoreo ambiental que se ha visto reflejado en la creación de nuevas políticas ambientales y en el desarrollo de avances tecnológicos enfocados a brindar información acerca del impacto que los pesticidas y otros contaminantes tienen en nuestro entorno.

Existen métodos instrumentales de evaluación dedicados a detectar la presencia de pesticidas en diferentes elementos, sobre todo aquellos de consumo humano o de importancia ambiental. Sin embargo, tal como se mencionó en la sección 2.1, los métodos instrumentales no resultan del todo adecuados para el monitoreo rápido y continuo y, en el caso de los pesticidas, esto ha generado que no se tengan datos ciertos acerca de la presencia de estos contaminantes en diferentes zonas[43]. Para subsanar esta problemática, se han propuesto diferentes herramientas de monitoreo auxiliar que permitan evaluar de manera rápida y precisa el riesgo de contaminación por pesticidas en diferentes entornos.

El uso de biosensores enzimáticos ha sido propuesto como una herramienta de monitoreo capaz de brindar información acerca de la presencia de ciertas familias de pesticidas,

concretamente los organofosforados y los carbamatos[2, 46]. Para ello, los biosensores enzimáticos utilizan la inhibición provocada por los pesticidas sobre la actividad catalítica de la enzima como método de detección. Por medio del registro de la actividad enzimática antes y después de la exposición a muestras de pesticidas de concentración conocida, es posible calibrar la respuesta del biosensor y cuantificar la presencia de pesticidas en muestras de concentración desconocidas[47]. La inhibición de la capa selectiva ocasiona que la mayoría de los biosensores sean concebidos como elementos desechables de un solo uso o que se utilice un reactivador de la actividad enzimática para iniciar una nueva detección.

Basada en las técnicas de flujo presentadas en la sección 2.3 y con el fin de crear una herramienta auxiliar para el análisis de pesticidas organofosforados, se diseñó y desarrolló una nueva configuración que permite renovar la capa receptora del biosensor por medio de la manipulación de los nanomateriales utilizados para la inmovilización de la enzima AChE. El sistema también permite automatizar las diferentes etapas del procedimiento experimental, realizar en línea la detección de las especies y desechar la capa biosensora una vez que se ha llevado a cabo la inhibición de la enzima. Para probar la eficacia del método se utilizó como analito modelo el compuesto Clorofirifos oxón, el cuál es un metabolito del insecticida Clorofirifos. Finalmente, con los datos obtenidos durante los experimentales, se desarrollaron dos modelos de calibración: uno de tipo univariable basado únicamente en el porcentaje de inhibición de la enzima sobre el biosensor y otro de tipo multivariable basado en los registros completos de medición.

3.2.2 Desarrollo

3.2.2.1 Fabricación del biosensor

Actualmente una tecnología popular en la fabricación de sensores destinados a la producción masiva es el serigrafiado. Para este método se utilizan diferentes tintas modificadas que permiten incorporar el electrodo de referencia, el electrodo auxiliar y el electrodo de trabajo en un solo dispositivo miniaturizado, que recibe el nombre de electrodo impreso serigrafiado o

screen printed electrode (SPE)[48]. Durante la fabricación del SPE, las tintas son depositadas en varias capas sobre un soporte plástico inerte siguiendo el proceso mostrado en la figura 3.2.

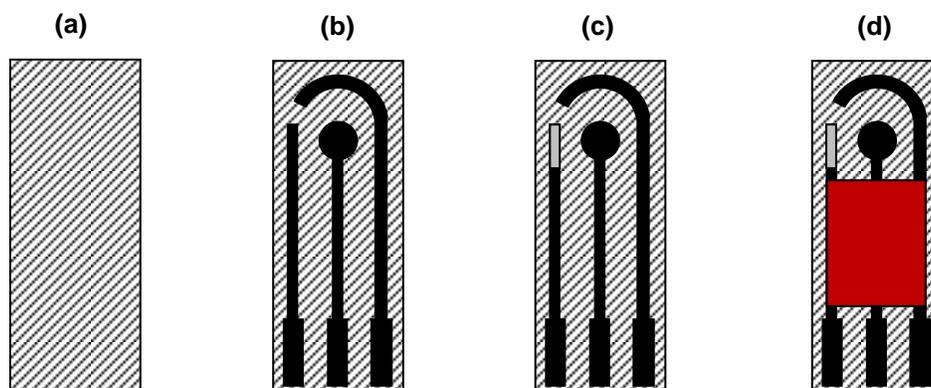


Figura 3.2 Orden secuencial de la elaboración de electrodos serigrafiados. (a) Soporte inerte de PVC (b) Capa de carbón para los transductores (c) Electrodo de referencia de Ag/AgCl (d) Capa aislante

Aunque con la incorporación de los SPEs y la reducción en la dimensión de los transductores se continúan utilizando los métodos de inmovilización de la sección 2.2.2.1, también se han investigado nuevas estrategias como el uso de micro y nanomateriales para la inmovilización de biorreceptores. Las propiedades de estos nuevos materiales han permitido modificar las características de interacción de ciertos biorreceptores para alcanzar nuevos niveles de sensibilidad y selectividad con cada dispositivo. En especial el uso de *beads* magnéticos y nanopartículas magnéticas ha encontrado un gran campo de aplicación en la inmovilización de enzimas y anticuerpos para la fabricación de biosensores enzimáticos e inmunosensores respectivamente[49, 50].

Los biosensores enzimáticos descritos en este apartado involucran la inmovilización de la enzima AChE sobre la superficie de un SPE utilizando partículas de dimensiones microscópicas o *beads* magnéticos. El objetivo de incorporar estas partículas magnéticas, es lograr mayor repetibilidad en el dispositivo final al controlar la cantidad de enzima inmovilizada que se deposita sobre cada electrodo de trabajo. De igual manera, se espera

obtener mayor sensibilidad al exponer la capa receptora directamente a la interacción con el analito.

Los biosensores descritos en esta sección se fabricaron utilizando la variedad B131 de la enzima AChE proveniente de la mosca de la fruta (*Drosophila Melanogaster*). La solución madre, de la cuál provienen todos los biosensores fabricados en esta aplicación, poseía una actividad de 1.25×10^{-2} UA medida espectrofotométricamente de acuerdo al método Ellman[51]. Para realizar la inmovilización, la AChE B131 fue modificada con un grupo histidina y se utilizó un enlace de afinidad metal chelato entre los *beads* magnéticos preactivados con Ni-IDA y el grupo funcional de la enzima[11].

El protocolo de inmovilización consistió en lavar $30 \mu\text{L}$ de *beads* magnéticos con 1 mL de tampón de enlace o *binding buffer*. Para manejar las soluciones sin que hubiese pérdida de *beads*, se utilizó un soporte magnético que retuvo las partículas mientras la solución líquida era desechada. A los *beads* se les agregaron $10 \mu\text{L}$ de la solución enzimática madre junto con $990 \mu\text{L}$ de tampón fosfato salino o *Phosphate Buffer Saline* (PBS) a un pH de 7.4; posteriormente todos los elementos fueron mezclados durante 2 horas en un agitador orbital.

Al finalizar las dos horas, los *beads* fueron lavados dos veces más con *binding buffer* para eliminar la enzima que no logró inmovilizarse. Los *beads* obtenidos por este protocolo contienen la enzima AChE B131 inmovilizada en su superficie y para todos los experimentales fueron conservados a temperatura ambiente (25°C).

Para fabricar los biosensores enzimáticos de forma manual, se debe aplicar $1 \mu\text{L}$ de los *beads* magnéticos preparados directamente sobre la superficie del electrodo de trabajo y distribuirlos uniformemente. Para retener magnéticamente esta capa selectiva, se fija previamente un pequeño imán de neodimio en la parte trasera del electrodo de trabajo. Los pasos de este protocolo de inmovilización se muestra esquemáticamente en la figura 3.3

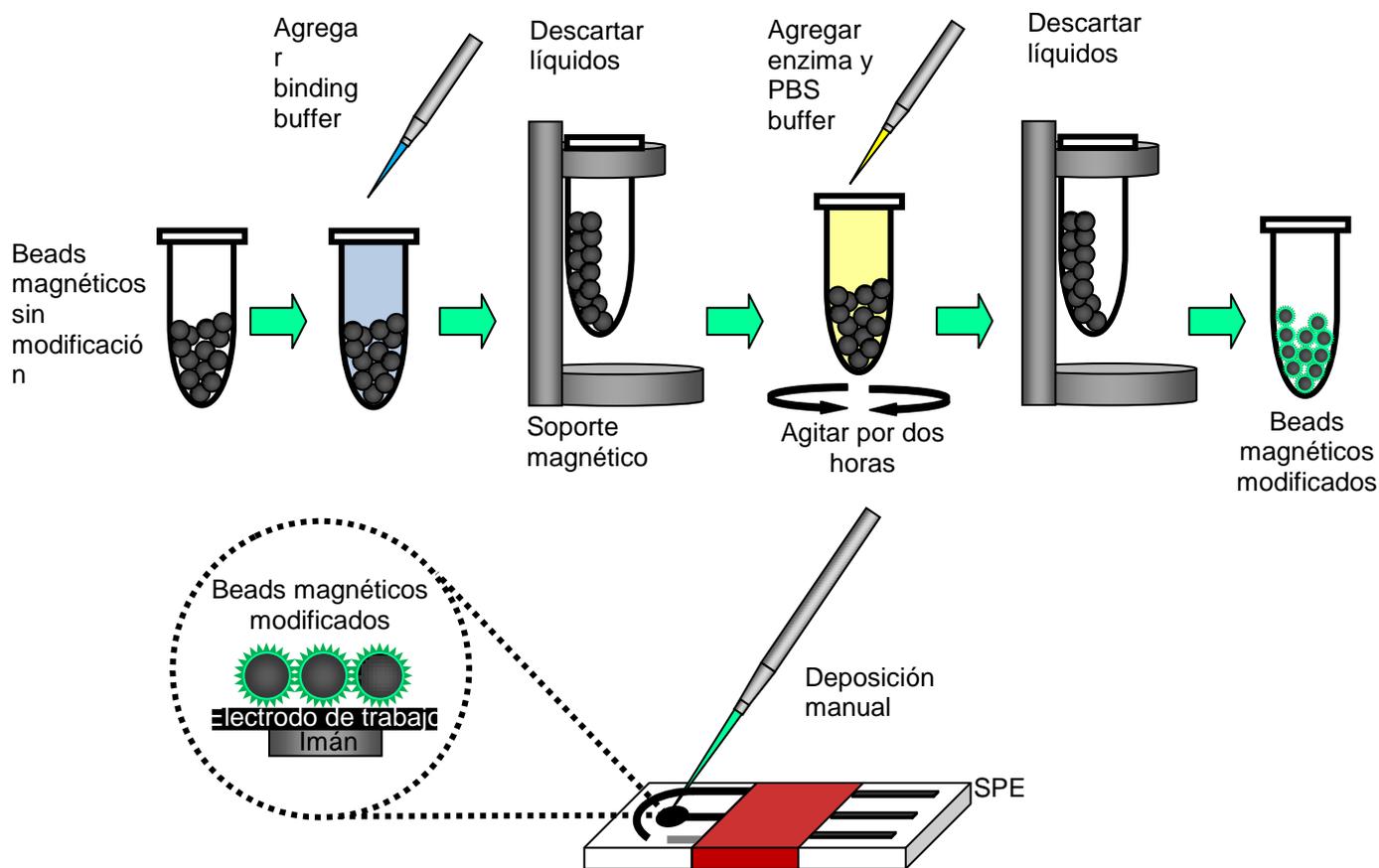


Figura 3.3 Descripción del protocolo para la inmovilización de la enzima AChE utilizando *beads* magnéticos y la fabricación manual del biosensor enzimático.

3.2.2.2 Desarrollo del sistema de flujo utilizando biosensores como método de detección.

Ya que uno de los objetivos de este trabajo es lograr un sistema de monitoreo autónomo, fue necesario desarrollar las herramientas necesarias para lograr la renovación de la capa selectiva una vez inhibida y el manejo automático de los reactivos involucrados en cada experimental. Para ello, se propuso una nueva configuración basada en las técnicas de flujo descritas en la sección 2.3. En esta aplicación se utilizó un dispositivo magnético en conjunto con un sistema de flujo para renovar automáticamente la superficie del electrodo de trabajo y controlar de esta forma la cantidad de enzima inmovilizada en cada operación. Con lo anterior, se pretende que

el sistema elimine la enzima una vez inhibida y la reemplace por una nueva capa selectiva antes de cada medición. Los detalles de implementación de este desarrollo tecnológico se proporcionan a lo largo de la siguiente sección.

Como se mencionó en la sección 2.3, los sistemas de inyección de flujo se han popularizado debido a la flexibilidad que ofrecen para automatizar tareas analíticas y a la facilidad para implementar experimentales con múltiples reactivos. En el caso de los biosensores, la miniaturización por medio de los métodos de serigrafiado ha permitido utilizar reactivos en cantidades menores de las que se utilizarían empleando algún otro transductor de mayor tamaño[32, 52].

Al incluir estos dispositivos como métodos de detección en sistemas de análisis en línea, es necesario garantizar el control de algunas variables como el manejo preciso del volumen de los reactivos y el tiempo de incubación de las muestras. En ese sentido, los sistemas basados en la técnica FIA presentan algunos inconvenientes como el tamaño de la tubería, el volumen empleado por cada muestra y el consumo constante de reactivos para mantener un flujo continuo en cada operación. Por lo anterior, para desarrollar el sistema de flujo para esta aplicación se basó parcialmente en la técnica SIA y se tomó en cuenta la miniaturización del detector y la disminución del volumen requerido para cada operación.

El sistema de flujo fue construido utilizando la bomba de jeringa Cavro XLP6000 (Tecan, USA) con capacidad máxima de 1 mL. Esta bomba funciona utilizando un pistón, cuyo movimiento genera la aspiración e inyección de líquidos. El movimiento ascendente corresponde a la inyección, mientras que el movimiento descendente corresponde a la aspiración de líquidos. La dirección del pistón y su velocidad son controladas por medio de un motor a pasos de alta precisión, lo que da lugar a una relación entre el número de pasos del motor y el volumen aspirado o inyectado por la jeringa.

Para establecer esta relación es necesario seleccionar la resolución de operación del motor, la cual determina el número máximo de pasos disponibles para cada movimiento. El modelo Cavro XLP6000 puede funcionar en dos resoluciones diferentes, identificadas como N1 o N2. En la resolución N1, que es la establecida como *default* por el fabricante, el motor puede alcanzar hasta 6000 pasos por cada movimiento; mientras que en la resolución N2 el motor puede dar hasta 24000 pasos proporcionando un movimiento más fino.

La relación entre pasos del motor, volumen aspirado o inyectado y volumen máximo de la jeringa puede obtenerse mediante la fórmula 3.1

$$\# \text{ de pasos} = \frac{\text{número de pasos máximos} \times \text{volumen deseado} (\mu\text{L})}{\text{volumen total de la jeringa} (\mu\text{L})}$$

Una vez calculado el número de pasos en relación al volumen deseado, es necesario contar con suficientes canales de entrada y salida para manejar el curso de los fluidos. Para ello, la jeringa está acoplada a una válvula giratoria de 6 puertos con un microcanal en común. Esto permite seleccionar entre 6 canales diferentes, que pueden ser configurados como entradas para la aspiración de reactivos o como salidas para la inyección de los mismos. Tanto el movimiento de la jeringa como la posición de la válvula pueden ser controlados utilizando el puerto RS232 de la computadora y las instrucciones de control mostradas en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Funciones utilizadas para implementar el control de la bomba de jeringa Cavro XLP 6000

Caracter	Función
/n	Número de identificación de la bomba, de manera preestablecida n=1
Z	Inicializa la válvula giratoria en el sentido de las manecillas del reloj
Y	Inicializa la válvula giratoria en el sentido opuesto de las manecillas del reloj
Nn	Resolución de la bomba, n puede tomar el valor de 1 o 2
In	Selecciona un canal n de la válvula como puerto de entrada, n puede tomar el valor entre 1 y 6
Sn	Controla la velocidad de movimiento del pistón y por lo tanto la velocidad

	de inyección y aspiración, n puede tomar un valor de 0 a 40.
Mn	Retardo en milisegundos, n puede tomar un valor de 1 a 5000.
Ax	Movimiento de aspiración, x se refiere al número de pasos que la jeringa va a aspirar. Si se opera en la resolución N1, entonces x tomar el valor de 6000 y si se opera en la resolución N2 x toma el valor de 24000.
Dx	Movimiento de inyección, x se refiere al número de pasos que la jeringa va a inyectar. Si se opera en la resolución N1, entonces x tomar el valor de 6000 y si se opera en la resolución N2 x toma el valor de 24000.
R	Parámetro que indica el fin de la cadena de caracteres

Para implementar el control de la bomba se utilizó el lenguaje de programación LabVIEW 8.5® (National Instruments, USA) y se creó un módulo de comunicación entre el puerto RS232 de la computadora y la terminal de control la bomba. Las diferentes operaciones fueron manejadas enviando una cadena de datos formada por los caracteres mostrados en la tabla 3.1. Por ejemplo, la cadena /I6S14A6000R puede interpretarse como, “la bomba 1 (/1) aspira por la válvula 6 (I6) a una velocidad de 14 (S14) un volumen de 1 mL (A6000)”.

Una de las ventajas de utilizar LabVIEW® es que su concepto de instrumento virtual permite expandir de manera modular diferentes tareas e integrarlas en una misma plataforma [37]. Lo anterior permitió el diseño un módulo dedicado para la adquisición de señales electroquímicas y su posterior integración con el módulo de control de la bomba. Para la medición en la celda electroquímica se utilizó el potencióstato TACUSSEL PGR-DEL (Tacussel, Francia), mientras que la digitalización se hizo por medio de la tarjeta de adquisición de 12 bits PMD-1208 (Measurement Computing, USA).

Esta tarjeta cuenta con 16 puertos digitales que pueden configurarse como entradas o salidas y un ADC compartido para 8 canales de entrada, de los cuales sólo se utilizó el primero. El ADC puede alcanzar frecuencias máximas de muestreo de 50kHz para un solo canal y 6.25 kHz si se activan los 8 canales al mismo tiempo; sin embargo dado que las señales amperométricas con que se trabajó en esta aplicación son lentas, la frecuencia de muestreo se fijo en 1 Hz[53].

Ya que la bomba de jeringa y la válvula giratoria se comunican por medio de un canal común, es posible que al inyectar o aspirar *beads* magnéticos algunos queden atrapados en el canal común y contaminen los reactivos involucrados en el experimental.

Para evitar esta contaminación, por medio de la tarjeta PMD-1208 se creó un control digital para la conmutación de un juego de cinco electroválvulas (NResearch, USA) que actuaron como canales de entrada adicionales e independientes a los 6 ya disponibles de la válvula giratoria. Con estos puertos auxiliares se creó una entrada especial únicamente para la aspiración de los *beads* magnéticos, mientras que el resto de los canales fueron reservados para la aspiración o inyección de reactivos.

Finalmente, para albergar al electrodo serigrafiado e incorporarlo como detector se utilizó una celda de flujo continuo con una cámara interna de 127 μL . La celda de flujo permitió el paso de los reactivos inyectados por la jeringa y el paso de los *beads* magnéticos hacia el electrodo de trabajo.

Para retener magnéticamente las partículas se utilizó un pequeño imán de neodimio acoplado al eje de un motor de DC. Esto se hizo con la finalidad de que el campo magnético no fuese estático sino giratorio, lo que afecta la distribución de los *beads* magnéticos sobre la superficie del electrodo de trabajo. El campo magnético giratorio ocasiona que los *beads* formen un *cluster* sobre el electrodo de trabajo evitando cortos circuitos entre el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar[54].

Para controlar el giro del motor, se incluyó un PWM en la interfaz final de control y se acopló por medio de uno de los puertos digitales de la tarjeta PMD-1208. El ensamble final del sistema, así como algunas de sus partes y la interfaz de usuario se muestran en la figura 3.4.

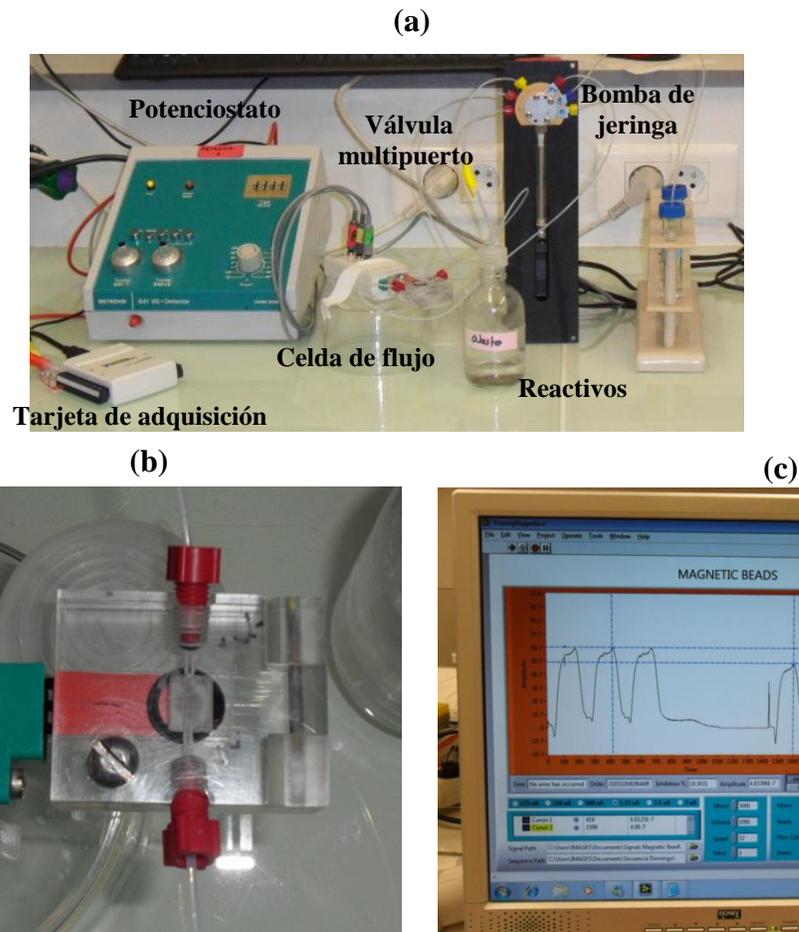


Figura 3.4 (a) sistema de flujo implementado (b) celda de flujo (c) interfaz gráfica de usuario

La interfaz mostrada en la figura 3.4 (c) permite operar al usuario de forma manual o automática. En el modo de operación manual, el usuario puede introducir por medio de los controles de la pantalla el volumen que desea aspirar o inyectar y el puerto de operación de la válvula por el cual se realizará esta operación. Esta opción de la interfaz fue utilizada para investigar los volúmenes óptimos de operación de cada reactivo utilizado durante el experimental. La interfaz también permite definir la velocidad de operación del pistón, lo que se empleó para probar el efecto que diferentes flujos tienen sobre el desempeño de los biosensores fabricados. Una vez obtenidos los parámetros finales, el usuario puede operar el sistema de forma automática almacenando las instrucciones en archivos de texto que contengan la secuencia experimental completa. La interfaz se encarga de cargar el archivo,

decodificarlo y enviar las instrucciones a cada dispositivo para ejecutar las tareas de forma autónoma. La operación del sistema se muestra en el diagrama de flujo de la figura 3.5.

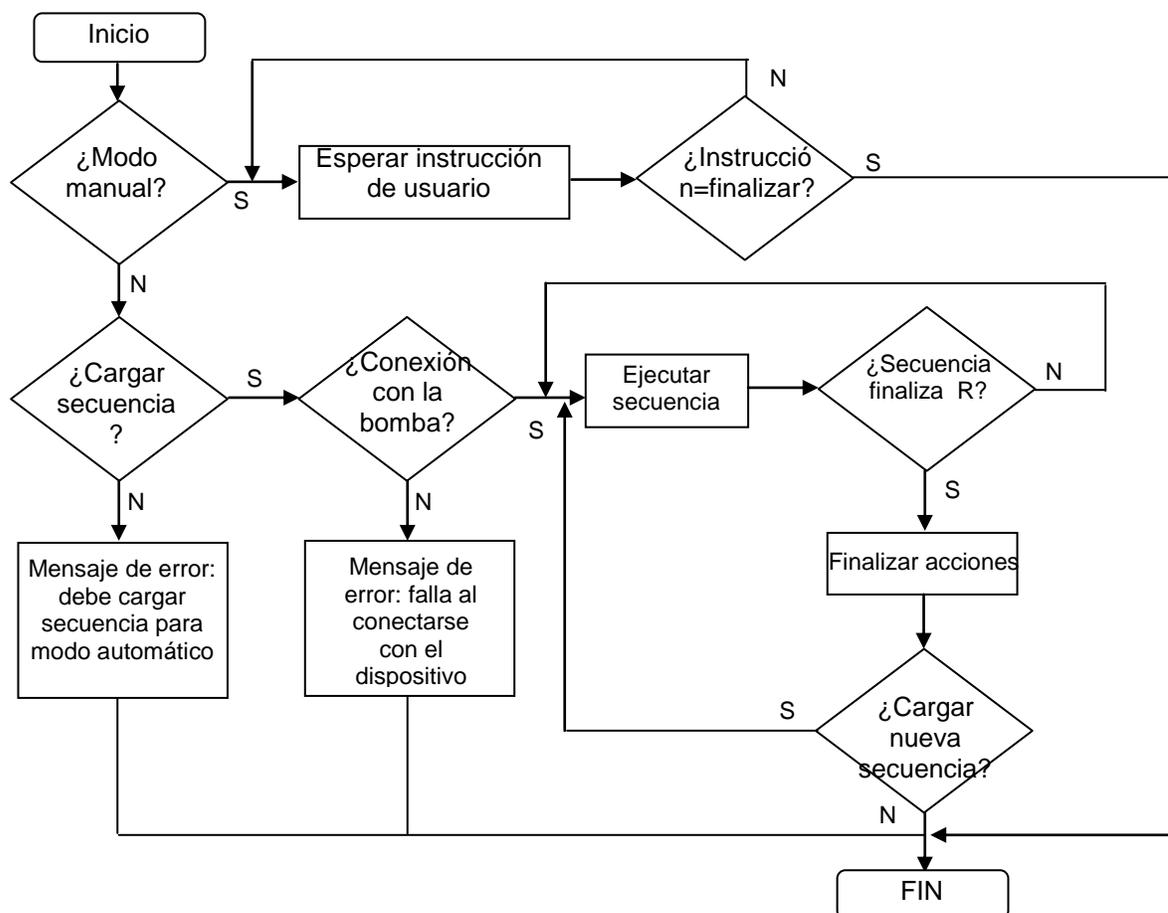


Figura 3.5 Diagrama de flujo de la operación de la interfaz de usuario desarrollada

3.2.2.3 Optimización de los parámetros del sistema de flujo para mediciones en línea

Una vez desarrollado el sistema de flujo, éste fue utilizado para implementar la fabricación automática de los biosensores por medio de la deposición de la capa bioreceptora y la medición en línea de pesticidas. Sin embargo previo a la medición fue necesario optimizar una serie de parámetros que repercuten en el desempeño de los biosensores fabricados por el sistema. Por ello, como punto de inicio para la parte experimental de este trabajo, se utilizaron los parámetros reportados por Istamboulie *et al* para la detección de CPO empleando biosensores fabricados manualmente con la enzima AChE B134 [11].

De acuerdo al procedimiento reportado por Istamboulie, se utilizó 1 μ L de *beads* magnéticos por cada biosensor fabricado manualmente. Para facilitar su manejo en el sistema de flujo, los *beads* fueron diluidos en 300 μ L (1/300) de buffer PBS y agitados durante 1 minuto para homogenizar la solución. Posteriormente fueron aspirados por el puerto 2 de las electroválvulas e inyectados hacia al electrodo de trabajo por medio de una inversión en el sentido del flujo. Una vez en la celda de flujo, el giro del imán fue activado a 50 R.P.M. para aglutinar las partículas sobre la superficie del electrodo de trabajo.

Una vez construido el biosensor, su actividad final fue probada inyectando un volumen de 500 μ L de sustrato ATCh-Cl a una concentración de 1mM y un flujo inicial de 100 μ L/min, que es la velocidad más baja proporcionada por la bomba en configuración N1. Este valor se tomo como punto de partida para estudiar la estabilidad del biosensor fabricado al operar en conjunto con el sistema de flujo. La velocidad de 100 μ L/min permitió realizar pruebas preliminares acerca de la cantidad óptima de *beads* necesaria para lograr una respuesta estable del biosensor, aún en condiciones de flujo continuo.

Para obtener la concentración óptima de *beads* magnéticos para la fabricación del biosensor, se probaron varias inyecciones de diferentes volúmenes provenientes de la solución original 1/300 y se registro por triplicado el valor de la actividad enzimática. Los volúmenes estudiados fueron 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L, 250 μ L y 300 μ L y su resultado en amplitud puede observarse en la figura 3.6. La inserción en la figura muestra la curva de calibración obtenida para este paso de la optimización. Como era de esperarse, a mayor volumen de *beads* magnéticos sobre la superficie del electrodo existe mayor amplitud en la respuesta; sin embargo, a pesar de que las pruebas se realizan bajo las mismas condiciones de flujo también puede observarse mayor desviación en las mediciones consecutivas con biosensores fabricados con mayor volumen de *beads*.

En este sentido, es importante recordar que uno de los parámetros más importantes a considerar en el sistema de monitoreo propuesto es la estabilidad del biosensor. Ya que el protocolo de detección se basa en la inhibición del CPO sobre la enzima AChE, se debe garantizar que la diferencia entre actividades es ocasionada por el efecto inhibitorio del

pesticida sobre la enzima y no por la remoción de los *beads* magnéticos durante las mediciones. Con las amplitudes y las desviaciones obtenidas para cada uno de los volúmenes mencionados, se seleccionó el biosensor fabricado con un volumen de 200 μL . Este dispositivo presentó una amplitud final de 659 nA y una desviación de 2.97% después de 3 repeticiones.

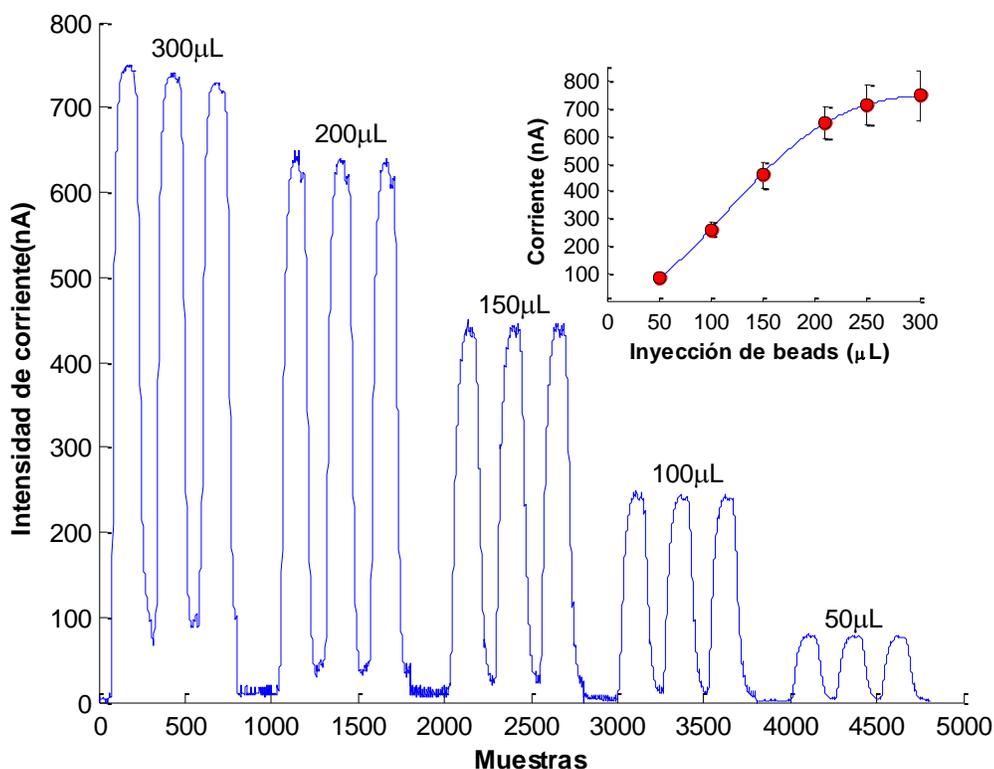


Figura 3.6 Efecto del volumen de *beads* magnéticos sobre la respuesta del biosensor fabricado

Posterior a la selección del volumen, se investigó el efecto que diferentes flujos tienen sobre la respuesta final del biosensor. Al aumentar el flujo deben cuidarse dos efectos importantes: por un lado un flujo mayor podría ocasionar remoción de *beads* en la capa selectiva ocasionando un desempeño pobre en la estabilidad del biosensor. Por otro lado, una velocidad mayor disminuye el tiempo de interacción entre la capa selectiva y el sustrato, y por consecuencia hay una disminución en la amplitud de la respuesta.

Para obtener el flujo óptimo, se tomó en cuenta la desviación obtenida después de seis repeticiones consecutivas de la respuesta del sensor así como la amplitud mostrada en cada

flujo seleccionado. Los resultados de caracterizar la respuesta del biosensor entre los flujos comprendidos entre 100 μ L/min y 600 μ L/min se muestran en la figura 3.7.

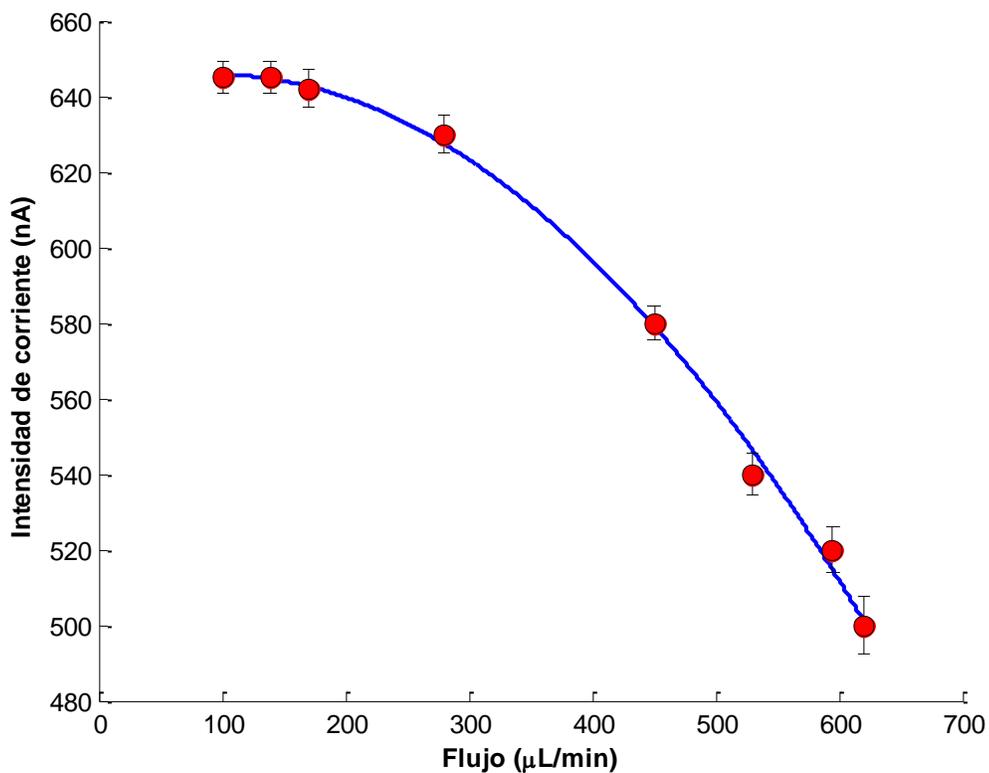


Figura 3.7 Efecto del flujo sobre la respuesta del biosensor fabricado

En base a la curva anterior se seleccionó el flujo de 300 μ L/min, con lo que, para el biosensor fabricado se obtuvo una amplitud final promedio de 637 nA y una desviación de 4.78% después de 6 repeticiones. Con los resultados obtenidos durante la caracterización, se diseñó un protocolo de operación en flujo continuo que consistió en realizar de forma automática la inyección de *beads* magnéticos para fabricar el biosensor, probar la actividad y estabilidad del biosensor fabricado, incubar una muestra contaminada con CPO y registrar la actividad remanente en el biosensor para determinar el grado de inhibición.

3.2.2.4 Mediciones en línea de pesticidas organofosforados en muestras sintéticas y muestras reales.

Una vez que los parámetros de operación del sistema de flujo fueron caracterizados, se prepararon una serie de muestras patrón para construir una curva de calibración que permitiera cuantificar la presencia de CPO en muestras desconocidas. Al no ser esta un aplicación de cuantificación multianalito no se incluyó el diseño factorial, ya que el universo de concentraciones que se desea cuantificar se reduce a un solo elemento. Las muestras patrón fueron preparadas en un rango de concentración de 1×10^{-6} a 1×10^{-11} M de CPO, partiendo de una solución madre de CPO de 1×10^{-3} M. Los parámetros utilizados en el sistema de flujo para el registro de la actividad se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Parámetros experimentales para la medición en línea de CPO

Elemento	Valor/ Concentración	Volumen	Flujo
Potencial	+100 mV	--	--
Sustrato	1 mM	500 μ L	300 μ L/min
Buffer	1mM	500 μ L	300 μ L/min
CPO	1×10^{-6} a 1×10^{-11}	900 μ L	90 μ L/min*
Tiempo de incubación	10 min	--	--

*Utilizando resolución N2

La figura 3.8 muestra de manera gráfica el protocolo experimental realizado por el sistema de flujo para la medición en línea de CPO. En la primera parte de la figura 3.8, puede apreciarse primero la actividad nula del electrodo cuando carece de *beads* magnéticos en su superficie, posteriormente el momento de la inyección de los *beads* junto con la respuesta que esto genera y finalmente el período de incubación de la muestra con el decremento en la actividad que ocasiona la exposición de la enzima al CPO.

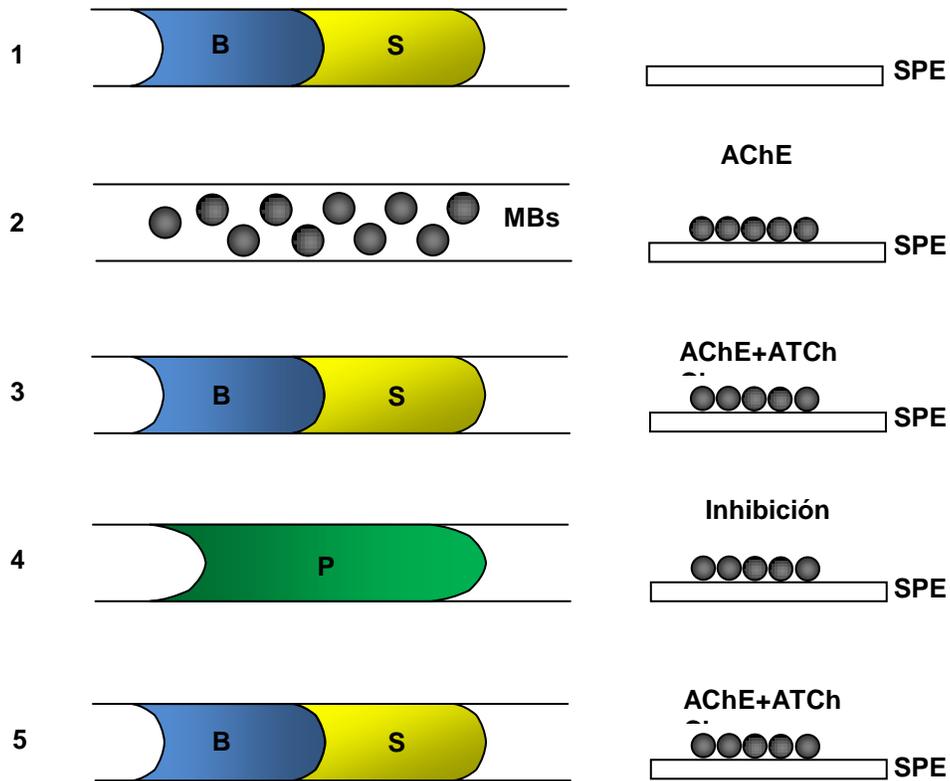


Figura 3.8 Protocolo experimental para la detección en línea de CPO

Con cada concentración de CPO analizada se utilizó una secuencia como la mostrada en la figura 3.8. Finalmente, para corroborar la efectividad del sistema en la detección con muestras reales, el buffer PBS se sustituyó por agua proveniente del lago Villeneuve de la Raho, Francia (42° 38' 15'' N 2° 55' 05'' E) y se prepararon muestras dopadas con CPO en un rango de concentración de 1×10^{-8} a 1×10^{-10} M.

3.3 Determinación de ácido okadaico empleando inmunosensores

El ácido okadaico (AO) es una biotoxina marina lipofílica producida por los dinoflagelados *Dinophysis* y *Prorocentrum Dinoflagellates*[55]. En los humanos la toxina se ingiere a través del consumo de mariscos, como los moluscos bivalvos, que han sido contaminados. Aunque se tiene documentado que el consumo de alimentos contaminados con AO induce el

envenenamiento diarreico por mariscos, existen estudios que sugieren también sus efectos cancerígenos e inmunotóxicos. Debido a lo anterior, el problema de la contaminación en mariscos se ha convertido en un asunto de suma importancia para la industria pesquera mundial. Por ello, la comisión europea estableció un límite máximo permisible de 160 μg de ácido okadaico por cada kilogramo de moluscos, mientras que en México el límite es de 0.2 mg de ácido okadaico por cada kilogramo de molusco[56, 57].

Anteriormente, el método para la detección del el AO en moluscos era el bioensayo en ratones[58]. Aunque en Estados Unidos aún se utiliza este método, en Europa fue prohibido a partir del 1 de Enero de 2012 debido a los problemas éticos que conlleva su práctica y a la pobre selectividad y precisión que presentaba. Actualmente para llevar a cabo la detección de esta biotoxina, se aplican técnicas como la cromatografía de líquidos acoplada a fluorescencia (LC-FLD) y la cromatografía de líquidos junto con la espectroscopia de masas (LC-MS) [55]. A pesar de la robustez y alta selectividad de estos métodos instrumentales, se trata de equipos costosos que consumen una gran cantidad de tiempo por muestra y que requieren de personal especializado para ser operados. Por ello, paralelamente se han desarrollado métodos de detección basados en biosensores e inmunosensores electroquímicos para actuar como herramientas auxiliares en la detección de AO. De los anteriores, los inmunosensores constituyen una herramienta promisoría en el campo de la detección y cuantificación, ya que presentan grandes ventajas en términos de sensibilidad, afinidad, costo efectivo, fácil manejo y la posibilidad de miniaturización.

Para esta aplicación, se propuso desarrollar una herramienta que permitiera implementar el inmunosensor desarrollado por Hayat *et al* en un sistema de monitoreo en línea para la detección de AO[57]. La instrumentación presentada en la sección anterior fue utilizada tanto para implementar un inmunosensor en formato competitivo indirecto, como para lograr el manejo automático de los reactivos y muestras involucrados en la parte experimental. A diferencia de lo ocurrido con el pesticida, la detección de AO no está basada en la inhibición del bioreceptor sino en la conjugación de dos bloques antígeno y anticuerpo, que al ser incubados por un período de tiempo establecido forman complejos detectables.

Para inmovilizar los bloques en la superficie del SPE, se utilizaron nanopartículas magnéticas que fueron totalmente manejadas por el sistema. La implementación del inmunosensor conlleva un mayor número de pasos que la detección enzimática de la sección anterior y, aunque en esta aplicación no es importante la renovación de la superficie, sí lo es la dosificación controlada de la capa biosensora y la incubación de los anticuerpos utilizados. Por tanto, se realizaron algunas modificaciones en la configuración del sistema enfocadas en garantizar la repetibilidad del inmunosensor y la estabilidad de la actividad registrada.

El instrumento desarrollado se utilizó para implementar la detección de AO en muestras de buffer y muestras de moluscos; así mismo, con las señales obtenidas por el sistema se propusieron dos modelos de calibración para la cuantificación de AO en muestras reales, uno basado en la respuesta univariable y otro basado en procesamiento multivariable. Con lo anterior, se espera obtener una herramienta auxiliar de fácil manejo y que pueda ser aplicado al análisis en línea de otros analitos modelo que requieran su detección por medio de inmunosensores.

3.3.1 Desarrollo

3.3.1.1 Inmunoensayo para la detección de ácido okadaico

Para realizar la detección de AO se utilizó un inmunoensayo competitivo indirecto o de dos pasos que funciona bajo los mismos principios expuestos en la sección 2.2.2.2. El principio de detección consiste en utilizar al AO como un antígeno e inmovilizarlo en la superficie del electrodo de trabajo por medio de nanopartículas magnéticas. Posteriormente se hace uso de dos anticuerpos, el primero de ellos específico para el AO y el segundo marcado con una enzima que facilita la detección de complejos ácido okadaico-anticuerpo (AO-AC) formados. Para iniciar con el inmunoensayo, la primera prueba se realiza utilizando una alta concentración de AO, lo que garantiza mayor formación de complejos AO-AC y por ende la aparición de la señal generada por la actividad enzimática. A esta operación, que establece la concentración máxima se le llama prueba o *test*.

Para verificar la validez del *test* se realiza una segunda operación en donde se utilizan nanopartículas magnéticas sin AO inmovilizado en su superficie. Debido a la falta de AO inmovilizado, no debería existir formación de complejos OA-AC y al momento de verificar la actividad enzimática esta debería ser nula; sin embargo debido al fenómeno de absorción no específica siempre se registra una pequeña actividad que se considera una especie de línea basal. Finalmente, para que el inmunoensayo sea válido, el valor del control debe ser mucho menor que el valor del *test*.

Para conocer el rango de trabajo del inmunosensor, la presencia de AO se cuantifica utilizando una muestra “libre”, es decir, se utiliza una muestra que contenga AO que no esté inmovilizado. Durante la detección, el AO inmovilizado en las nanopartículas magnéticas y el AO libre en la muestra “compiten” por enlazarse con el primer anticuerpo (AC1). Esta competencia se realiza durante un período de incubación de 30 minutos. Posteriormente se realiza un lavado que remueve aquellos complejos AO-AC1 que no estén inmovilizados, por lo que teóricamente todos los complejos AO-AC1 formados con el AO de la muestra libre deberían eliminarse y sólo los complejos AO-AC1 formados con el AO inmovilizado sobre la superficie de las nanopartículas deberían permanecer.

A continuación se incuba un segundo anticuerpo (AC2) marcado con la enzima alcalina fosfatasa para revelar la cantidad de complejos AO-AC1 formados durante la incubación. Debido a la competencia entre el AO inmovilizado y el AO en la muestra libre, la formación de complejos OA-AC1 inmovilizados se verá disminuida, por lo que la actividad enzimática y será menor que la obtenidas al realizar el *test*. Para obtener una curva de calibración, se sigue el procedimiento descrito introduciendo muestras libres de AO de concentración conocida y registrando el decremento en la actividad enzimática. El diagrama de la figura 3.9 muestra de forma esquemática los pasos llevados a cabo para realizar este inmunoensayo competitivo.

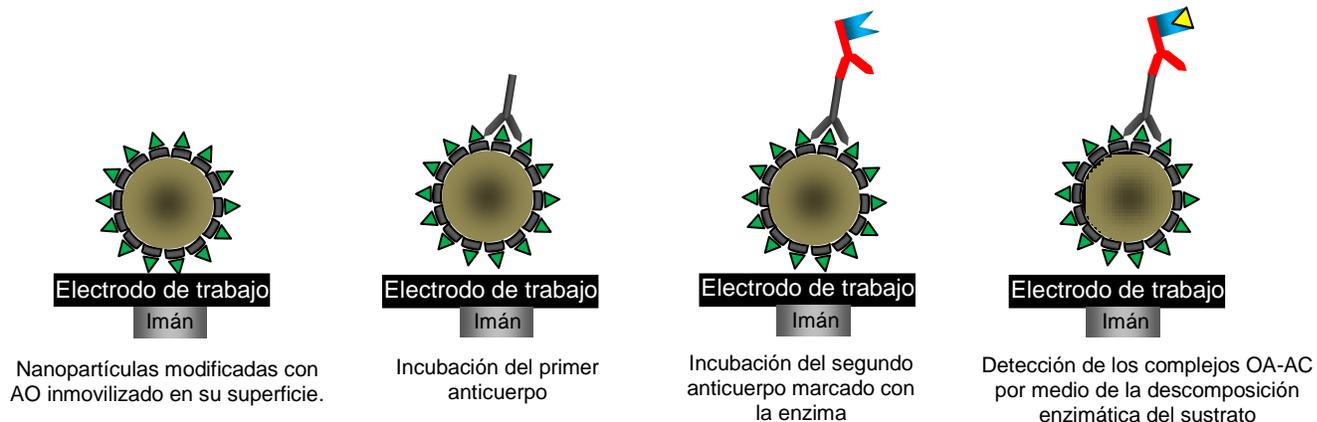


Figura 3.9 Diagrama esquemático del inmunoensayo competitivo indirecto para la detección de AO.

3.3.1.2 Desarrollo del sistema de flujo utilizando inmunosensores como método de detección.

Al igual que el sistema de detección de pesticidas, el sistema de flujo para la detección de OA debe encargarse de la inyección de las nanopartículas modificadas sobre la superficie del electrodo de trabajo y de realizar de forma automática la dispensación de reactivos y la incubación de muestras. El sistema final se muestra de forma esquemática en la figura 3.10 y está basado en el sistema de flujo presentado en la sección anterior, aunque con algunas diferencias fundamentales.

La primera mostrada en la figura 3.10 consiste en colocar la celda de flujo entre el holding coil (HC) y las electroválvulas a fin de disminuir el volumen de reactivos utilizados. Ya que los anticuerpos son muy sensibles al medio exterior, un volumen menor no sólo disminuye el coste total del inmunoensayo sino que también asegura una permanencia menor de los reactivos en el sistema.

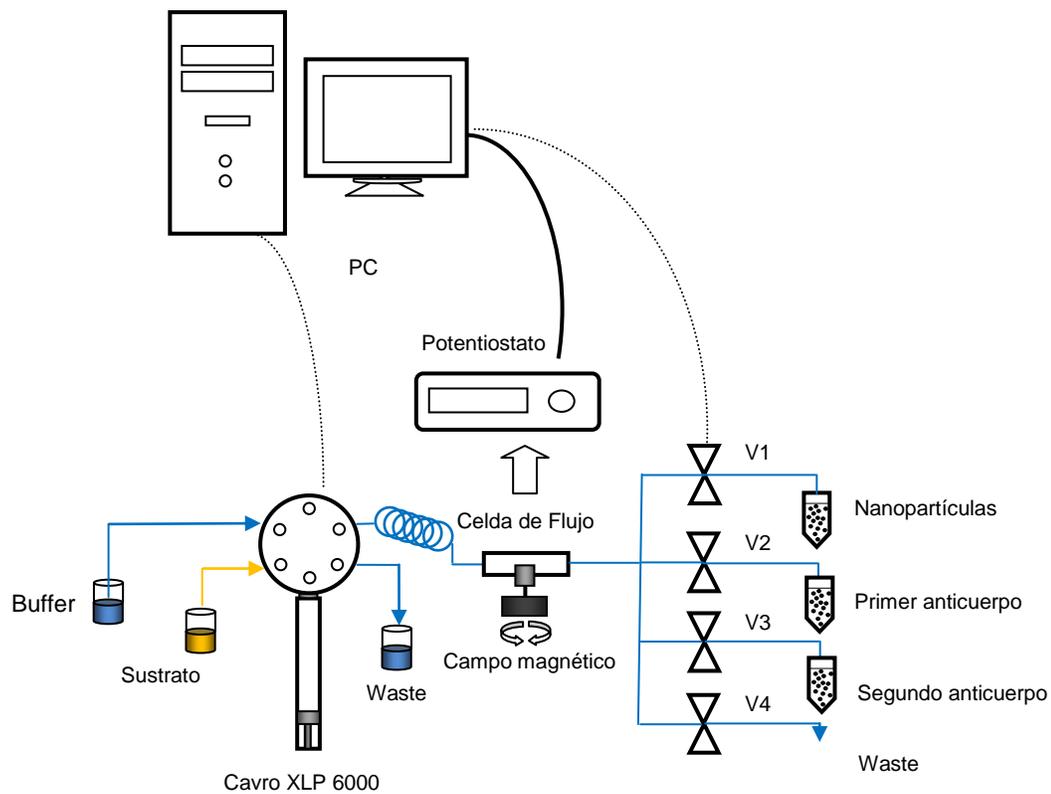


Figura 3.10 Sistema de flujo desarrollado para la detección en línea de OA

La segunda modificación consiste en aspirar las nanopartículas magnéticas y los reactivos utilizados para la fabricación de inmunosensor por medio del arreglo adicional de electroválvulas y no de la válvula multipuerto. Durante la optimización del sistema, se observó que los anticuerpos presentaron mayor adherencia a las paredes de la válvula multipuerto ocasionando contaminación entre las muestras. Esto tiene que ver con la gran absorción no específica que presentó el cuerpo de la válvula multipuerto, a diferencia del cuerpo de las electroválvulas (hecho de Teflón) que presentó una mínima absorción.

Además de la reconfiguración en el *manifold* se utilizó la resolución N2 del motor a pasos de la bomba de jeringa. Lo anterior se hizo con el fin de emular los tiempos de incubación necesarios para la interacción del antígeno y los anticuerpos, que son mayores al tiempo de incubación manejado para la detección de pesticidas. Finalmente, tanto el campo magnético giratorio, el manejo de la interfaz de usuario, la fase de adquisición y el control por medio de caracteres se conservaron sin cambio.

3.3.1.3 Optimización del protocolo de flujo

Una vez optimizado el sistema se diseñó un protocolo en flujo para la detección de AO partiendo del trabajo reportado por Hayat *et al*[57]. Como soporte para la inmovilización del AO se utilizaron las nanopartículas magnéticas (NPs) Dynabeads My One Streptavidin C1 ($\phi=1\mu\text{m}$), las cuales están cubiertas de estreptavidina. Para realizar la inmovilización, se utilizó la gran afinidad que existe entre la estreptavidina y la biotina, por lo que el OA fue biotilado. De la interacción entre el OA biotilado y la estreptavidina se obtuvieron NPs modificadas, que fueron retenidas en la superficie del electrodo de trabajo utilizando la misma celda descrita en la sección 3.1.2.2.

Para integrar las NPs al sistema, se tomaron $3\mu\text{L}$ y se disolvieron en $300\mu\text{L}$ de buffer PBS (1x) a un pH de 7.4. Esta mezcla se inyectó hacia la celda de trabajo a un flujo de $0.20\mu\text{L/s}$. Una vez que las NP fueron enviadas a la superficie del electrodo de trabajo, el sistema realizó la inyección de $150\mu\text{L}$ del primer anticuerpo (AntiOA) en dilución 1/1000 a un flujo de $0.33\mu\text{L/s}$. Una vez en la celda, se inició el período de incubación de 30 minutos durante el cual se formaron los complejos OA-AntiOA. Pasado este tiempo, el sistema inyectó a la celda de flujo $150\mu\text{L}$ del segundo anticuerpo (IgG) marcado con la enzima fosfatasa alcalina (FAL) a una dilución de 1/2500 y un flujo de $0.33\mu\text{L/s}$; en este paso el segundo anticuerpo marcado se enlaza con el primero, que a su vez está enlazado con el AO inmovilizado en la superficie del electrodo gracias a la acción del campo magnético.

Pasados los 30 minutos de incubación, el sistema inyectó $500\mu\text{L}$ de una solución de sustrato 1-Naftil fosfato a un flujo de $1.6\mu\text{L/s}$ para verificar la actividad final de la enzima enlazada a los complejos formados durante todo el proceso descrito. La actividad enzimática fue registrada amperométricamente al aplicar un potencial constante de 200 mV contra el pseudoelectrodo de Ag/AgCl, a diferencia del trabajo original de Hayat en donde se utilizó voltamperometría diferencial de impulsos. Finalmente, cabe aclarar que entre cada etapa de incubación del proceso, el sistema realizó un lavado con $500\mu\text{L}$ de buffer PBS Tween 0.5% a un flujo de $0.83\mu\text{L/s}$. Los datos finales de volumen, flujo y diluciones utilizados para la fabricación del inmunosensor y la dispensación de los reactivos en flujo se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Parámetros finales del inmunoensayo en flujo para la detección de AO

Elemento	Dilución	Volumen	Flujo
Anti-OAMab	1/1000	150 μL	0.83 $\mu\text{L s}^{-1}$
IgG-ALP	1/2500	150 μL	0.83 $\mu\text{L s}^{-1}$
Enzyme substrate	1/40	500 μL	1.6 $\mu\text{L s}^{-1}$
Bead injection	1/200	200 μL	0.20 $\mu\text{L/s}$
Buffer (1x) Tween	--	150 μL	0.83 $\mu\text{L/s}$

3.3.1.4 Mediciones en línea de ácido okadaico.

Para realizar el control se respetaron los volúmenes y flujos descritos anteriormente, pero utilizando NPs sin AO inmovilizado en su superficie. Los datos de calibración se obtuvieron al procesar con el sistema diferentes diluciones de AO en buffer PBS (1x), en concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.25, 0.78, 0.19 y 0.1 $\mu\text{g/Kg}$. En cada caso las concentraciones fueron medidas por triplicado y se realizó un test y un control para cada una concentración. Finalmente, se procesaron 2 muestras de moluscos dopadas con OA en concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/Kg}$, para evaluar la precisión del sistema con muestras reales.

3.4. Análisis de muestras de café utilizando lenguas electrónicas voltamperométricas

La planta de café o cafeto es un arbusto que pertenece al género *Coffea* de la familia de los rubiáceos[59]. Esta familia agrupa alrededor de 500 géneros y más de 6000 especies, pero los frutos del cafeto son los más importantes a nivel comercial. Las dos variedades económicamente importantes dentro de las especies del cafeto son la *coffea arábica* y la *coffea canephora* o *robusta*, sin embargo la primera se comercializa mayormente en el mercado y la segunda se cultiva en menor medida. En el año 2010, la industria internacional del café reportó ventas de alrededor de 16.5 billones de dólares equivalentes a 5.8 millones de toneladas de café procesadas, haciendo del café el segundo consumible más importante del mundo sólo por detrás del petróleo [59]. La Organización Internacional de Café (ICO) estima

que el mundo existen alrededor de 70 países productores de café, dentro de los cuáles México ocupó el séptimo lugar en producción a nivel internacional en el ciclo de cultivo 2012[60].

En México el café se cultiva principalmente en 12 estados: Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Colima, Jalisco, Querétaro y Tabasco. La época de recolección del café inicia en el mes de septiembre y concluye en el mes de marzo del siguiente año. La variedad que predomina en el mercado mexicano es la *coffea arabica*, y para llevar un control de calidad se ha establecido un sistema de clasificación basado en la altura de los cultivos para diferenciar entre granos provenientes de diferentes entornos ambientales. Esta clasificación, que es reconocida internacionalmente por la ICO y nacionalmente por la norma mexicana NMX-F-551-SCFI-2008, se muestra en la tabla 3.4[61].

Tabla 3.4 Clasificación de los granos de café de acuerdo a la norma mexicana.

Clasificación grano de café	Altura (m.s.n.m*)
Estrictamente Altura	>1200
Altura	>900-1200
Extra Prima Lavado	800-900
Prima Lavado	600-800
Buen Lavado	250 a 600

*metros sobre el nivel del mar

Además de las consideraciones con respecto a la altura del cultivo, en los años 80 se introdujeron en el país las prácticas orgánicas en el cultivo del café. Este tipo de cultivo permite conservar el equilibrio ecológico de la zona, pues se encuentra libre de contaminantes y se basa en el aprovechamiento y reutilización de los desechos agrícolas.

La importancia del comercio cafetalero en el país y en el mundo ha derivado en la creación de normas y estrictos controles para garantizar la calidad del producto final que llega a los consumidores. En este sentido, México cuenta con dos denominaciones de origen (DO) avaladas por el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual para los granos cultivados en los estados de Veracruz y Chiapas[62, 63]. Las normas aprobadas a nivel nacional e internacional establecen procedimientos y métodos de referencia para la evaluación sensorial

de los granos de café. Sin embargo, la complejidad que existe en esta muestra derivado del gran número de sustancias presentes de manera simultánea ha generado un gran campo de investigación para este producto alimenticio.

Aunque la sustancia más estudiada ha sido la cafeína, en el café existen además polifenoles, proteínas, minerales, azúcares, carbohidratos y otros componentes [64]. Diferentes autores han hecho uso la presencia de estas sustancias como marcadores para determinar características como el origen geográfico del café o la variedad botánica, también se han utilizado como métodos de autenticación o como un medio para diferenciar entre granos con diferentes condiciones de cultivo[65-67]. Para obtener la información química, los métodos más reportados fueron espectroscopía de infrarrojo cercano, cromatografía de gases y cromatografía líquida, espectroscopía de emisión y absorción atómica, análisis instrumental de activación de neutrones y espectrometría de emisión óptica entre otros[64, 68].

El objetivo de esta aplicación es hacer uso de las lenguas electrónicas como clasificador de un conjunto de muestras de café recolectadas en diferentes estados de la república. Se espera que por medio del análisis electroquímico de las muestras y el procesamiento de datos multivariable puedan establecerse diferencias entre los grupos presentes en el conjunto de muestras. Son de particular interés las diferencias entre el origen geográfico de los granos y los métodos de cultivo. Con lo anterior se busca obtener una nueva herramienta de análisis simplificado que, sin hace uso de un exhaustivo análisis intrumental de laboratorio, permita discriminar entre características de interés (como el origen geográfico o las condiciones de cultivo) presentes en las muestras seleccionadas.

3.4.1 Desarrollo.

3.4.1.1 Fabricación de sensores.

Los electrodos utilizados en las técnicas voltamperométricas generalmente están basados en conductores puros con una superficie modificada física o químicamente que proporciona cierto grado de selectividad. La incorporación de nanomateriales, no sólo en la superficie del

electrodo sino en la composición del transductor, ha hecho posible el desarrollo de materiales llamados *composites* que presentan nuevas y mejores características con respecto a los electrodos de conductores puros. Entre las ventajas de estos quimiosensores se encuentran un límite de detección más bajo, una mejor relación señal a ruido y la posibilidad de renovar la superficie de contacto simplemente con pulirla. Para el desarrollo de este trabajo se fabricaron 6 sensores voltamperométricos, uno de Grafito Epoxy (GE) y 5 modificados. El quimiosensor GE está compuesto únicamente por un transductor fabricado con grafito, resina epóxica y endurecedor Epo-teck H77 en una proporción 100:15, mientras que para fabricar el *composite* de los quimiosensores modificados se emplearon nanopartículas de platino, nanopartículas de oro, ftalocianina de cobre, así como los polímeros conductores polipirrol y polianilina. El peso del resto de los materiales se calculó tomando en cuenta la proporción mostrada en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Proporción para la fabricación de quimiosensores voltamperométricos

Elemento	Quimiosensor GE	Quimiosensor Modificado
Grafito	15%	15%
Epoxy	85%	75%
Catalizador	--	10 %

Para la construcción de los electrodos, los cuerpos se fabricaron utilizando tubos de PVC de 6 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y 20 mm de longitud. Para crear el contacto eléctrico se utilizó una placa de cobre de 5 mm de diámetro y 0.4 mm de espesor soldada a un conector hembra de 2 mm de diámetro. Este contacto eléctrico es introducido a presión en el tubo de PVC dejando una cavidad de aproximadamente 4 mm que se utilizará para depositar el *composite*.

Para fabricar cada quimiosensor se debe considerar que se utilizarán 0.4 g de *composite* por cada electrodo que se desee construir, y en base a los porcentajes de la tabla 3.5 se debe calcular la contribución de cada elemento (grafito, modificadores y resina). En el caso de los sensores fabricados las proporciones calculadas se muestra en la tabla 3.6

Tabla 3.6. Peso calculado para la fabricación de una camada de 5 sensores

Sensor	Grafito (g)	Resina (g)	Endurecedor (g)	Catalizador* (g)
GE	0.18	0.887	0.133	--
Modificado	0.24	1.043	0.157	0.16

*Cada uno de los modificadores utilizados

Una vez pesados, los componentes se mezclan hasta lograr una pasta homogénea que se deposita en la cavidad del tubo de PVC ejerciendo presión entre la pasta y la placa del conector para asegurar el mayor contacto eléctrico. Ya preparados, los quimiosensores son curados a 60°C durante 7 días en un horno de convección. Pasado este tiempo el material se ha solidificado y es posible retirar el exceso de *composite* con papel de lija hasta obtener una superficie plana. Posteriormente esta superficie debe pulirse nuevamente hasta lograr una superficie de trabajo totalmente lisa y especular. El procedimiento de fabricación se muestra de forma esquemática en la figura 3.11.

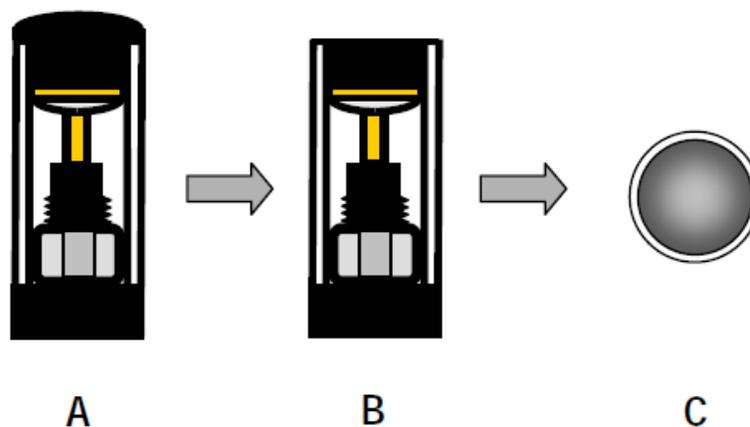


Figura 3.11 Etapas de fabricación de un quimiosensor voltamperométrico. (A) Tubo de PVC (b) Conector hembra con placa de cobre (c) *Composite* depositado dentro del tubo (d) *Composite* lijado para eliminar excedentes (e) Superficie de trabajo

3.4.1.2 Selección de muestras.

Se analizaron 31 muestras de café provenientes de las principales regiones cafetaleras de México. Del total de muestras, el número mayor proviene de los estados de Veracruz y Chiapas por contar con una certificación de DO. Las muestras fueron adquiridas directamente en el lugar de origen, por lo que los granos fueron preparados de acuerdo a los procedimientos de molido y envasado de los proveedores locales. La tabla 3.6 muestra las características de las 31 muestras analizadas y su clasificación de acuerdo al sistema mostrado en la tabla 3.4. Dentro de las muestras analizadas, 20 provienen de Veracruz, 7 son de Chiapas, 2 son de Oaxaca y 2 son mezclas de granos provenientes de estos tres estados. Dentro del conjunto de datos, 29 muestras fueron cultivadas a más de 1200 m.s.n.m por lo que son consideradas café de altura (CA). Las dos muestras restantes fueron cultivadas a 600 m.s.n.m. por métodos orgánicos, por lo que se clasifican como prima lavado orgánico (PLO). También dentro de las 31 muestras se incluyeron 9 muestras de cafés altura pero cultivadas por métodos orgánicos (COA).

Tabla 3.7. Muestras recolectadas para el análisis de café.

Región	Marca	Clasificación
	<i>Café Xico</i>	CA
	<i>Los Portales</i>	CA
	<i>Avelino Tueste Reserva</i>	CA
	<i>Texolo</i>	CA
	<i>D'La Finca</i>	CA
	<i>Buena Ventura Premium</i>	COA
	<i>Bordi</i>	CA
	<i>Baxtla</i>	CA
	<i>Avelino Tueste Exprés</i>	CA
	<i>Café Junco</i>	CA
Veracruz	<i>Café Córdoba</i>	CA
	<i>Avelino Tueste Exprés</i>	CA
	<i>La Misión</i>	COA
	<i>Blasón Coatepec</i>	CA
	<i>Buena Ventura Gourmet</i>	COA
	<i>Punta de Oro</i>	CA
	<i>Sierra de los Tuxtlas</i>	PLO
	<i>La Onza Gourmet</i>	CA
	<i>Moretto</i>	CA

	<i>Abaxomol</i>	<i>COA</i>
	<i>Soconusco</i>	<i>CA</i>
	<i>Blasón Jaltenango</i>	<i>CA</i>
	<i>Morteador</i>	<i>COA</i>
Chiapas	<i>Nacional Café David</i>	<i>CA</i>
	<i>Oro Maya</i>	<i>COA</i>
	<i>Mulantic</i>	<i>COA</i>
	<i>BioStricto</i>	<i>COA</i>
	<i>Uciri</i>	<i>PLO</i>
Otro	<i>Blasón Pluma</i>	<i>CA</i>
	<i>Blasón artesanal</i>	<i>CO</i>
	<i>Gila Gourmet</i>	<i>CA</i>

3.4.1.3 Preparación de las muestras.

Para preparar las muestras se tomó en cuenta la norma NMX-F-551-SCFI-2008 y las especificaciones de cada productor de café [61]. De cada empaque se pesaron 8 g de café en una balanza granataria con 0.1 g de resolución y se depositaron sobre un filtro de café metálico. Posteriormente se agregaron 50 mL de agua purificada (Bonafont, S.A. de C.V.) a punto de ebullición para preparar las infusiones. Una vez preparadas, las muestras se dejaron reposar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente (25°C), se sellaron y almacenaron.

3.4.1.4 Mediciones voltamperométricas.

Para registrar el comportamiento de las especies redox presentes en las muestras se utilizó un potenciostato Autolab/PGSTAT 20 de 6 canales de entrada y la técnica de voltamperometría cíclica. Se realizaron 3 barridos aplicando una forma de onda triangular en un rango de -1.7 a 1.5 V con un incremento de 9 mV, un barrido de 100 mV/s y un voltaje inicial de 1 V. Además de medir cada muestra por triplicado también se registró un blanco (solo agua purificada) entre cada medición siguiendo los parámetros descritos. Finalmente, para evitar regenerar la superficie del electrodo se realizó una limpieza electroquímica aplicando un potencial positivo de 1.8 V durante 40 s entre cada medición.

Con los registros obtenidos de los 6 sensores, se realizó primero un análisis exploratorio de los datos para observar si existía agrupamiento en las muestras de acuerdo a alguna de las características mostradas en la tabla 3.7. Posteriormente, los datos obtenidos fueron utilizados para entrenar tres clasificadores basados en características específicas de las muestras.

3.5. Análisis de muestras de cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica fermentada elaborada a base de cereales, principalmente la cebada, agua y lúpulo[69]. El proceso de fabricación conlleva varias etapas, además de la adición de diferentes elementos que dan características distintivas a cada tipo de cerveza.

De manera general, los cereales son sometidos a un proceso llamado malteado para extraer los azúcares que posteriormente serán transformados en alcohol. Para ello, los granos de cereal se germinan y con esto se activan las enzimas que permiten liberar los azúcares presentes. Cuando se encuentran en su punto óptimo, los granos germinados o malta verde son transportados a un horno para ser tostados. Dependiendo de la temperatura utilizada, la malta adquirirá un color pálido o tostado que determinará características de la cerveza como su color, sabor y aroma. Después de tostarse, la malta se somete a un proceso llamado maceración, en donde se tritura y mezcla con agua caliente y enzimas especiales que se encargan de extraer azúcares más simples de la mezcla. Posteriormente, el líquido que contiene los azúcares extraídos del grano, llamado mosto, se separa de la malta por medio de un filtrado. Una vez separado, el mosto se lleva a una caldera en donde se añade el lúpulo que proporciona el amargor y sabor típico de la cerveza. La cantidad de lúpulo utilizada también impacta en el sabor final del producto. Después de retirar los restos de lúpulo, la mezcla se almacena a una temperatura de alrededor de 35°C para permitir la operación de las levaduras que llevarán a cabo la fermentación[69].

En este punto del proceso es posible distinguir entre dos familias de cerveza. Por un lado, en la elaboración de las cervezas *ale* tradicionalmente se utilizan levaduras altas que llevan a cabo la fermentación entre los 16 y 20°C en un período de 2 a 3 días. Por otro lado, en la

fabricación de las cervezas *lager* se utilizan levaduras bajas que realizan la fermentación entre los 10 y 15°C durante períodos mayores de tiempo[69]. Este proceso, conocido como fermentación primaria, da como resultado una cerveza “verde” o inmadura que debe someterse a un segundo proceso de fermentación o maduración que puede durar semanas e incluso meses. En este proceso, se agregan algunos elementos a la cerveza que refinará su sabor antes de ser envasada.

Existen diferentes clasificaciones para el producto final, aunque generalmente se suele distinguir entre las cervezas *ale* de alta fermentación y las *lager* de baja fermentación. Dentro de las *ale*, dependiendo del tostado de la malta y del estilo de cada país es posible encontrar estilos como la *Pale ale*, *Brown ale*, *Mild ale*, entre las más claras y *Stout* o *Porter* entre las más oscuras. Dentro de las cervezas *lager*, la *Pilsener* y la *Vienna* son de los estilos más populares.

En México, la comercialización de la cerveza se encuentra concentrada en las compañías grupo Anheuser-Busch InBev (antes grupo Modelo) y Heineken México (antes Cuauhtémoc-Moctezuma). Al margen de estas empresas, el consumo de cerveza artesanal representa menos del 1% a nivel nacional, aunque se espera que tenga un crecimiento importante hasta llegar al 7% del total del mercado[70]. Recientemente la Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y la Malta reportó que la industria cervecera representa un 4% de la recaudación del mercado nacional y que las exportaciones de cerveza mexicana llegan a 180 países[70]. La importancia económica de esta bebida, conlleva la necesidad de evaluación del producto final en términos de calidad. Muchas de estas evaluaciones se hacen en base a la experiencia del “maestro cervecero” o a características como el color, sabor o contenido alcohólico, contenido de antioxidantes y perfil químico, lo que conlleva una variedad de métodos instrumentales.

El objetivo de esta aplicación es hacer uso de las lenguas electrónicas para crear un sistema de monitoreo que actúe como clasificador de un conjunto de muestras de cervezas comerciales y artesanales de diferentes estilos y diferentes productores del país. Tal como en la sección anterior, se busca obtener una herramienta de análisis simplificado que, sin hacer uso de instrumentación complicada o costosa, pueda obtener información de las

características presentes en cada muestra para su discriminación. Tomando en cuenta la experiencia de otros grupos en el análisis de cervezas, en un primer experimental, el registro se realizará diluyendo la muestra de cerveza a manera de pretratamiento y en un segundo experimental se realizará la medición de la muestra original sin ningún pretratamiento[14]. Se esperan obtener datos multivariable relacionado con el comportamiento redox de cada muestra y observar el efecto del pretratamiento sobre el análisis final.

3.5.1. Desarrollo

3.5.1.1 Selección y preparación de muestras

En total se analizaron 12 muestras de cervezas, de las cuales 2 fueron fabricadas a gran escala por métodos industrializados y 10 fueron fabricadas artesanalmente por productores locales. Las dos cervezas comerciales son de baja fermentación o *lager* y el resto de las muestras es de alta fermentación o *ale*. Dentro de las cervezas ale, hay diferentes estilos como *Indian Pale Ale*, *Brown Ale*, *Red Ale* y *Stout*. La tabla 3.8 contiene las 12 muestras seleccionadas, junto con las características reportadas por el fabricante en la etiqueta y en su sitio de internet.

Tabla 3.8. Muestras recolectadas para el análisis de cerveza.

Fermentación	Marca	Estilo	Fabricación	Ubicación
Ale	<i>Red Pig</i>	Brown Ale	Artesanal	Baja California
	<i>Agua Mala</i>	Indian Pale Ale	Artesanal	Baja California
	<i>Minerva Pale Ale</i>	Pale Ale	Artesanal	Jalisco
	<i>Calavera</i>	American Pale Ale	Artesanal	Edo. de México
	<i>Baja Red</i>	Red Ale	Artesanal	Baja California
	<i>Jack</i>	Stout	Artesanal	Edo. de México
	<i>Minerva Stout</i>	Stout imperial	Artesanal	Jalisco
	<i>Ramuri</i>	Stout imperial	Artesanal	Baja California
	<i>Black Penguin</i>	Stout imperial	Artesanal	Jalisco
	<i>Xócolatl</i>	Stout	Artesanal	Puebla
Lager	<i>Indio</i>	Viena	Comercial	--
	<i>Sol</i>	American adjunct lager	Comercial	--

Los envases sellados de las 12 muestras de cerveza fueron abiertos y se recolectaron 100 mL divididos en dos vasos de 50 mL. La muestra del primer vaso fue diluida en proporción 1/3 con agua destilada y agitada durante 5 minutos para retirar la espuma característica de la cerveza y evitar su interferencia en la medición. La segunda muestra se conservó sin dilución pero fue igualmente agitada para eliminar la espuma. Siguiendo este procedimiento se obtuvieron en total 24 muestras.

3.5.1.2 Mediciones amperométricas

Al igual que con las muestras de café, para registrar el comportamiento de las especies redox presentes en las muestras se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica. Se utilizó un potenciostato portátil de dos canales con 2 electrodos voltamperométricos: el primero genérico y el segundo de platino. Se realizaron 4 barridos por cada muestra aplicando una forma de onda triangular en un rango de -1.0 a 1.4 V con un incremento de 9 mV, un barrido de 100 mV/s y un voltaje inicial fue de -1 V. Ya que se trata de muestras procesadas no se registró la medición de un blanco, aunque si se realizó una limpieza electroquímica después de cada medición aplicando un potencial positivo de 1.4 V durante 40 s.

Con los registros obtenidos de los 2 sensores, se realizó primero un análisis exploratorio de los datos para observar si existía agrupamiento en las muestras de acuerdo a alguna de las características mostradas en la tabla 3.8. Posteriormente, los datos obtenidos fueron utilizados para entrenar dos clasificadores basados en características específicas de las muestras.

Capítulo IV

Resultados

4. Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para cada sistema de monitoreo químico desarrollado en el capítulo tres. La propuesta consistió en la implementación de nuevas plataformas de sensado químico utilizando los biosensores y las LEs como métodos de detección. Se desarrollaron y aplicaron las herramientas tecnológicas y de procesamiento necesarias para la obtención de información de las 4 muestras seleccionadas como modelo. En el caso de los biosensores, la nueva instrumentación desarrollada en este trabajo permitió la cuantificación del analito objetivo y su detección en línea por medio de un sistema automático. En el caso de las LEs, el análisis exploratorio y el procesamiento de las señales proveniente del arreglo de sensores permitió la obtención de nuevos modelos capaces de identificar características de interés en el conjunto de muestras seleccionado sin la necesidad de recurrir a técnicas instrumentales exhaustivas o costosas.

4.1 Detección en línea de pesticidas organofosforados con biosensores enzimáticos

Para la detección de CPO utilizando el sistema automático desarrollado, la inhibición de la enzima AChE por el pesticida se consideró como la característica primordial para la cuantificación. Durante la optimización de los parámetros operativos del sistema de flujo fue de suma importancia garantizar la estabilidad en la operación del biosensor, con el fin de atribuir la disminución en la respuesta registrada únicamente a la capacidad inhibidora del pesticida. Aunque el método de inmovilización basado en *beads* magnéticos fue reportado anteriormente por Istamboulie *et al*, uno de los grandes inconvenientes que presentó esta aplicación fue la poca repetibilidad en las mediciones del biosensor fabricado

manualmente[11]. En su trabajo, Istamboulie atribuyó que las diferencias en amplitud de cada dispositivo fabricado fueron ocasionadas por la deposición manual de la capa selectiva y por las pérdidas de *beads* entre cada fase de lavado manual. Por tanto, el desarrollo de un sistema que permita la automatización de ambos procedimientos debería repercutir en la estabilidad final del biosensor, en su capacidad para detectar mínimas inhibiciones y por consecuencia en su límite de detección. Para establecer una comparativa entre el desempeño de un biosensor fabricado manualmente y uno fabricado por el sistema de flujo se utilizaron los *beads* magnéticos preparados en la sección 3.1.2.1 para elaborar tres biosensores. El primero fue fabricado manualmente depositando 1 μ L de *beads* magnéticos sobre la superficie del SPE, y fue probado experimentalmente en una celda electroquímica de tipo *batch*. El segundo biosensor también fue fabricado manualmente, pero la medición de su actividad se llevó a cabo de forma automática en el sistema de flujo desarrollado. Finalmente, el tercer biosensor fue completamente fabricado y probado por el sistema de flujo con una mínima intervención del usuario.

Durante esta comparativa, la actividad del primer sensor fue probada empleando el método tradicional descrito por Istamboulie *et al*[11]. El segundo biosensor fue colocado en la celda de flujo del sistema y su actividad fue probada siguiendo el protocolo descrito en la figura 3.8. En el primer caso el transporte de masa a la superficie del electrodo se llevó a cabo por medio de un agitador magnético, y en el segundo caso por medio de la inyección de un flujo constante de reactivos. El tercer electrodo fue fabricado y probado totalmente por el sistema de flujo. Para la fabricación de este biosensor se utilizaron los parámetros de volumen y flujo optimizados en la sección 3.1.2.3 y para probar su actividad se utilizó la secuencia descrita en la figura 3.8. Ambas secuencias, manual y automática, fueron replicadas 6 veces para observar la repetibilidad de los tres biosensores. La figura 4.1 muestra una comparativa de las señales electroquímicas obtenidas con estos tres electrodos para los 6 replicados. Después de probar su actividad, las medias y las desviaciones presentadas por cada dispositivo fueron de 1210 \pm 76.95nA para el primer biosensor, 940 \pm 12.16nA para el segundo y 624 \pm 8.24nA para el biosensor fabricado por el sistema de flujo.

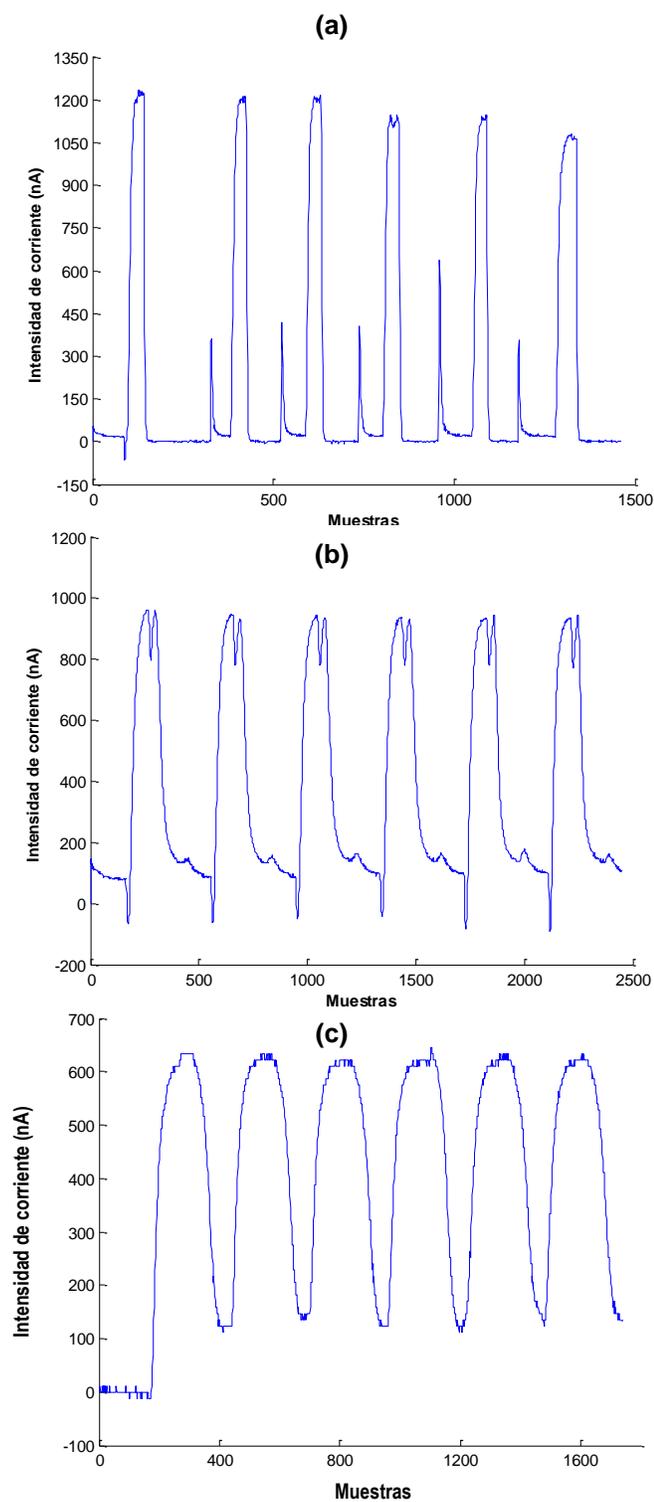


Figura 4.1 Comparativa entre la actividad de (a) un biosensor fabricado y probado manualmente (b) fabricado manualmente y probado con el sistema de flujo y (c) fabricado y probado con el sistema de flujo.

Como puede observarse en la figura 4.1, existen algunas diferencias notables entre las actividades registradas manualmente y las obtenidas por el sistema de flujo, especialmente en

las últimas tres repeticiones. Además de los resultados favorables en cuanto a la repetibilidad, la tabla 4.1 muestra algunos parámetros operacionales que el sistema de flujo permitió reducir considerablemente en comparación con la técnica manual. Específicamente se incluyen el consumo de reactivos, las variaciones entre mediciones consecutivas (expresada como coeficiente de variación) y el tiempo de análisis, que si bien no sufrió cambios representa el tiempo continuo de operación autónoma del sistema sin intervención del usuario.

Tabla 4.1 Comparativa entre método manual y automático

Método	C.V. (%)	Volumen (mL)	Tiempo (min)
Manual	6.45	10.1	25
Automático	1.30	1	26

Posterior a la comparativa mostrada en la figura y tabla 4.1, la reproducibilidad de los biosensores fabricados por el sistema fue medida al registrar la actividad promedio de todos los biosensores fabricados automáticamente durante 11 días de trabajo. La capa selectiva fabricada en la sección 3.1.2.3 mantuvo su actividad por aproximadamente 11 días, pasados los cuáles fue fabricada una nueva capa selectiva. La figura 4.2 muestra la tendencia obtenida durante este período de tiempo, en donde cada punto rojo representa el promedio de todas las amplitudes registradas durante un día de trabajo completo.

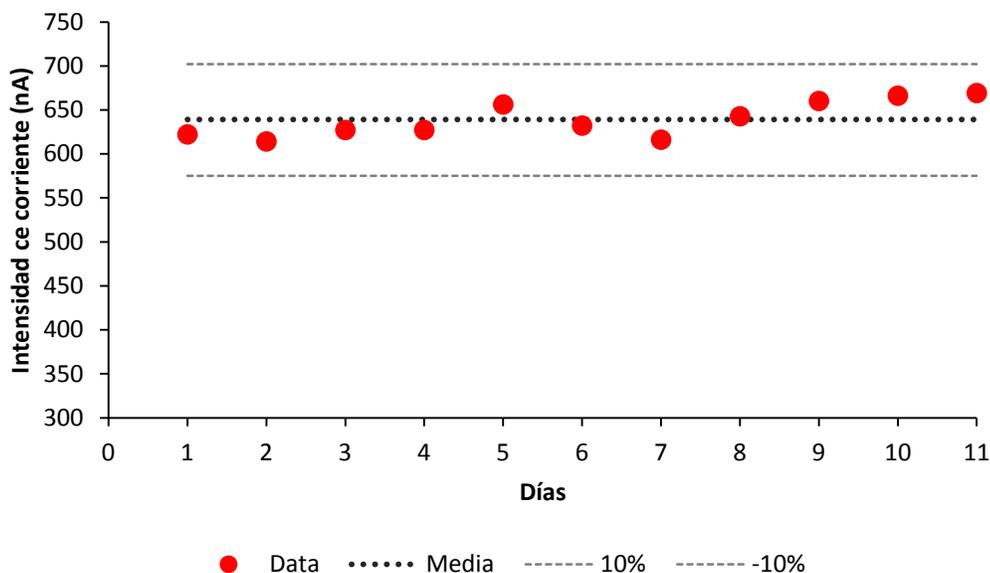


Figura 4.2 Estabilidad de los biosensores fabricados durante 11 días de trabajo

Durante los 11 días, la media registrada fue de $639.23 \pm 20.37 \text{ nA}$, lo que representa un coeficiente de variación de $\pm 3.18\%$, que es mucho menor al rango tradicional de tolerancia de $\pm 10\%$ que suele manejarse en las mediciones con biosensores.

Una vez probada la estabilidad del sistema y de los biosensores fabricados, se implementó el protocolo de detección en línea de pesticidas descrito en la sección 3.1.2.4. Como resultado de una de estas secuencias automáticas se obtuvo la figura 4.3, donde se muestra la señal electroquímica obtenida por el sistema al seguir los pasos descritos en el protocolo de la figura 3.8. Durante el análisis de las muestras, el sistema llevo a cabo de forma automática la fabricación del biosensor y el registro de su actividad por triplicado. Posteriormente realizó la incubación durante 10 minutos de una muestra dopada con CPO, y posteriormente registró la actividad residual producto de la inhibición. Una vez inhibidos, los *beads* magnéticos fueron descartados y reemplazados con una nueva capa selectiva durante un procedimiento que fue repetido para cada muestra procesada.

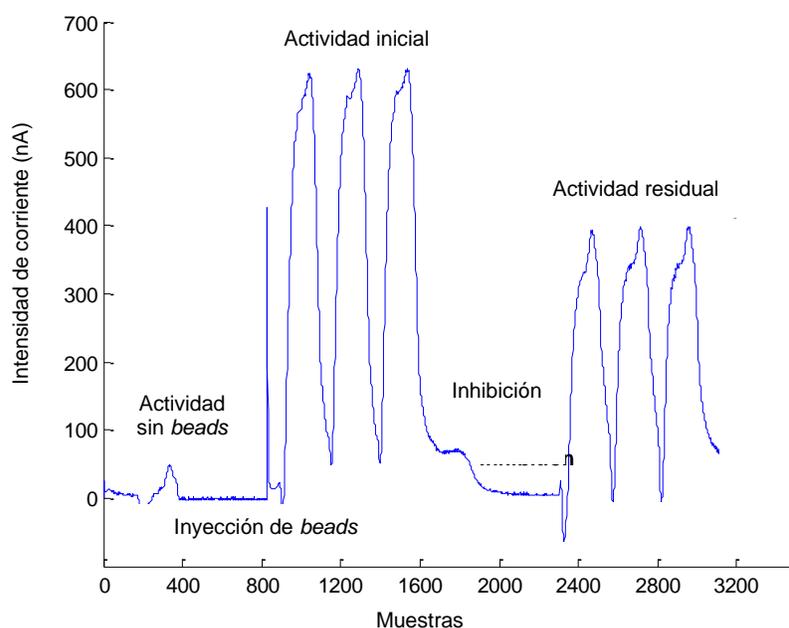


Figura 4.3 Ejemplo de una señal obtenida al procesar una muestra de CPO

En la figura 4.4 se muestra el sistema físico desarrollado junto con la interfaz gráfica en operación, donde puede apreciarse una prueba en línea del análisis de una muestra de CPO.

La interfaz de usuario cuenta entre sus funciones con dos cursores que permiten calcular en línea el porcentaje de inhibición de la enzima. Este porcentaje, fue tomado como punto de partida para la construcción de dos modelos de calibración para CPO: uno basado en muestras sintéticas preparadas con PBS buffer y otro basado en muestras reales con agua de lago como matriz. Para el dopaje de las muestras analizadas se utilizaron concentraciones superiores e inferiores al límite de detección de CPO establecido por la comunidad europea[71, 72].

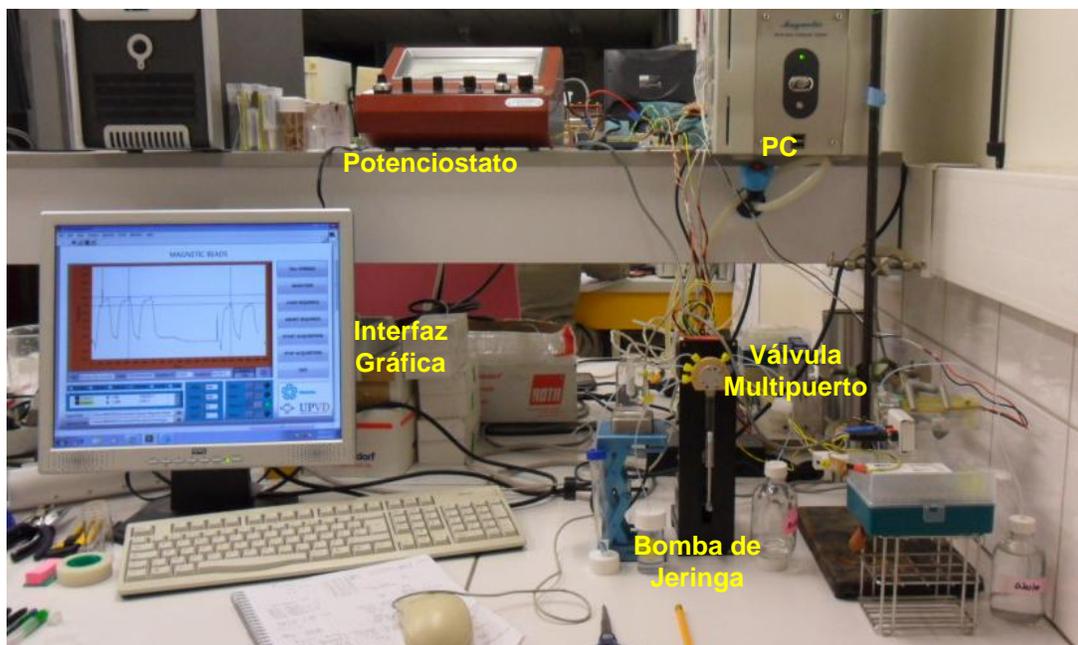


Figura 4.4 Sistema de flujo desarrollado

Las figura 4.5 (a) y (b) muestran las curvas de calibración obtenidas para ambas matrices. Con las curvas de calibración se calcularon características importantes que miden el desempeño del biosensor. Entre las características calculadas se encuentra el rango lineal de trabajo del biosensor, el límite de detección alcanzado para ambas matrices y la repetibilidad en las mediciones expresada por medio del coeficiente de variación. Los resultados se muestran en la tabla 4.2, en donde se incluye una comparativa con los resultados obtenidos por medio del método manual.

Tabla 4.2 Características de operación del sistema con muestras en buffer y muestras de agua de lago.

Rango Lineal	LD [M]	LD [μgL^{-1}]	R^{2*}	C.V. ** (n=3)	Matriz
1×10^{-9} - 5×10^{-10}	4.3×10^{-11}	0.033	0.9958	3.92 %	Buffer PBS
3×10^{-9} - 1×10^{-10}	3×10^{-10}	0.1004	0.9926	3.59 %	Agua de lago
--	1.3×10^{-11}	--	0.994	6.25%	Buffer PBS***

*Coeficiente de determinación

** Coeficiente de variación

*** Método manual

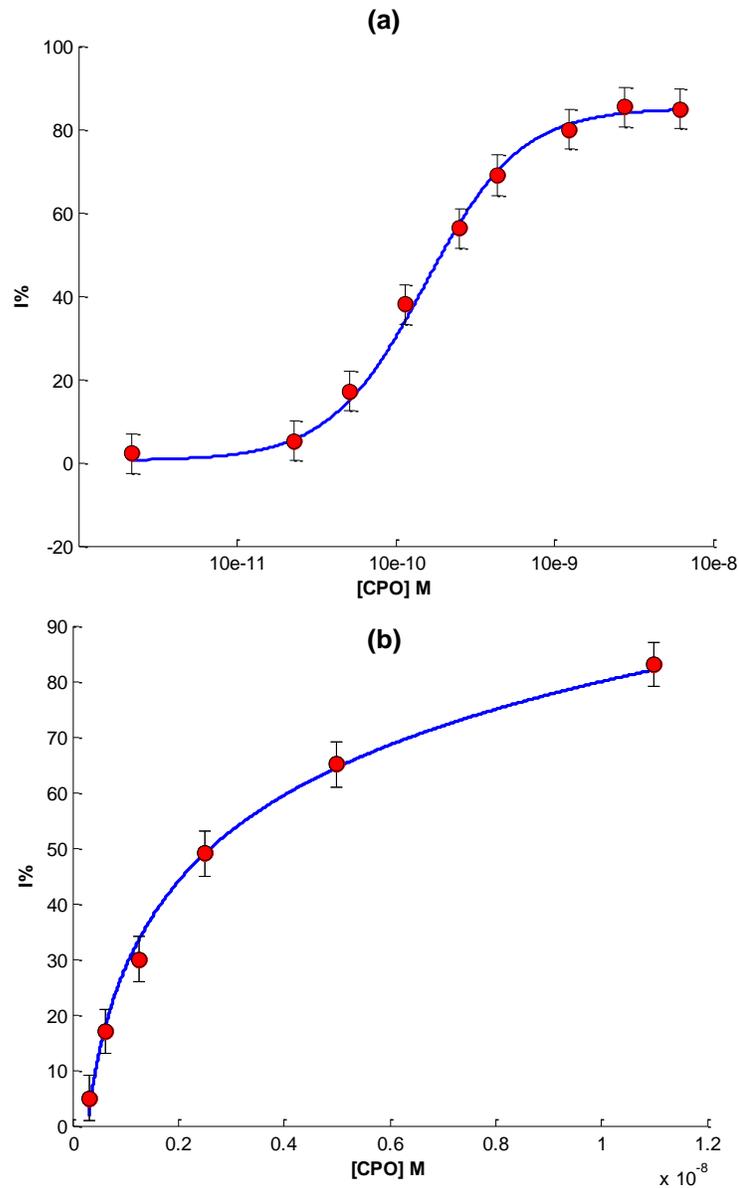


Figura 4.5 Curvas de calibración para la cuantificación de CPO. La figura 4.5(a) corresponde a la matriz de buffer PBS y la figura 4.5 (b) a las muestras dopadas de agua de lago.

Finalmente, se utilizó la curva de calibración de la figura 4.5 (b) para corroborar la cuantificación en línea del sistema en dos muestras de agua de lago y se calculó su concentración en base al porcentaje de inhibición registrado. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra y el resultado final se expresa por medio del porcentaje de recuperación obtenido para cada muestra.

Tabla 4.3 Porcentajes de recuperación obtenidos para muestras dopadas

Pesticida añadido [M]	Pesticida detectado [M]	Recuperación (%)	C.V. (n=3)
5×10^{-9}	5.13×10^{-9}	102.6	4.45%
5×10^{-10}	4.80×10^{-10}	120.2	2.94%

De los resultados de cuantificación obtenidos es posible establecer algunas conclusiones. Esta aplicación se enfocó concretamente en la inmovilización de enzimas por medio de partículas magnéticas, y se desarrollaron las herramientas necesarias para lograr la renovación de la capa selectiva una vez inhibida, manteniendo la repetibilidad y sensibilidad del sistema de medición. Los resultados obtenidos fueron comparados con el trabajo en *batch* de Istamboulie, donde se utilizaron partículas magnéticas y enzimas logrando un límite de detección de 1.3×10^{-11} M de CPO. Este valor es inferior a la concentración de 4.3×10^{-11} M de CPO obtenida como LD en el presente trabajo [11].

Sin embargo, Istamboulie utilizó la variedad B394 de la enzima AChE que presenta mayor sensibilidad a los pesticidas organofosforados que la variedad B131. Aún sin el uso de la enzima B394, la automatización del protocolo permitió alcanzar un LD aceptable y en concordancia con las regulaciones establecidas por la legislación europea. Además este sistema, a diferencia de la detección en *batch*, fue aplicado a la cuantificación de muestras con matrices reales como el agua de lago

Aunque el desarrollo tecnológico de sistemas automáticos para el manejo de partículas magnéticas con fines de cuantificación ha sido propuesto con anterioridad para otros métodos instrumentales más sofisticados, los resultados obtenidos de la detección electroquímica con el

sistema de flujo desarrollado en el presente trabajo sugieren una mejora en los límites de detección alcanzados para la cuantificación de CPO. Lo anterior en contraposición a trabajos previos como los presentados por Llopis y Gunther donde los sistemas implementados basados en enzimas y partículas magnéticas no alcanzaron los límites de detección considerados aceptables para la cuantificación de pesticidas de acuerdo a las regulaciones existentes[73, 74].

El sistema de flujo para la detección de pesticidas desarrollado en el presente trabajo representa una aportación tecnológica sobresaliente en el campo de la instrumentación electroquímica. Su contribución radica en la posibilidad de crear sistemas monitoreo en línea para pesticidas incorporando biosensores enzimáticos como detectores y utilizando un nuevo método inmovilización basado en partículas magnéticas.

Una vez que su eficacia ha sido probada utilizando la enzima AChE y el pesticida CPO como modelos, el sistema puede funcionar como plataforma general de detección e incorporar otro tipo de enzimas inmovilizadas selectivas a otras familias de pesticidas o analitos objetivo. Lo anterior fue probado por el trabajo de Mishra *et al*, donde diferentes biosensores con otras variedades de la enzima AChE fueron utilizados para detectar diferentes familias de pesticidas empleando la instrumentación desarrollada en el presente trabajo y logrando límites de detección sobresalientes para cada pesticida analizado[75].

4.2 Detección en línea de ácido okadaico en muestras de moluscos

Basado en el sistema presentado en la sección anterior se implementó un inmunoensayo en flujo para la cuantificación de la biotoxina ácido okadaico. La cuantificación está basada en el trabajo presentado por Hayat *et al* para la detección de ácido okadaico por medio de un inmunosensor competitivo indirecto[57].

A diferencia del biosensor enzimático, en donde se busca una relación directamente proporcional entre el grado de inhibición de la enzima y la concentración del pesticida, el inmunoensayo competitivo presenta una relación inversamente proporcional entre la amplitud registrada y la concentración del analito; por lo anterior, el registro de una mayor actividad indica una concentración menor de analito. Durante el desarrollo de este sistema fue importante garantizar que la amplitud en la actividad registrada por el sistema se produjo por la formación de complejos antígeno-anticuerpo y no por un efecto de acumulación conocido como absorción no específica. Para ello se realizaron dos pruebas, una para determinar la actividad producida por la formación de complejos antígeno-anticuerpo y la otra para determinar la actividad generada en ausencia de estos complejos. La figura 4.6 muestra la diferencia entre estas dos señales, así como la amplitud registrada al introducir una concentración libre de AO.

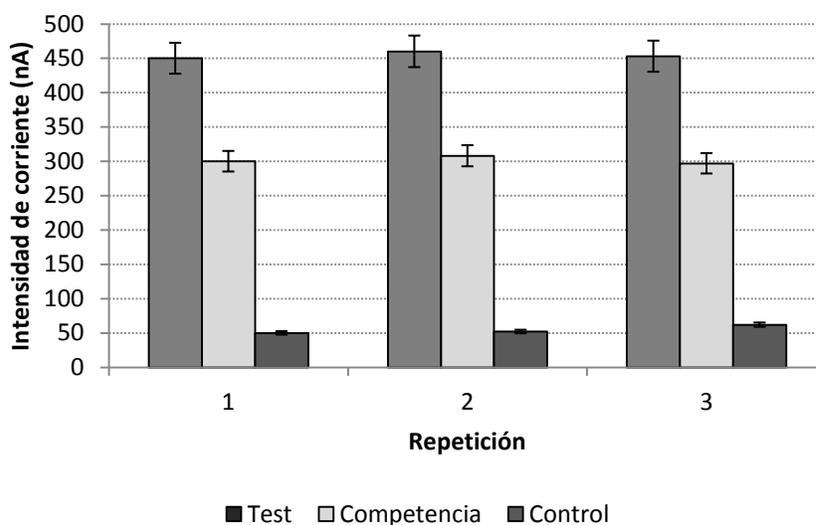


Figura 4.6 Resultados de *test* y control para el inmunoensayo de AO

Después de tres repeticiones las medias y las desviaciones calculadas para el test, competencia y control fueron $452.8 \pm 25.2 \text{ nA}$, $307.2 \pm 14.38 \text{ nA}$ y $50.38 \pm 7.2 \text{ nA}$ respectivamente. La diferencia entre *test* y control es de aproximadamente 9 veces, lo que brinda un rango suficiente de trabajo y es similar a lo reportado por Hayat *et al.*

De acuerdo a las condiciones experimentales reportadas en la sección 3.2.1.3, los *beads* magnéticos con AO inmovilizado fueron depositados en la superficie del SPE y sometidos al campo magnético rotatorio de la celda de flujo. Posteriormente, para la fabricación del inmunosensor se realizaron de manera automática las fases de incubación de los anticuerpos y lavado. Finalmente el sistema realizó la medición final de la actividad enzimática para determinar la presencia de AO. Para llevar a cabo la competencia entre AO libre y AO inmovilizado se doparon muestras sintéticas con concentraciones conocidas de AO. Estas muestras fueron procesadas por el sistema, y el porcentaje de enlaces antígeno-anticuerpo formados o porcentaje de *binding* fue calculado en base a la actividad registrada en el inmunosensor. Con estos datos se construyó una curva de calibración, cuyo resultado final puede verse en la figura 4.7.

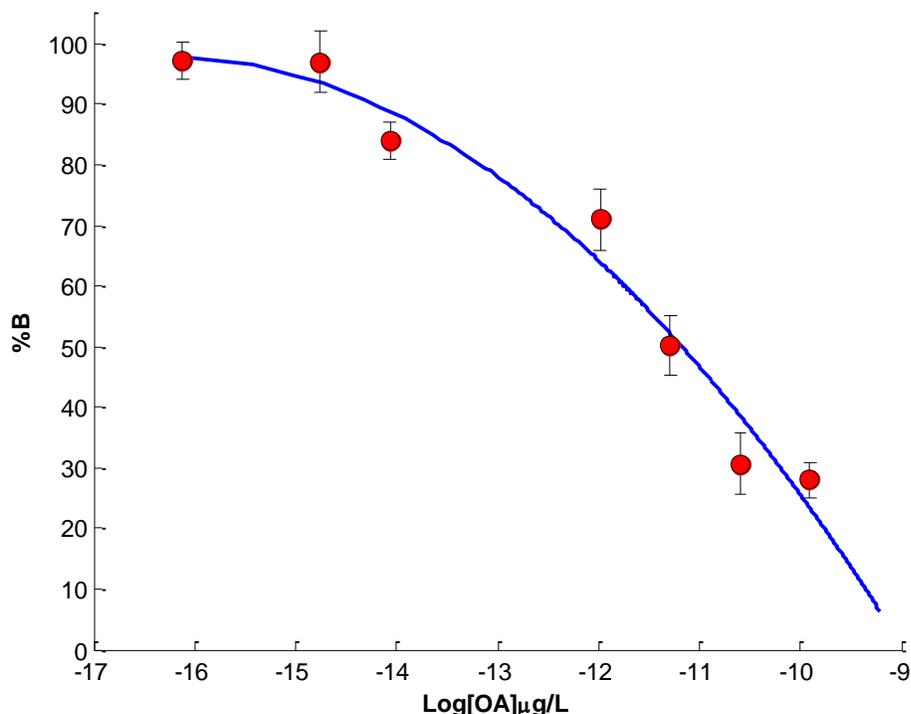


Figura 4.7 Curva de calibración para la cuantificación de ácido okadaico

De la curva de calibración de la figura 4.6 se calcularon algunos parámetros de operación del inmunosensor, que son presentados en la tabla 4.4.

Tabla 4.4 Características de operación del sistema con muestras en buffer

Rango Lineal [μgL^{-1}]	LD [μgL^{-1}]	R²	R.S.D. (n=3)	Matriz
0.19-25	0.15	0.9958	5 %	Buffer PBS

Para validar los resultados obtenidos con muestras AO en buffer el sistema fue probado también con muestras de moluscos dopadas con OA. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra y el resultado final se expresa por medio del porcentaje de recuperación obtenido para cada muestra, lo que puede observarse en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Porcentajes de recuperación obtenidos para muestras dopadas

OA añadido [μgKg^{-1}]	OA añadido [μgL^{-1}]	OA detectado [μgL^{-1}]	Recuperación (%)	C.V. (n=3)
40	20	19.25	96.25	3.75%
20	10	9.6	96	4%

Hay dos aspectos relevantes de la aportación descrita en este trabajo para la detección de AO. La primera tiene que ver con el desarrollo de un nuevo dispositivo capaz de fabricar un inmunosensor en línea y llevar a cabo la detección de AO de forma repetible y sensible. Esto constituye la primer herramienta auxiliar que permite la detección de AO en línea y que puede ser potencialmente aplicada a la cuantificación de muestras de moluscos[76].

Más aún, el límite de detección alcanzado se encuentra por debajo de la regulación europea actual para la detección de AO[55]. Aunque existen trabajos basados en enzimas e inmunoensayos para la detección de AO con bajos límites de detección, una parte central de la aportación de este trabajo es la autonomía aportada al sistema sin requerir de instrumentación costosa o compleja sin sacrificar la sensibilidad necesaria para realizar la detección de AO[77-79].

Si bien la sección anterior presentó los resultados utilizando enzimas como bioreceptores y se maneja la posibilidad de implementar sistemas de detección basados en otras enzimas para diferentes analitos objetivos, el sistema desarrollado en el presente trabajo brinda la oportunidad de funcionar como una plataforma en línea para la implementación de nuevos inmunosensores.

Ya que su desempeño fue validado con la detección de AO y se logró la correcta formación de complejos antígeno- anticuerpo y su inmovilización por medio de nano partículas magnéticas, es posible desarrollar nuevas estrategias de detección que puedan ajustarse a nuevos analitos modelos empleando otros biorreceptores como el ADN y los aptameros. Esto representa nuevamente un aporte novedoso al campo de la instrumentación electroquímica, pues el sistema esta diseñado para que con sólo cambiar las nanopartículas y el biorreceptor utilizado se posible tener una plataforma general de detección [55].

4.3 Análisis de muestras de café empleando lenguas electrónicas voltamperométricas

4.3.1 Análisis exploratorio

En la sección 3.3 se puso de manifiesto la importancia económica del café, así como las características que los productores mexicanos utilizan para su clasificación. El objetivo de del desarrollo de este sistema es utilizar las señales voltamperométricas provenientes del arreglo de sensores para correlacionar las muestras de café analizadas con alguna de las características mostradas en la tabla 3.4 y establecer las bases para un sistema de discriminación de muestras de café. De la tabla 3.4 tenemos que una de las características más sobresalientes en este conjunto de muestras es el origen geográfico de los granos de café y, que dentro del grupo, se encuentran muestras de las regiones con DO certificado.

Inicialmente, con las señales obtenidas se realizó un análisis exploratorio utilizando dos métodos: PCA y PARAFAC. Mientras que PCA permite visualizar los datos en función de la mayor variabilidad de las muestras, PARAFAC construye un modelo trilineal que toma en cuenta la distribución de las muestras, los potenciales registrados y la interacción de los quimiosensores.

La figura 4.8 muestra un ejemplo de las señales voltamperométricas registradas por cada sensor. En la figura 4.8 (a) se muestran los registros de tres muestras con diferente origen geográfico y en la figura 4.8 (b) se muestran los registros de tres muestras cultivadas a diferente altura. Cada voltamperograma consta de 712 intensidades, lo que resulta en un arreglo matricizado de 4272×31 (intensidades de 6 sensores x muestra) para PCA y un tensor de $31 \times 712 \times 6$ para PARFAC (muestras x intensidades x sensor).

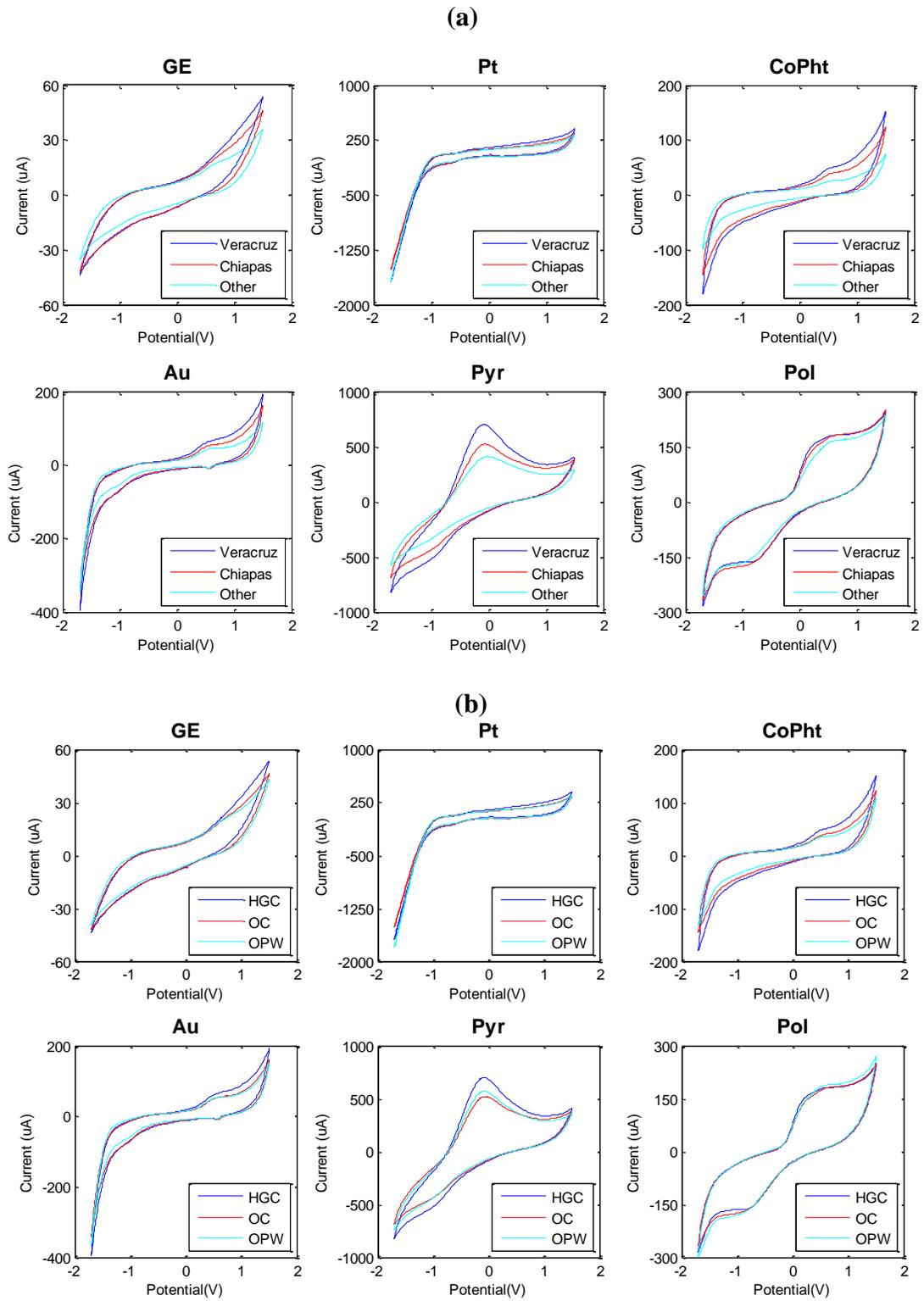


Figura 4.8 Voltamperogramas registrados para tres muestras diferentes de café con el arreglo de quimiosensores. (a) Regiones geográficas (b) métodos de cultivo.

Para el análisis con PCA se utilizaron los registros completos, sin ningún método de extracción de características. Sin embargo, ya que el preprocesamiento de los registros influye en el ajuste de los modelos finales, las señales fueron centradas, estandarizadas antes del modelado. De igual manera los registros fueron escalados con el fin de que todos los sensores contribuyan al modelo final. La figura 4.9 muestra el resultado de este pretratamiento para las señales de entrada del modelo PCA.

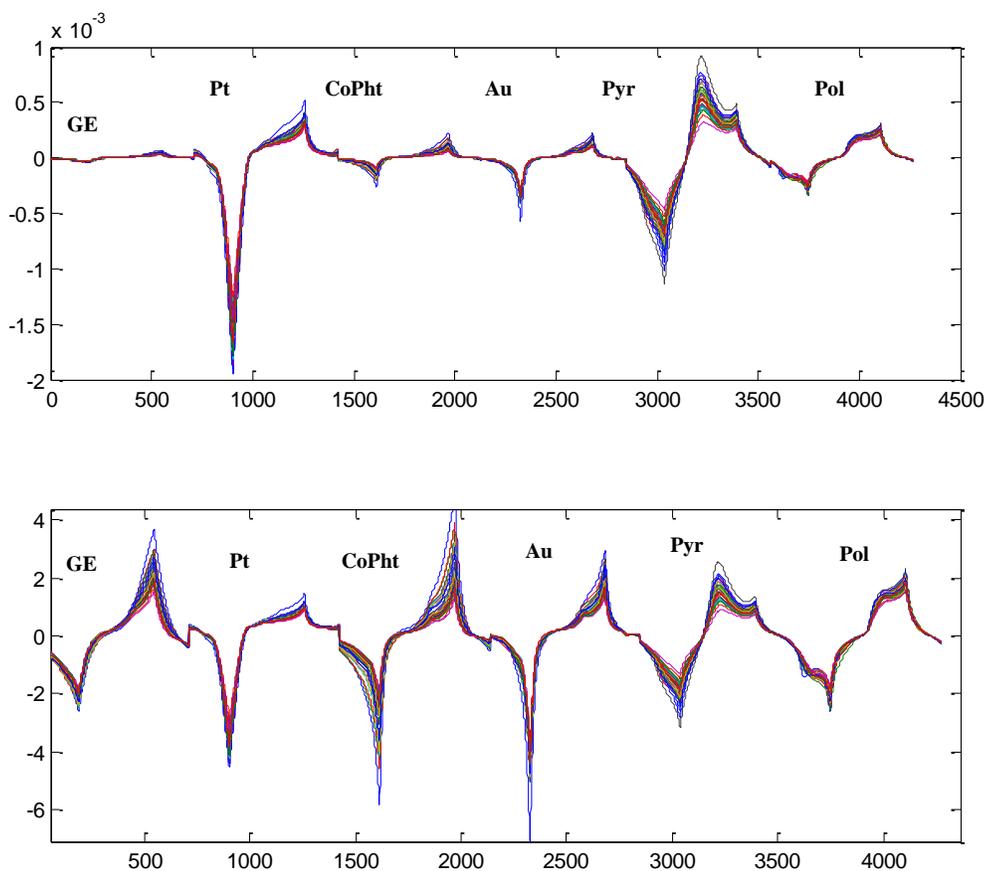


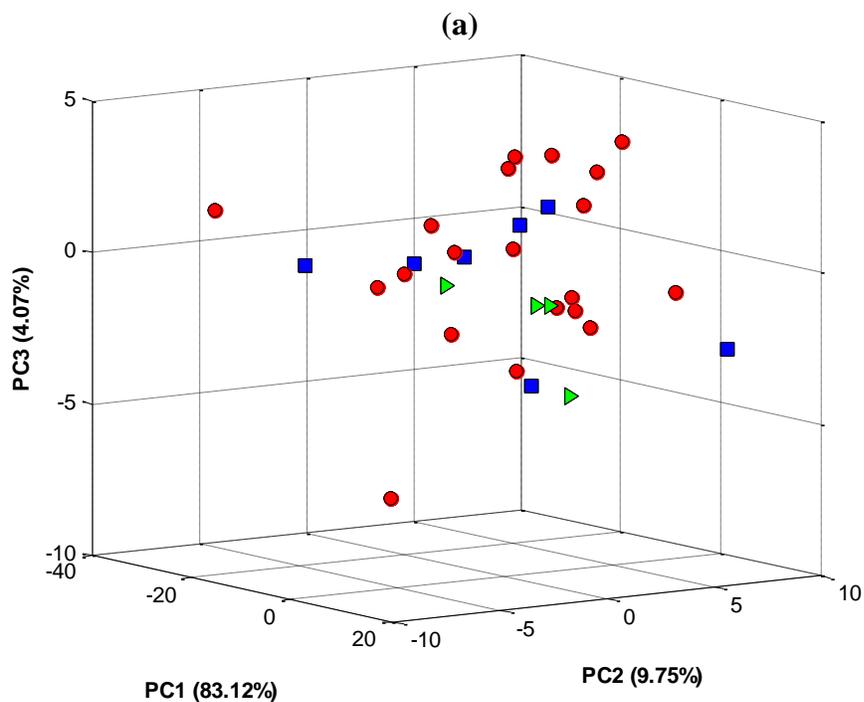
Figura 4.8. La figura (a) muestra los voltamperogramas originales sin preprocesamiento. Mientras que la figura (b) muestra el efecto del centrado y estandarizado de los datos previo al modelado con PCA.

Una vez procesados los datos, la varianza total acumulada con tres componentes fue 96.94%, la dispersión de los datos puede observarse en la figura 4.9 (a) sin que se apreciara ningún agrupamiento de las muestras por región geográfica o por métodos de cultivo.

La segunda parte del análisis exploratorio consistió en agrupar los datos en un tensor de 3 vías para utilizar PARAFAC. A diferencia de PCA, en donde todas las componentes tienen aporte

al modelo aunque no sean incluidas en la representación final, el modelo de PARAFAC es único para cada número de componentes seleccionadas. Es decir, en PCA podemos utilizar sólo 2 o 3 componentes que representen una varianza significativa para los datos y descartar las componentes sobrantes sin afectar el resultado final, pero el ajuste del modelo PARAFAC cambiará dependiendo del número de componentes seleccionadas.

Después de probar modelos con diferente número de componentes, se seleccionó el modelo de 3 componentes que presentó una varianza de 97.59% y una convergencia en 39 iteraciones. Sin embargo, al igual que con el modelo PCA no se observó ninguna tendencia favorable en la agrupación de alguna de las 3 clases. Las muestras del estado de Veracruz presentan una fuerte dispersión en los tres ejes y no es posible establecer alguna conclusión del resto de las muestras.



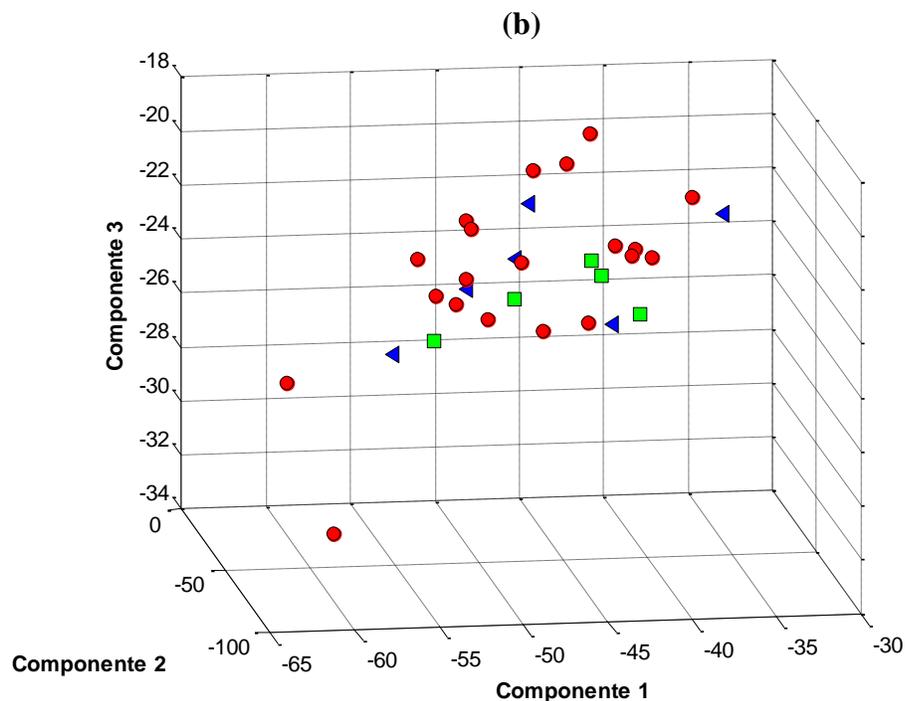


Figura 4.10(a) PCA para datos voltamperométricos de las muestras de café. (b) Modo1 de PARAFAC con tres componentes. Los círculos rojos representan las muestras de Veracruz, los cuadrados azules representan las muestras de Chiapas y los triángulos verdes las muestras de otras regiones.

De la figura 4.10 puede concluirse que no es posible realizar una discriminación de las muestras tomando únicamente como parámetro la variabilidad de conjunto de muestras. Por lo anterior se utilizaron técnicas de aprendizaje supervisado para construir dos clasificadores. El primero busca discriminar las muestras en función de las condiciones de cultivo mencionadas en la tabla 3.5, mientras que el segundo busca clasificar las muestras en función de su origen geográfico.

4.3.2 Clasificación basada en el método de cultivo

Derivado de la sección anterior, no fue posible establecer una clasificación o una extracción de características útiles basado en el análisis PCA. Por lo anterior, se propuso primero obtener la clasificación de las muestras tomando únicamente en cuenta las condiciones de cultivo, estableciéndose tres clases:

- Clase CA. Granos de café de altura.
- Clase CAO. Granos de café altura cultivados por métodos orgánicos.
- Clase PLO. Granos de café prima lavado cultivados por métodos orgánicos.

Ya que la compactación de los datos no llevó a resultados concluyentes, se utilizaron como señal de entrada los registros voltamperométricos completos de los 6 sensores, para no descartar información proveniente de regiones transitorias. Para analizar los datos se utilizaron tres modelos diferentes: análisis discriminante lineal (LDA), redes neuronales artificiales (RNA) y máquinas de vector soporte (SVM). De acuerdo a la experiencia de nuestro grupo en el procesamiento de señales, se utilizaron sólo los registros tomados en el escaneo 2 y 3 como datos de entrada para el diseño de los clasificadores. Para la etapa de entrenamiento de estos modelos, se seleccionaron de manera aleatoria el 70% de las muestras para el entrenamiento y para la etapa de validación se utilizaron el 30% restante de los datos. Esta operación fue repetida 10 veces, con datos seleccionados de manera aleatoria cada vez.

4.3.2.1 Clasificación utilizando LDA

La figura 4.11 muestra la distribución de 62 muestras en el espacio bidimensional formado por dos funciones discriminantes obtenidas durante el procesamiento con LDA, que en su conjunto explican el 99.8% de la variabilidad de los datos. La figura 4.11 muestra la totalidad de los datos, sin embargo para la validación del modelo sólo se tomaron en cuenta los resultados obtenidos con datos de prueba. Dentro del nuevo espacio bidimensional proyectado y con la distribución de los datos de entrenamiento se calculó el centroide de cada clase. Posteriormente se calculó la distancia euclidiana entre cada dato de entrenamiento y el centroide de cada clase. Se consideró que la muestra pertenecía a la clase con el centroide más cercano, es decir con el valor de la menor distancia euclidiana. Durante los resultados de validación, los datos de prueba son proyectados dentro del mismo espacio bidimensional de entrenamiento y su distancia euclidiana es calculada para asignar cada dato a la clase predicha por el clasificador.

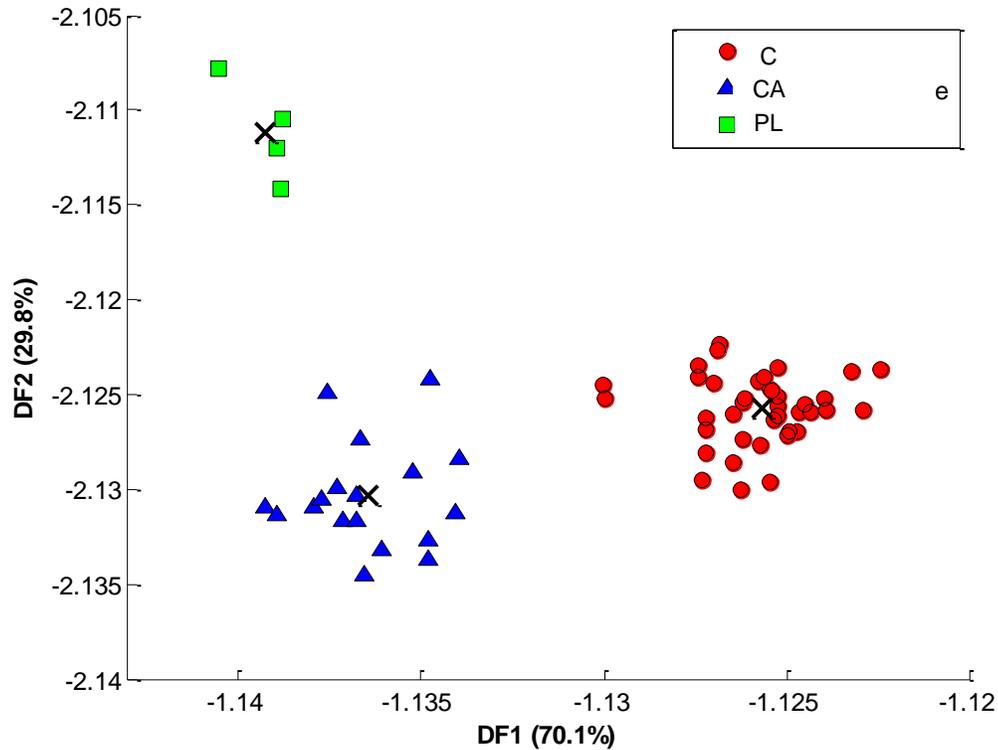


Figura 4.11 Espacio bidimensional para las muestras de café cultivadas con diferentes condiciones.

Los mismos datos modelados mediante LDA fueron utilizados para construir una red neuronal artificial con 12 neuronas en la capa oculta y una neurona en la capa de salida, por lo que la arquitectura fue de 4272x12x1. La función de transferencia para cada neurona de la capa oculta fue tangente sigmoideal, y para la capa de salida se empleó una función lineal.

4.3.2.2 Clasificación utilizando SVM

Para optimizar la operación de la SVM se probaron los kernels lineal y gaussiano (RBF). Para optimizar los parámetros de cada kernel se utilizó un conjunto de entrenamiento y uno de prueba de acuerdo al método propuesto por Hsu *et al.* El kernel lineal se probó con valores de 11 hasta 3300 de la función de coste de error c . La figura 4.12(a) muestra la tendencia en los resultados para el conjunto de validación de este kernel. El rango comprendido de 100 a 500 para c registró los valores máximos de clasificación para el conjunto de prueba con un 83.3% de exactitud, los valores fuera de esta rango produjeron una exactitud máxima de 66.6% y

sobreentrenamiento en el modelo. Para el kernel RBF se probaron valores de c desde 2×10^3 hasta 2×10^{15} y valores de γ desde 2×10^{-1} a 2×10^{-7} . Los valores de exactitud obtenidos con el conjunto de prueba fueron graficados en la superficie mostrada en la figura 4.12 (b), de acuerdo a esta representación con un valor de 2×10^7 para c y un valor de 2×10^{-5} para γ se obtuvo un 97% de exactitud en el conjunto de prueba.

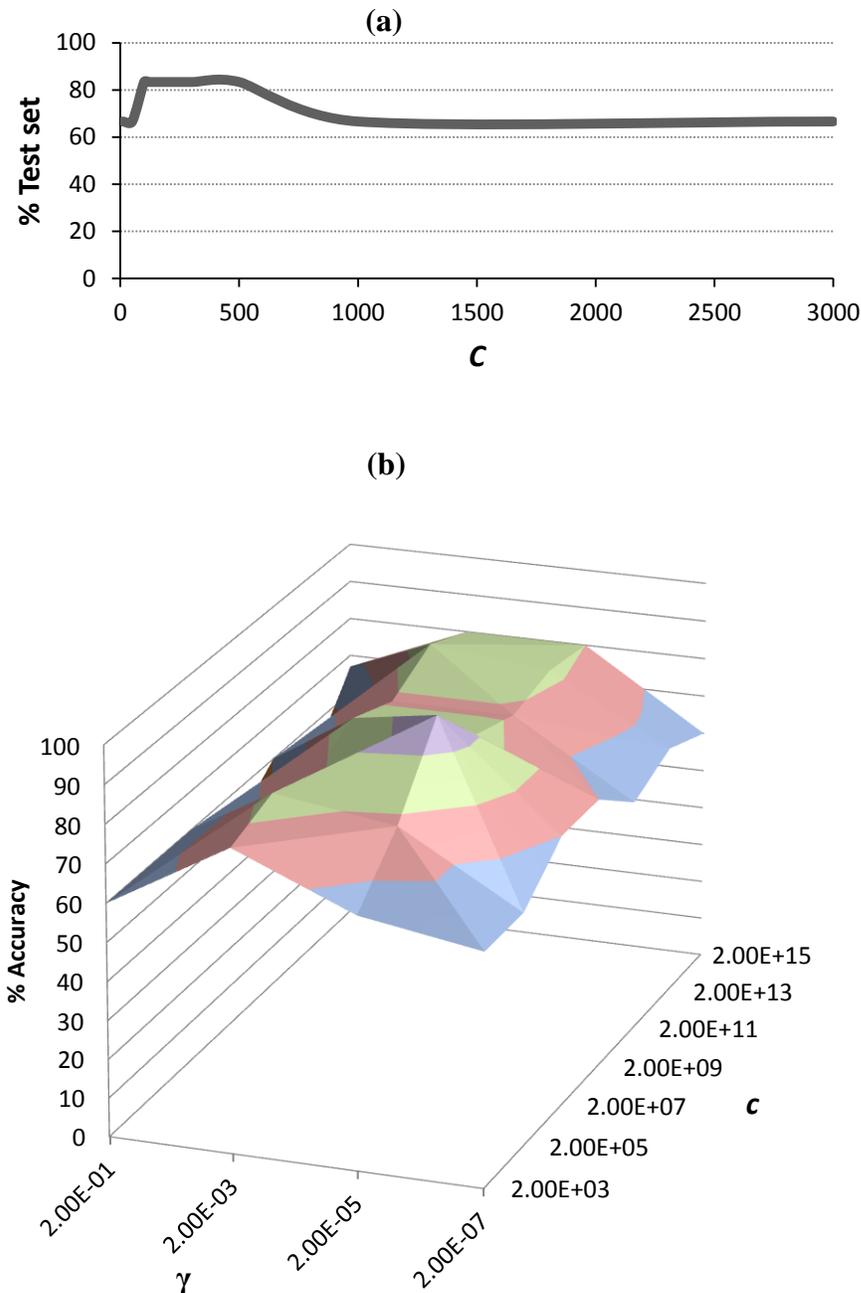


Figura 4.12. (a) Gráfica de optimización del kernel lineal (b) gráfica de los resultados de optimización del kernel RBF

La comparación entre los resultados obtenidos por los tres modelos puede observarse en la figura 4.13. Los porcentajes mostrados corresponden a la exactitud mostrada por cada modelo para el conjunto de prueba. En base a estos resultados, se puede observar la superioridad de las SVM sobre los otros dos modelos. En el caso de LDA los resultados de exactitud son similares a los obtenidos por una SVM utilizando un kernel lineal y que se mostraron en la figura 4.12(a) mientras que las ANN mostraron un desempeño inferior debido a la alta dimensionalidad de los datos y al escaso número de muestras para su entrenamiento. En promedio, después de 10 repeticiones LDA mostró una exactitud de $86.07 \pm 7.0\%$, para ANN el resultado fue de $72.28 \pm 14.10\%$ y para SVM fue de $98.33 \pm 2.68\%$.

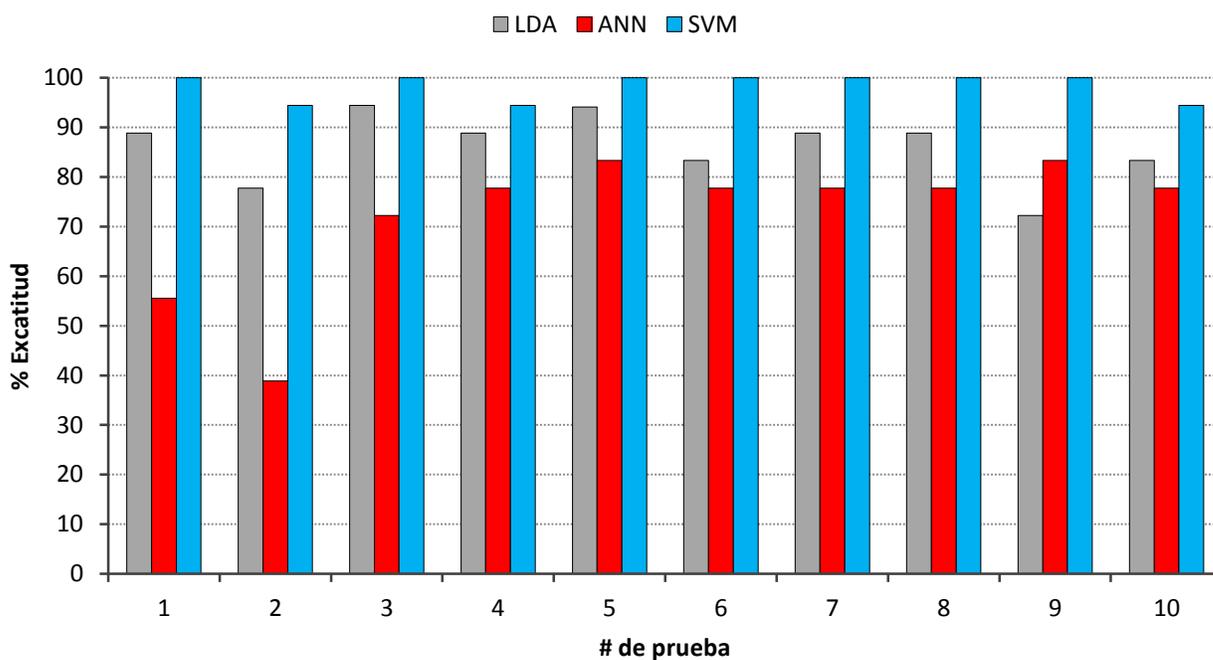


Figura 4.13 Resultados de exactitud para los 3 modelos entrenados: LDA, ANN y SVM

Los datos mostrados anteriormente muestran el desempeño en cuanto a exactitud de los clasificadores; sin embargo es necesario evaluarlos tomando en cuenta la discriminación que presentan entre clases. Para ello, se calcularon la sensibilidad y la especificidad de los tres modelos después de las 10 repeticiones de los datos de prueba. Los resultados obtenidos para el conjunto de prueba se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Resultados de sensibilidad y especificidad para los tres clasificadores entrenados.

Clase	LDA		ANN		SVM	
	Sensib. (%)	Especific. (%)	Sensib. (%)	Especific. (%)	Sensib. (%)	Especific. (%)
CA	85.7±6.51	91.12±7.72	82.26±22.34	74.33±17.90	97.49±4.10	100±0
CAO	88.49±10.19	87.22±6.02	74.26±11.99	76.33±16.59	100±0	97.76±3.66
PLO	100±0	100±0	0	98.37±3.45	100±0	100±0
Prom.	91.40±7.57	92.78±6.54	52.17±45.36	83.01±13.33	99.16±1.44	99.25±1.29

De acuerdo a los resultados anteriores y en base al conocimiento previo de la naturaleza del conjunto de muestras se pueden obtener las siguientes conclusiones. Las clases CA y CAO comparten la característica de ser cultivadas en terrenos con alturas superiores a 1200 m.s.n.m.; sin embargo, la clase CAO fue cultivada utilizando métodos orgánicos a diferencia de la clase CA en donde se utilizaron métodos convencionales. Por los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos por LDA, se puede apreciar que existe confusión entre algunos miembros de estas clases, mientras que SVM muestra una sensibilidad y especificidad superiores al 97% para discriminar entre las mismas. En cuanto a la clase PLO, a pesar de contar con el menor número de muestras entre las tres clases, estos granos presentan dos características distintivas: la altura a la que fueron cultivados y su procedencia orgánica. Los resultados de sensibilidad y especificidad avalan que tanto LDA como SVM son capaces de discriminar al 100% esta clase de las muestras CA y CAO.

Tanto los granos procedentes de cultivos orgánicos, como las diferencias en la altura de la zona de cultivo ha sido reportada por diferentes trabajos como un factores que influyen en la composición de los granos de café[80, 81] Esta misma discriminación ha sido estudiada por métodos instrumentales y organolépticos, y a pesar de que es una de las características reconocidas por la ICO y la NMX-F-551-SCFI-2008 no existe en México un sistema instrumental dedicado a la evaluación de la calidad del café mexicano. En el panorama mundial, la discriminación entra granos orgánicos y convencionales ha sido abordada previamente por algunos métodos instrumentales como INAA acoplado con quimiometría [81]. Sin embargo, la metodología desarrollada en el presente trabajo representa un avance en

términos de instrumentación sencilla y confiable ya que únicamente por el uso de un arreglo de sensores y el procesamiento de sus señales es posible llegar a resultados equiparables a los obtenidos con métodos instrumentales más complejos y sofisticados. Más aún, el sistema presentada en este trabajo es capaz de discriminar entre granos procedentes de cultivos a diferentes alturas con una sensibilidad y especificidad superiores al 99 %, lo que constituye el primer reporte exitoso de una metodología capaz de discriminar acertadamente esta característica[82]. Todo esto aunado a que los resultados se obtuvieron con un nulo pretratamiento de la muestra, lo que sitúa a la aportación de este trabajo como una alternativa viable para la evaluación de muestras de café en sistemas automatizados de calidad.

4.3.3 Clasificación de acuerdo al origen geográfico

La segunda clasificación que se llevó a cabo consistió en agrupar los datos provenientes del arreglo de sensores de acuerdo al origen geográfico de la muestra de café. Debido a las diferencias de cultivo que presentan las 31 muestras seleccionadas, se utilizaron sólo las muestras de la clase CA para realizar esta clasificación. Esta clase agrupa muestras provenientes de Veracruz, Chiapas y Oaxaca aunque sólo las dos primeras poseen DO. Las clases consideradas de acuerdo al origen geográfico fueron:

- Clase I. Café de Veracruz (cafés de altura cultivados a más de 1200 m.s.n.m en las regiones cafetaleras de Xico, Coatepec, Huatusco, y Córdoba)
- Clase II. Café de Chiapas (cafés de altura cultivados a más de 1200 m.s.n.m. en las regiones de Jaltenango, Tuxtla Gutiérrez y Tapachula)
- Clase III. Outliers (café de altura cultivado a más de 1200 m.s.n.m. en la región Pluma de Oaxaca y mezclas preparadas con granos cultivados en zonas de Oaxaca, Chiapas y Veracruz)

Para esta clasificación, los datos fueron divididos nuevamente en 70% para entrenamiento y 30% para validación. Para construir los clasificadores únicamente se utilizaron los modelos LDA y SVM, ya que las ANN mostraron un desempeño pobre debido a la dimensionalidad de los datos.

El primer clasificador empleado fue LDA, y la metodología basada en el centroide de las clases y el cálculo de la distancia euclidiana descrita en la sección 4.3.2 fue aplicada nuevamente para atribuir la pertenencia de las muestras a alguna de las tres clases establecidas. Los resultados de distribución en el espacio bidimensional obtenido se muestran en la figura 4.14.

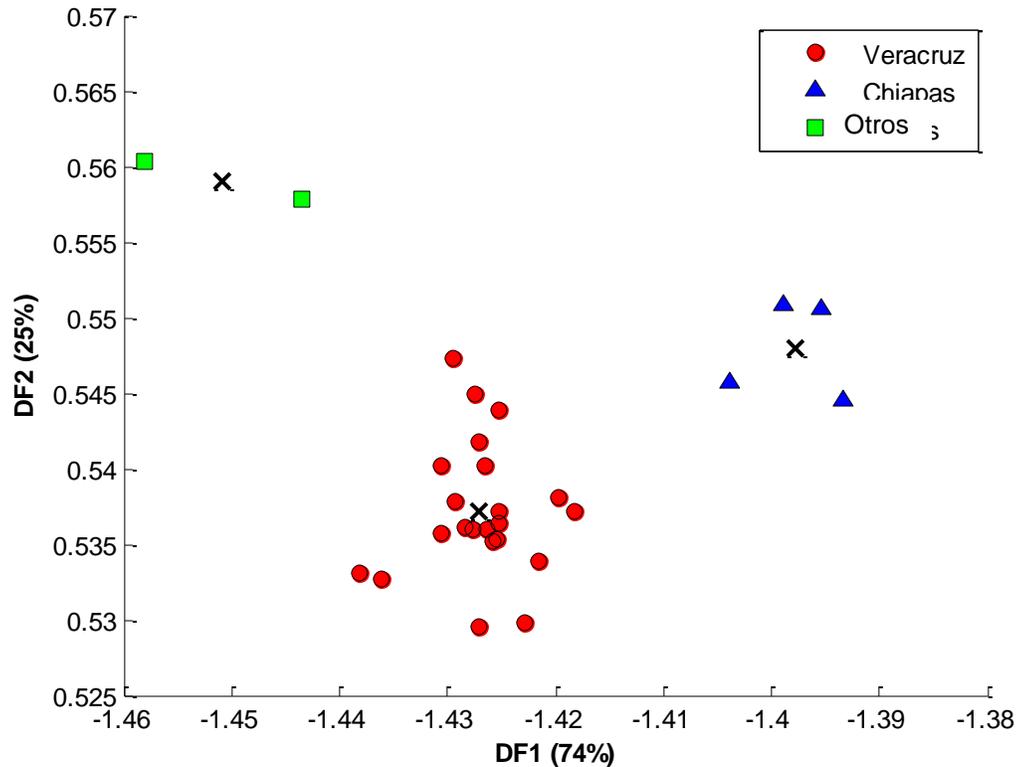


Figura 4.14 Espacio bidimensional para las muestras de café de diferentes regiones geográficas.

El segundo clasificador fue SVM y fue optimizado utilizando el proceso descrito en la sección 4.3.2 y nuevamente se utilizó un kernel gaussiano pero con parámetros $c 2 \times 10^5$ y $\gamma 2 \times 10^{-1}$. Los resultados de exactitud para los datos de prueba de ambos clasificadores se muestran en la figura 4.15. En la figura puede observarse que a diferencia de SVM, LDA presenta varias inconsistencias en el modelado de estos datos. Después de 10 repeticiones, la exactitud promedio de LDA fue de $83.3 \pm 13.02\%$, mientras que la de SVM fue de $100 \pm 0\%$.

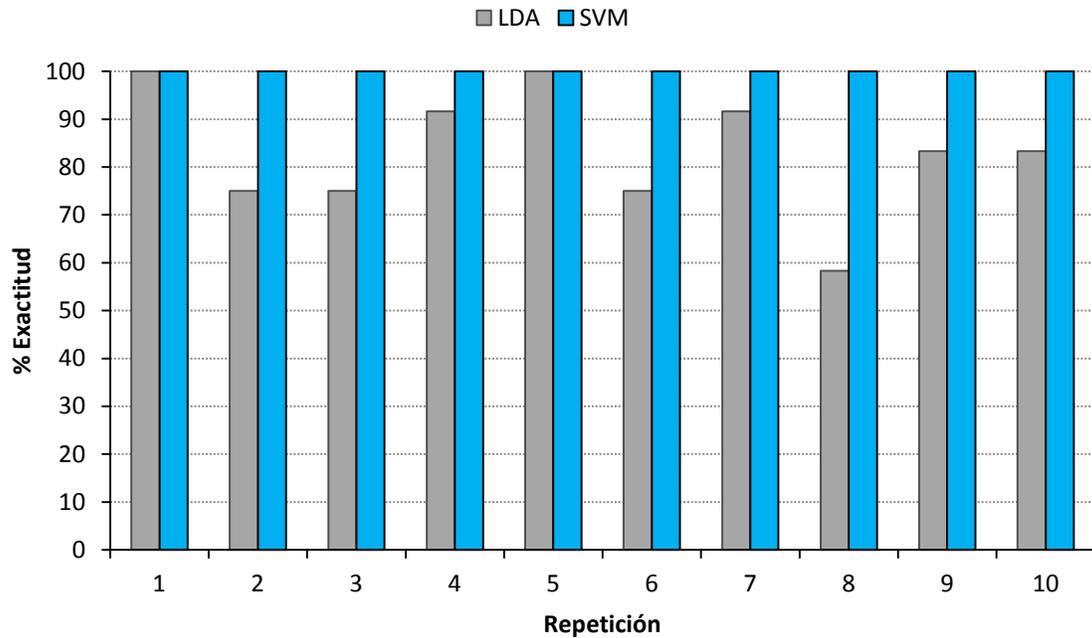


Figura 4.15 Resultados de exactitud para los 2 clasificadores de muestras de café de acuerdo a su origen geográfico.

Además de los resultados de exactitud, la sensibilidad y especificidad para cada modelo fueron calculadas después de 10 repeticiones. Al contar con una DO, las normas NOM-149-SCFI-2001 y NOM-169-SCFI-2007 establecen que existen diferencias en la composición de los granos de las regiones Veracruz y Chiapas. El modelo basado en LDA es capaz de determinar las diferencias entre algunas de las muestras de ambas clases; sin embargo SVM logra la discriminación de la totalidad de las muestras en las tres clases propuestas como se muestra en los resultados de la tabla 4.7.

Tabla 4.7 Resultados de sensibilidad y especificidad para la clasificación de muestras de café de acuerdo a su origen geográfico.

Class	LDA		SVM	
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Veracruz	81.10±15.24	90.83±14.93	100±0	100±0
Chiapas	81.66±33.74	88.66±11.22	100±0	100±0
Otros	100±0	92.70±6.56	100±0	100±0
Promedio	87.58±8.78	90.76±1.65	100±0	100±0

De acuerdo a los resultados presentados por la tabla 4.7, también es posible extraer algunas conclusiones significativas. El problema de la determinación geográfica ha sido una de los más estudiados por diferentes grupos de investigación. Las muestras de café ha sido abordadas previamente por diferentes estudios utilizando métodos instrumentales como INAA, NIR y perfiles genómicos para obtener información sobre su composición química y posteriormente relacionar estos datos con su origen geográfico[83-85]. En este sentido, existe un estudio previo que utiliza una lengua electrónica para clasificar muestras de café de acuerdo al origen geográfico. Sin embargo, el trabajo se enfoca en la medición de características que no comparten todas las muestras de café como la adición de vainilla[86]. Por otro lado, en estudios se hace hincapié en la necesidad de garantizar la veracidad del origen geográfico de las muestras para el modelado, algo que se garantizó en este estudio. Los resultados muestran que, las muestras con DO reconocidas por la ICO y las normas NOM-149-SCFI-2001 y NOM-169-SCFI-2007 son discriminadas de forma aceptable con un 83% por el modelo LDA y en forma óptima con un 100% por el modelo SVM.

A pesar de que ambas normas establecen los procedimientos instrumentales para el monitoreo de estas características en los granos de café, los productores locales recurren a pruebas organolépticas que muchas veces se ven influenciadas por la subjetividad del panel de expertos[62, 63]. De acuerdo a los resultados presentados, el desarrollo propuesto en este trabajo constituye una aportación eficaz para la discriminación de muestras de café incluidas aquellas con DO. Los resultados obtenidos son superiores a los presentados por métodos instrumentales más sofisticados en la misma tarea de clasificación con un conjunto similar de muestras[85]. Además de las ventajas presentadas en exactitud, sensibilidad y especificidad, el

presente desarrollo constituye una aportación valiosa a nivel instrumental en la evaluación de características cruciales asociadas a la calidad y origen del café. También, nuevamente se hace énfasis en el pretratamiento nulo que requiere el análisis de muestras de café empleando instrumentación basada en LEs y procesamiento quimiométrico.

4.4 Análisis de muestras de cerveza empleando lenguas electrónicas voltamperométricas

En la sección 3.4 se proporcionaron algunos datos respecto al consumo de cerveza en México. A pesar de que el mercado se encuentra dominado casi en su totalidad por marcas comerciales internacionales, se prevé un crecimiento para los productores artesanales de este líquido. Esto abre la posibilidad para la implementación de sistemas analíticos que puedan ser incluidos como método de control en ciertos puntos de proceso de producción artesanal. El objetivo de esta aplicación es la creación de un sistema basado en arreglos de sensores que sea capaz de diferenciar las características entre un conjunto de muestras de cerveza artesanal y comercial obtenida de diferentes puntos del país. Como se mencionó en la sección 3.4, las cervezas no manejan un sistema de denominación de origen sino que son categorizadas en base a su tipo de fermentación y a ciertas características que otorgan elementos como el tostado de la malta y la cantidad de lúpulo añadida. El objetivo del clasificador, es discriminar las muestras en base a las características de estilo mostradas en la tabla 3.8. Ya que se trata de una bebida alcohólica, durante el experimental se utilizaron muestras diluidas en proporción 1/3 de acuerdo a reportes experimentales anteriores[14]. Sin embargo, también se presentan los resultados obtenidos del análisis de muestras sin ningún pretratamiento o dilución previo a su medición.

4.4.1 Análisis de muestras de cerveza diluidas

Al igual que en la sección anterior, se realizó un análisis exploratorio empleando las técnicas PARAFAC y PCA. Cada voltamperograma consta de 522 intensidades por cada sensor, y ya que se tomaron 4 registros se utilizaron los 3 últimos para realizar el modelado. Estos registros fueron centrados y estandarizados, de acuerdo a las condiciones para ambos modelos. Los 3 registros fueron incorporados en forma matrizada al modelo PCA, lo que resultó en un arreglo de 1044x36 (intensidades de 2 sensores x muestra de 3 registros) para PCA y tres tensores de 12X522x2 para PARFAC (muestras x intensidades x sensor). Lo anterior se hizo para respetar

el modelo de 3 vías de PARAFAC para cada registro. La figura 4.16 muestra la distribución de las muestras de los 3 registros para PCA y la figura 4.17 muestra el ejemplo de dos modelo PARAFAC para dos tensores de los registros 3 y 4.

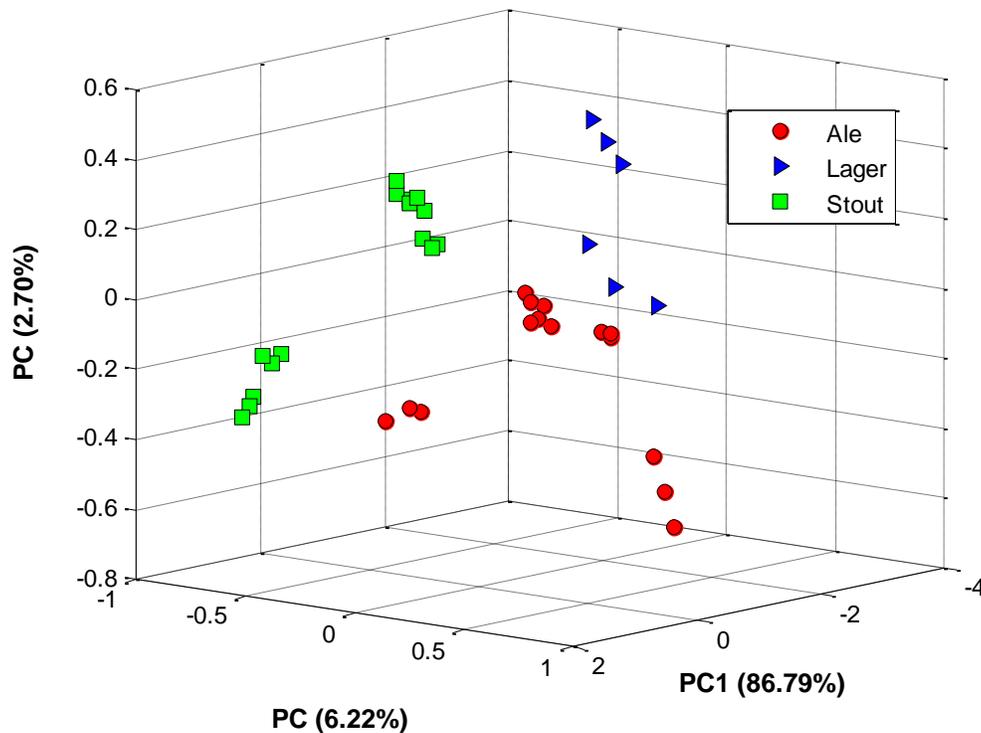


Figura 4.16 PCA para 3 registros de 12 muestras de cerveza diluidas.

Las tres clases establecidas para esta clasificación son:

- Clase I. Ale
- Clase II. Lager
- Clase III. Stout

Aunque dentro de las muestras existen cervezas de tipo American Pale Ale e Indian Pale Ale se agruparon junto a los tipos Brown Ale y Red Ale ya que todas comparten un tostado similar en la malta y el tipo de fermentación. De acuerdo a la propuesta de esta clasificación, en la figura 4.16 se aprecia una tendencia de agrupamiento para las tres clases, si bien existe mayor dispersión en las clases de mayor número de individuos. Para el modelo PCA la varianza acumulada para tres componentes fue de 95.71%. En contraste, las figuras 4.17 (a) y (b) muestran los modelos PARAFAC para los registros 3 y 4. Ya que PARAFAC utiliza una estructura de 3 vías, la primera vía considerada fueron las muestras, la segunda fueron los

potenciales registrados y la tercera los sensores del arreglo. Como se mencionó en la sección 2, cada modelo PARAFAC es único y no tiene libertad de rotación como en el caso de PCA. Esto ocasiona diferencias en la distribución de las muestras en cada modelo.

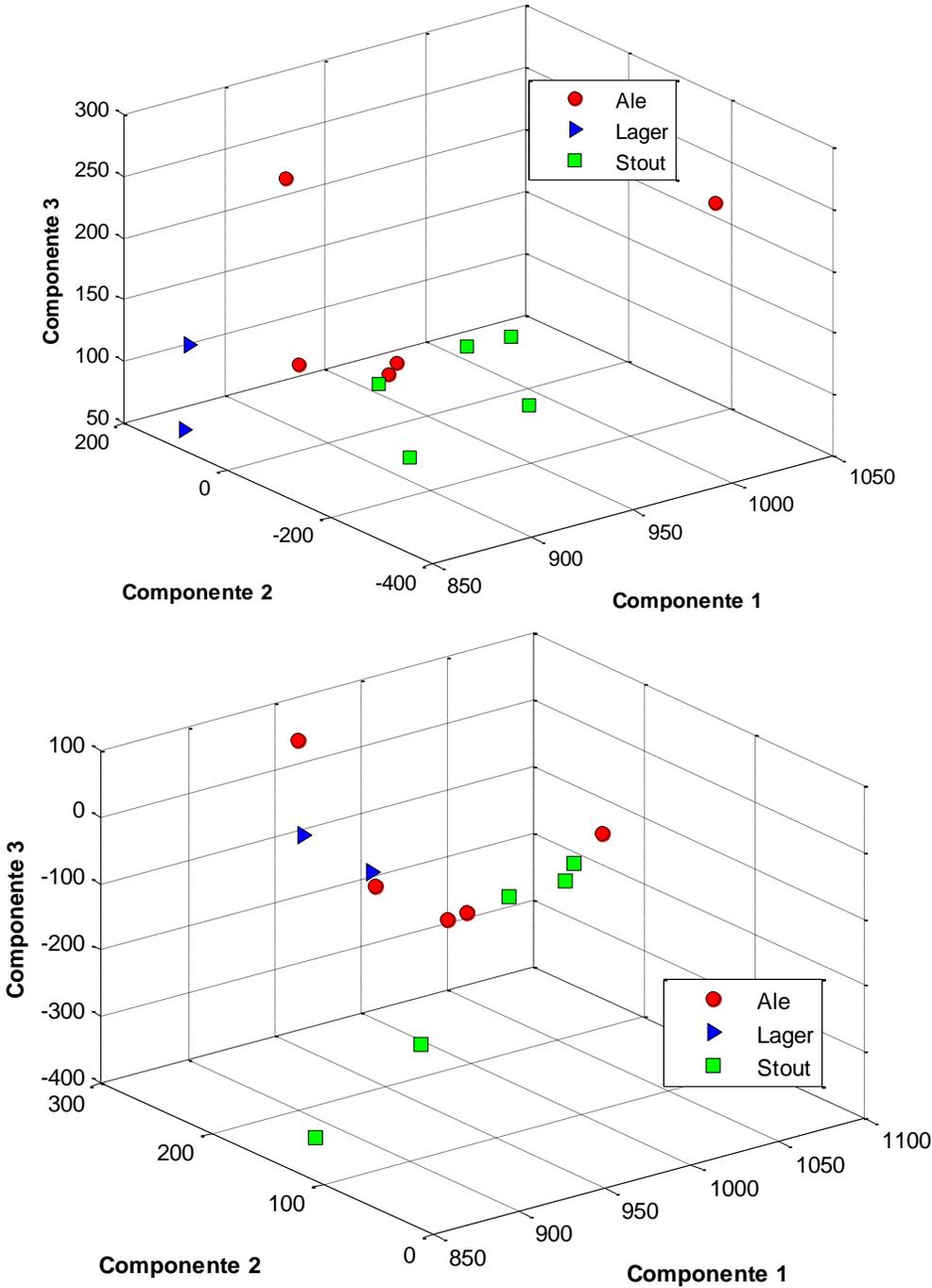


Figura 4.17 Modelos PARAFAC para 2 registros de 12 muestras de cerveza diluidas.

Por la tendencia mostrada en los modelos de análisis exploratorio, especialmente en PCA, se utilizaron los scores como características para entrenar dos clasificadores supervisados. El primero de ellos fue LDA y el segundo fue ANN. En el caso de PCA, para la etapa de entrenamiento se seleccionaron de manera aleatoria el 70% de las scores de las 3 primeras componentes del modelo y para la etapa de validación se utilizaron el 30% restante de los datos. En el caso de PARAFAC, los datos fueron aleatorizados y se utilizó el modo 1 de los dos primeros registros para el entrenamiento y el tercero para la validación. La operación también fue repetida 10 veces.

Dado las diferencias en *scores* de PARAFAC, debido a la unicidad de sus modelos, los resultados no fueron consistentes y se utilizaron únicamente los *scores* de PCA. La figura 4.18 muestra la distribución de las muestras en el espacio obtenido con dos funciones discriminantes. Como puede observarse la mayor capacidad discriminante está contenida en la componente 1.

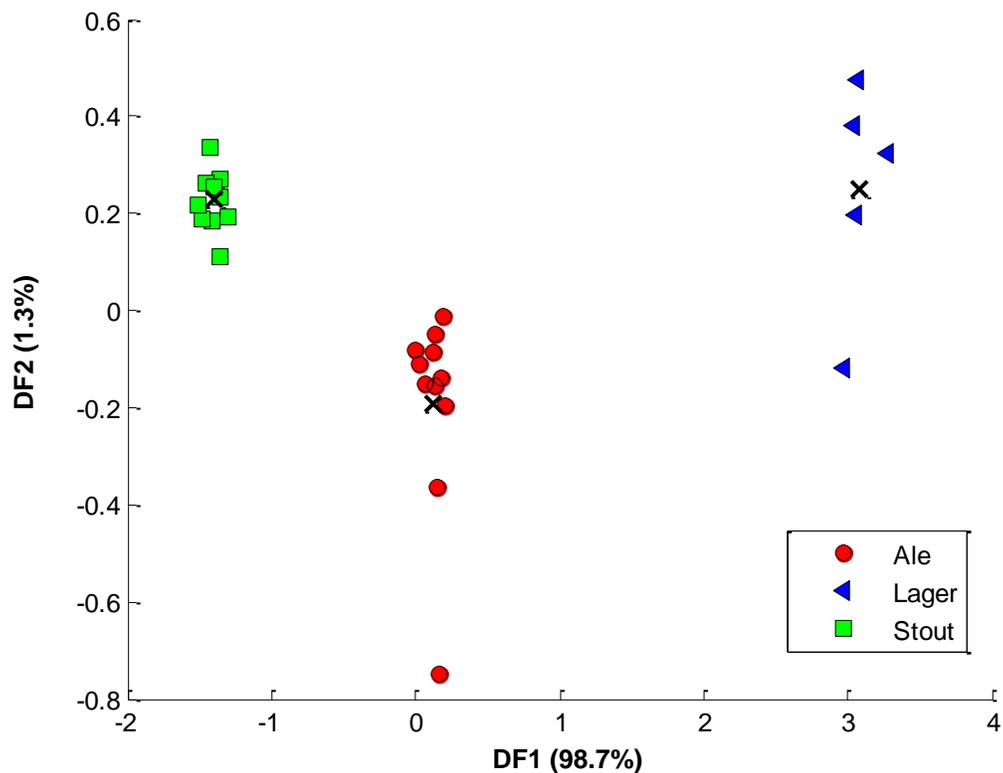


Figura 4.18 Espacio bidimensional para la distribución de las 3 clases de cerveza

Para el modelo basado en ANN se probaron configuraciones con 12, 7, 5, y 3 neuronas en la capa oculta. De la misma manera se utilizaron dos métodos de entrenamiento: gradiente descendiente y regularización bayesiana. El modelo final utilizado cuenta con 3 neuronas en la capa oculta y fue entrenado utilizando regularización bayesiana. Tras 10 repeticiones con datos aleatorios el resultado de exactitud en el conjunto de prueba fue de $100\pm 0\%$ para ambos modelos. La tabla 4.8 muestra los resultados de sensibilidad y especificidad para cada clase.

Tabla 4.8 Resultados de sensibilidad y especificidad para la clasificación de muestras de cerveza diluidas de acuerdo su estilo

Clase	LDA		ANN	
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Ale	100±0	100±0	100±0	100±0
Lager	100±0	100±0	100±0	100±0
Stout	100±0	100±0	100±0	100±0
Promedio	100±0	100±0	100±0	100±0

4.4.2 Análisis de muestras de cerveza concentradas

Para la clasificación de estas muestras se partió del análisis exploratorio del modelo PCA para 12 muestras de cerveza que no fueron diluidas ni sufrieron pretratamiento alguno. Nuevamente, los registros fueron centrados y estandarizados y el arreglo matricado fue de 1044×36 (intensidades de 2 sensores x muestra de 3 registros). El resultado de la distribución para tres componentes se muestra en la figura 4.18.

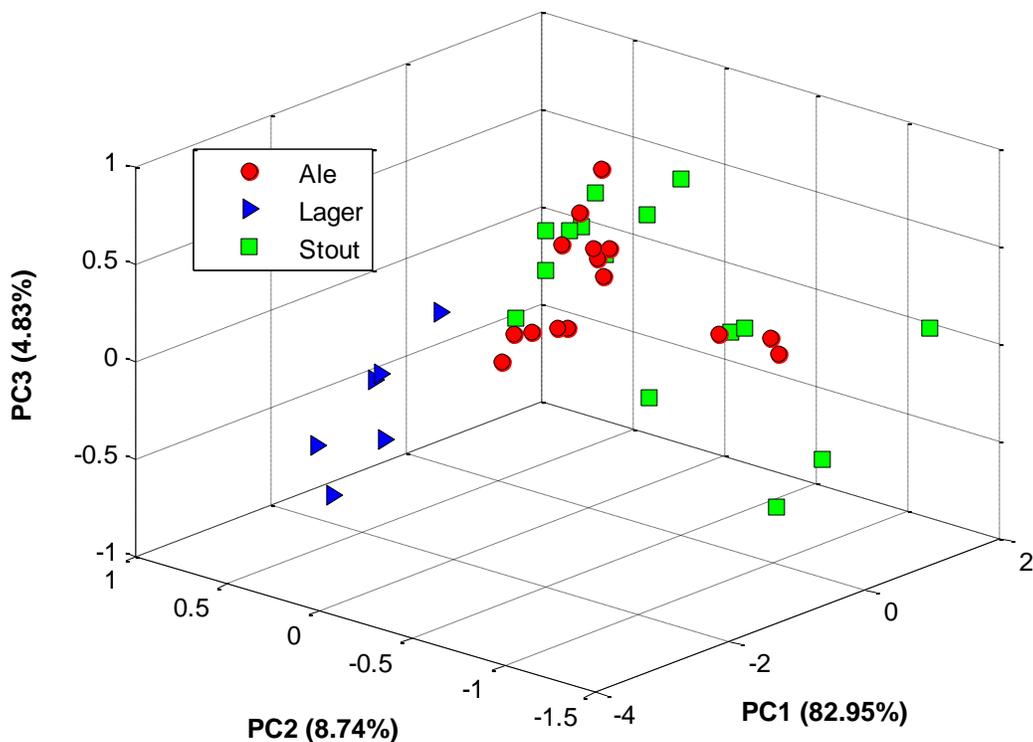


Figura 4.19 PCA para 3 registros de 12 muestras de cerveza concentradas.

La varianza acumulada para este conjunto de muestras fue de 96.52% y, como puede observarse en la figura, la primera separación visible es para la clase Lager. La clase Ale y Stout tienen una dispersión mayor que en el PCA obtenido para muestras diluidas.

Nuevamente, los scores fueron utilizados como punto de partida para entrenar los modelos LDA y ANN. Se utilizaron 70% de los *scores* como datos de entrada para el entrenamiento y el 30% se utilizó para la validación. La figura 4.20 muestra la distribución de las clases en el espacio bidimensional formado por dos funciones discriminantes. Como puede apreciarse, la distribución de la figura 4.20 es similar a la figura 4.19 con mayor dispersión en cada clase pero manteniendo la separación entre cada una. Al igual que en el caso anterior, la mayor capacidad discriminante está contenida en la función 1.

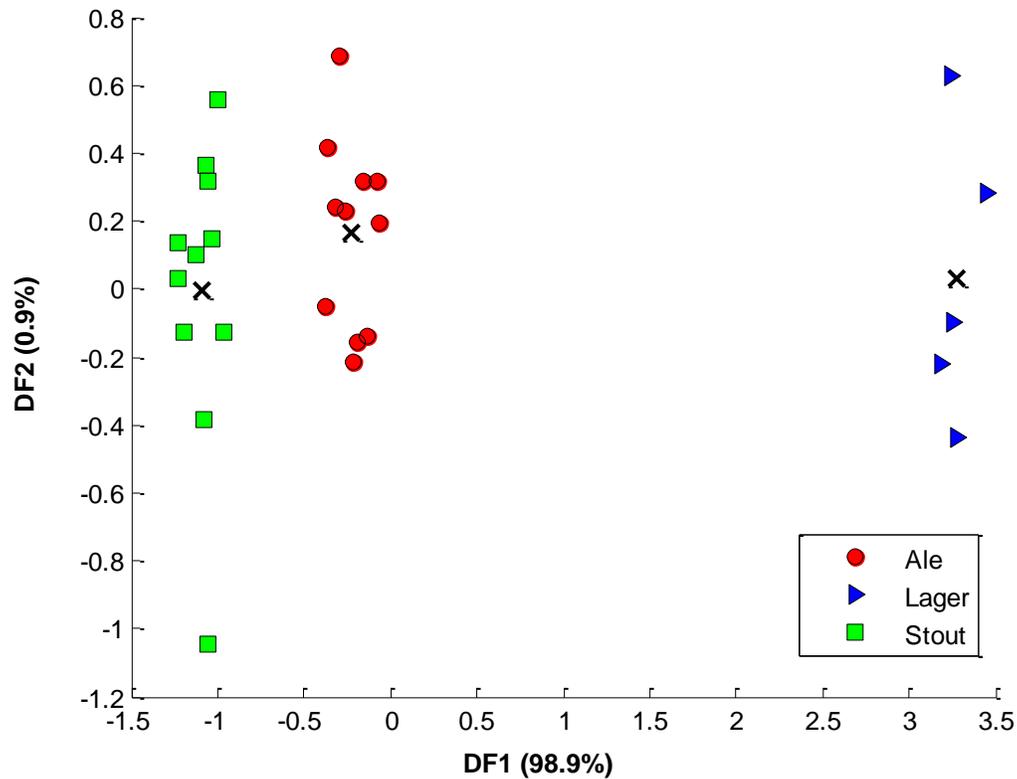


Figura 4.20 Espacio bidimensional para la distribución de las 3 clases de cerveza

Para el modelo neuronal se probaron configuraciones con 5, 3 y 2 neuronas en la capa oculta, mientras que en el entrenamiento se utilizó la regularización bayesiana. En todos los casos, en las neuronas de la capa oculta se utilizó una función tangente sigmoideal y en la neurona de salida se utilizó una función lineal. El modelo final utilizó 2 neuronas en 1 capa oculta, 1 neurona en la capa de salida y fue entrenado regularización bayesiana.

Tras 10 repeticiones de cada modelo con datos aleatorios el resultado de exactitud en el conjunto de prueba fue de $100\pm 0\%$ para ambos modelos. La tabla 4.9 muestra los resultados de sensibilidad y especificidad para cada clase.

Tabla 4.9 Resultados de sensibilidad y especificidad para la clasificación de muestras de cerveza concentradas de acuerdo su estilo

Clase	LDA		ANN	
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Ale	100±0	100±0	100±0	100±0
Lager	100±0	100±0	100±0	100±0
Stout	100±0	100±0	100±0	100±0
Promedio	100±0	100±0	100±0	100±0

Los resultados obtenidos para esta aplicación en ambas muestras son congruentes con estudios reportando la clasificación de cerveza de acuerdo al estilo de fabricación[14, 87]. En ambos casos, tanto para muestras diluidas como concentradas, la distribución en la función discriminante 1 podría utilizarse para diferenciar las muestras de acuerdo a su fabricación (artesanal o comercial), al tipo de fermentación (lager o ale) e incluso al contenido alcohólico. Aunque siguiendo reportes previos, se realizó una dilución de las muestras, los resultados obtenidos para el conjunto de muestras concentradas sugieren que podría eliminarse este paso adicional sin que existan efectos indeseables en la clasificación final[14]. Un punto sobresaliente del análisis de muestras complejas, sin pretratamiento, es la posibilidad de monitoreo y evaluación en campo[14, 87]. Tanto los resultados en muestras sin tratamiento en café y cerveza sugieren que es posible la inclusión de un sistema en línea basado en lenguas electrónicas para la evaluación de muestras líquidas en el campo alimenticio, [3, 88].

Capítulo V

Conclusiones y Perspectivas

5. Conclusiones y Perspectivas

El objetivo de este trabajo fue desarrollar nuevos sistemas de monitoreo incorporando dispositivos de sensado químico como los biosensores y las lenguas electrónicas. Para lograrlo, se abordaron varios aspectos como el tratamiento de la información proveniente de los sensores y en el desarrollo de la instrumentación necesaria para la automatización de los experimentales. En todos los casos, se buscó transformar la información química proveniente de los sensores en información analítica útil acerca de las muestras analizadas.

A través de los resultados descritos en el capítulo 4 de este trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones.

5.1 Desarrollo de sistemas basados en biosensores.

Los biosensores son un campo prolífico de investigación que durante las últimas décadas ha producido gran cantidad de literatura científica concerniente a nuevas técnicas de inmovilización, nuevos bioreceptores y materiales selectivos. Pocos trabajos se han enfocado en desarrollar soluciones tecnológicas que permitan la implementación de estos dispositivos de sensado en sistemas de monitoreo o control dedicados.

Las dos aplicaciones de cuantificación que se presentaron en el capítulo III y IV, se han centrado en la detección de un analito objetivo haciendo uso de instrumentación original desarrollada en el presente trabajo. Previo a la implementación del sistema, tanto el biosensor enzimático como el inmunosensor electroquímico fueron validados como métodos de detección de forma manual o *batch*. Por medio de la implementación de las herramientas

desarrolladas en el presente trabajo fue posible la manipulación y renovación de la capa biosensora con un procedimiento automatizado. Lo anterior constituye un aporte original al campo de la instrumentación electroquímica, así como una contribución importante al desarrollo tecnológico para la implementación de biosensores como métodos de detección en sistemas de cuantificación en línea.

En ambos casos, el aporte del sistema de flujo no se limitó únicamente a la automatización de la fabricación de los biosensores y el procedimiento experimental. En el caso de la detección de CPO por medio de un biosensor enzimático, la automatización permitió no sólo la mínima intervención del usuario, sino obtener un límite de detección de $0.1\mu\text{g/L}$ de CPO, lo que se encuentra dentro de los límites aceptados por la regulación europea. Trabajos como el de Mishra *et al*, donde se utiliza el mismo sistema desarrollado en el presente trabajo, sugieren también que los beneficios de los experimentales en flujo se ven reflejados en el aumento de sensibilidad del procedimiento experimental para la detección de los analitos objetivos. Por otro lado, el monitoreo de ácido okadaico por medio del sistema de flujo desarrollado también condujo a un límite de detección de $0.19\mu\text{g/Kg}$ de AO, lo que se encuentra por debajo de los límites aceptados por la regulación europea. Cabe destacar que en este caso, para el registro de las señales se utilizó amperometría, en contraposición con el trabajo original en donde se utilizó voltamperometría diferencial de pulsos, sin que el límite de detección se viera afectado de manera negativa. En la parte analítica, tanto la detección de CPO como de AO fueron validadas con muestras reales obteniéndose un porcentaje de recuperación superior al 96% en ambos casos.

Como se mencionó en el capítulo anterior, el aporte más significativo consiste en el desarrollo de un sistema que puede ser adaptado como plataforma general para la detección en línea de analitos utilizando biosensores como método de detección. Aunque en el presente trabajo se utilizaron partículas magnéticas, el sistema posee la flexibilidad de adaptarse a otros métodos de inmovilización sin perder ninguna característica de automatización o sensibilidad. Así mismo es posible incorporar otras técnicas de medición que contribuyan a mejorar las características analíticas mostradas las aplicaciones con CPO y AO.

5.2 Desarrollo de sistemas basados en lenguas electrónicas

Los sistemas de monitoreo basados en lenguas electrónicas han sido probados sobre todo en aplicaciones ambientales, clínicas y alimenticias. En este último sector existe una creciente demanda de sistemas de monitoreo que permiten describir características importantes de muestras alimenticias, sobre todo aquellas asociadas a la calidad de los alimentos. Características como el origen geográfico para evaluar la denominación de origen de un producto o la procedencia orgánica de un alimento son de interés para el sector alimenticio.

En el primer desarrollo basado en lenguas electrónicas se realizó el análisis de un conjunto de muestras de café provenientes de diferentes regiones del país. En este caso, la inclusión de nuevos métodos de aprendizaje supervisado como las máquinas de vector soporte, permitió descifrar de forma eficiente la información proveniente del arreglo de sensores voltamperométricos y establecer características distintivas para cada grupo de muestras.

En una primera clasificación, la LE implementada acoplada con la SVM fue capaz de discriminar muestras de acuerdo al proceso de cultivo. Esto incluyó diferencias entre muestras que fueron cultivadas a altura superiores a 1200 m.s.n.m y muestras que fueron cultivadas a esta misma altura pero con procedimientos orgánicos. Así mismo se logró diferenciar entre muestras cultivadas a alturas menores a 600 m.s.n.m. Estas características, reconocidas por las normas mexicanas e internacionales, son utilizadas por los productores mexicanos para evaluar la calidad de los granos de café. En este sentido, si bien existen otros estudios que abordan la diferencia entre granos de café orgánico y granos de café convencionales la instrumentación utilizada en esos procedimientos suele ser compleja y costosa. Por otro lado, aunque se han encontrado diferencias entre los granos de café cultivados a diferentes alturas, no existe un reporte acerca de un método instrumental dedicado a discriminar esta característica. Por tanto la aportación del sistema desarrollado en este trabajo consiste en identificar eficazmente características importantes como el origen orgánico de las muestras con una exactitud equiparable a los métodos instrumentales actuales. Por otro lado, el mismo sistema se encarga de discriminar muestras de café en función de su altura siendo este el primer método dedicado a tal labor.

La segunda clasificación consistió en discriminar las muestras de café de acuerdo a su origen geográfico. Debido a las normas de autenticación, el problema de la clasificación de muestras de acuerdo a su origen geográfico ha sido extensamente estudiado. Pero, al igual que en el caso anterior, las técnicas de pretratamiento y medición involucradas en el análisis son complejas y exhaustivas. Los resultados de exactitud obtenidos con la metodología propuesta basada en una LE acoplada a una SVM fueron para, este conjunto de muestras, del 100%. Este resultado es superior a otras metodologías que han abordado el problema, incluso de café mexicano. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se ajustan bien a la clasificación de DO para los estados de Chiapas y Veracruz y constituyen una alternativa prometedora en el monitoreo en línea de muestras de café, ya que a diferencia de otras técnicas instrumentales la metodología propuesta implica un pretratamiento nulo.

La descripción de la última aplicación consiste en la clasificación de muestras de cervezas artesanal y comercial, proveniente de diferentes regiones del país y fabricadas por diferentes métodos. Al ser la cerveza una bebida con contenido alcohólico, para su análisis se realizó primero una dilución de la muestra y después se realizó la medición de una muestra sin diluir. La aplicación de técnicas exploratorias como PCA, permitió la compactación de los datos para establecer la diferencia entre tres clases de acuerdo a su estilo de fabricación. El procesamiento también reveló que no existen diferencias significativas entre el análisis realizado con muestras diluidas o muestras concentradas, lo que sugiere la posibilidad de implementar sistemas de análisis *in situ* sin la necesidad de alterar la composición de las muestras de cerveza. Además de la clasificación de acuerdo al estilo de fabricación, la distribución de las muestras en la función discriminante sugiere que podría tomarse otro parámetro para la clasificación como el tipo de fermentación y el contenido alcohólico. El origen geográfico no fue analizado en este caso, ya que las cervezas no manejan un sistema de denominación de origen como sí lo hacen otras bebidas alcohólicas. Los resultados obtenidos por esta aplicación se encuentran en concordancia con los obtenidos por otros desarrollos basados en LEs voltamperométricas. Finalmente, cabe señalar que en ambos casos, el análisis basado en arreglos de sensores y procesamiento quimiométrico demostró representar una alternativa promisoriosa en el campo del monitoreo alimenticio.

5.3 Trabajo a futuro

Como parte de los objetivos iniciales, se planteó la aplicación de métodos quimiométricos para el análisis de biosensores. En este punto, los datos experimentales obtenidos a partir de las mediciones con biosensores resultaron ser insuficiente para construir un modelo adecuado o más robusto que los que se presentan en la sección de resultados del capítulo IV. Esto no implica, sin embargo, que el procesamiento quimiométrico no sea adecuado para las señales provenientes de biosensores. Más bien, al igual que sucede con las lenguas electrónicas, es deseable el uso de más de un elemento sensitivo que brinde información. Otro caso interesante sería el uso de otras técnicas de medición, como voltamperometría cíclica o impedanciometría, que arrojaran información sobre fenómenos redox en el biosensor o sobre el impacto de la frecuencia en las mediciones.

Así mismo la miniaturización del sistema de flujo no fue abordada en este trabajo, pero se reconoce su importancia en aplicaciones futuras. El sistema desarrollado en este trabajo entraría en la clasificación de microfluidos programables, ya que maneja volúmenes del orden de los microlitros y permite controlarlos automáticamente por medio de la bomba de jeringa. A pesar de que las técnicas Lab on Chip (LOC) son un campo de investigación sumamente activo en este momento, la perspectiva del trabajo a futuro no es simplemente miniaturizar el sistema sino dotarlo de paralelismo. En las detecciones de pesticida y en los inmunoensayos se mencionó que el tiempo de operación del sistema era similar a la operación manual, por lo que para incrementar su frecuencia de muestreo sería interesante proponer nuevas técnicas como Lab on Valve (LOV) o Multi Syringe Flow Injection Analysis (MSFIA) para mejorar el número de muestras que el sistema es capaz de analizar en un período de tiempo determinado. Ambas técnicas son también versiones disminuidas de los sistemas de fluidos programables, sin llegar a operar en volúmenes de nanolitros como los LOC.

5.4 Productos obtenidos del desarrollo de esta tesis

Las publicaciones obtenidas de este trabajo doctoral son 5 artículos en revistas indexadas de prestigio internacional: 4 aceptados y unos más en revisión. También se obtuvo un capítulo de

libro, la asistencia 3 congresos internacionales y la publicación artículos en extenso en memoras de congresos.

Capítulo de libro

R.B. Domínguez, G.A. Alonso, R. Muñoz, J. L. Marty (2014). “*Continuous monitoring based on biosensors coupled with artificial intelligence*” In M. Stoytcheva & J.F. Osma (Eds.). Biosensors: Recent Advances and Mathematcal Challenges. Barcelona: España, OmniaScience. pp. 143-161

Artículos en Revistas Internacionales

Artículo 1

G.A. Alonso, **R.B. Domínguez**, R. Muñoz, J.L. Marty “*An approach to an inhibition electronic tongue to detect on-line organophosphorous pesticides using a computer controlled multi commuted flow system*”. Sensors 11(2011)3791-3802

Artículo 2

R.K. Mishra, **R.B. Domínguez**, S. Bhand, R. Muñoz, J.L. Marty “*A novel automated flow based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk*”. Biosensors and Bioelectronics. 32(2012)56-61

Artículo 3

R.B. Domínguez, A. Hayat, A. Sassolas, G.A. Alonso, R. Muñoz, J.L. Marty “*Automated flow-through amperometric immunosensor for highly sensitive and on-line detection of okadaic acid in mussel sample* ”. Talanta 99(2012)232-237

Artículo 4

R.B. Dominguez, L. Moreno-Barón, R. Muñoz, J.M. Gutiérrez “*Voltammetric Electronic Tongue and Support Vector Machines for Identification of Selected Features in Mexican Coffee*”. Sensors 2014, 14(9)

En revisión

R.B. Domínguez , G.A. Alonso , R. Muñoz , A. Hayat, J. L. Marty “*Design of a novel magnetic particles based electrochemical biosensor for organophosphate insecticide detection in flow injection analysis*”. Enviado en octubre de 2014

Presentaciones Orales en Congresos Internacionales

R.B. Domínguez, R. Munoz, and H. Araiza, "Sequential injection analysis system for electronic tongues modelling and calibration process," *2010 7th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE 2010) (Formerly known as ICEEE)*, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Septiembre 28-30, 2010.

R.B. Domínguez, S.A. Lopez-Haro, R. Muñoz and L. Leija, “ On the advances of a virtual system for electronic tongue development,” *First International Conference on Applied Bionics and Bioelectronics (ICABB-2010)*. Venecia, Italia .Octubre 14-16, 2010

R.B. Domínguez, R. Munoz, and H. Araiza, "Automated analytical system based on the SIA technique," *2010 Pan American Health Care Exchanges (PAHCE 2010)*, Marzo 15-19 2010, Lima, Perú.

Posters

“*Development of a fully automated flow-through system for immunoassay applications*”. **R.B. Domínguez**, A. Hayat, R. Muñoz, J.L. Marty. Biosensors 2012, Cancún, México 15-18 de Mayo

“*Rapid and automatic calibration of screen-printed biosensors using a reconfigurable flow bead injection system and artificial neural networks*”. **R.B. Domínguez**, G.A. Alonso, J.M. Gutierrez, R. Muñoz, J.L. Marty. Biosensors 2012, Cancún, México 15-18 de Mayo

“Bead injection flow system for automatic calibration of AChE screen printed biosensors”.

R.B. Domínguez, G.A. Alonso, R. Muñoz, J.L. Marty. XVIèmes RENCONTRES TRANSFRONTALIÈRES « CAPTEURS ET BIOCAPTEURS ». Toulouse, Francia 29-30 Septiembre 2011

Memorias en extenso

L. Velazquez, M. Hernández, M. Leon, **R. B. Dominguez**, and J. Gutierrez, "First advances on the development of a hydroponic system for cherry tomato culture," in *Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE), 2013 10th International Conference on*, 2013, pp. 155-159.

R.B. Dominguez, R. Munoz, and H. Araiza, "Sequential injection analysis system for electronic tongues modelling and calibration process," *2010 7th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE 2010) (Formerly known as ICEEE)*, pp. 280-4, 2010

D. Bueno, R. Munoz, G. Silverio, S. Ravelo, and **R.B. Dominguez**, "Characterization of biosensors for the detection of pesticides using a sequential injection analysis system," in *2010 7th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE 2010) (Formerly known as ICEEE)*, Tuxtla Gutierrez, Mexico, 2010, pp. 429-433

R.B. Dominguez, R. Munoz, and H. Araiza, "Automated analytical system based on the SIA technique," *2010 Pan American Health Care Exchanges (PAHCE 2010)*, pp. 117-19, 2010.

Bibliografía

Bibliografía

- [1] K. Toko, *Biomimetic sensor technology*: Cambridge University Press, 2000.
- [2] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, and G. Palleschi, "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 21, pp. 1405-1423, Feb 15 2006.
- [3] L. Escuder-Gilabert and M. Peris, "Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis," *Analytica Chimica Acta*, vol. 665, pp. 15-25, Apr 2010.
- [4] J. Cazes, *Analytical instrumentation handbook*: CRC Press, 2004.
- [5] A. Hulanicki, S. Glab, and F. Ingman, "Chemical sensors: definitions and classification," *Pure and applied chemistry*, vol. 63, pp. 1247-1250, 1991.
- [6] J. Janata, *Principles of chemical sensors*: Springer, 2009.
- [7] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, and A. D'amico, "Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 77, pp. 1965-1983, 2005.
- [8] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 16, pp. 121-131, 2001.
- [9] M. Cortina, M. del Valle, and J.-L. Marty, "Electronic tongue using an enzyme inhibition biosensor array for the resolution of pesticide mixtures," *Electroanalysis*, vol. 20, pp. 54-60, Jan 2008.
- [10] A. Crew, D. Lonsdale, N. Byrd, R. Pittson, and J. P. Hart, "A screen-printed, amperometric biosensor array incorporated into a novel automated system for the simultaneous determination of organophosphate pesticides," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 26, pp. 2847-2851, Feb 15 2011.
- [11] G. Istarboulie, S. Andreescu, J.-L. Marty, and T. Noguier, "Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 23, pp. 506-512, Nov 30 2007.
- [12] M. Campas, D. Szydłowska, M. Trojanowicz, and J. L. Marty, "Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria," *Talanta*, vol. 72, pp. 179-186, Apr 2007.
- [13] M. Jakubowska, "Signal Processing in Electrochemistry," *Electroanalysis*, vol. 23, pp. 553-572, Mar 2011.

- [14] X. Cetó, M. Gutiérrez-Capitán, D. Calvo, and M. del Valle, "Beer classification by means of a potentiometric electronic tongue," *Food chemistry*, vol. 141, pp. 2533-2540, 2013.
- [15] J. Ogródzki, "Chemical sensors for water monitoring - diversity of approaches to behavioral modeling," *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 7502, pp. 750227 (9 pp.)-750227 (9 pp.), 2009 2009.
- [16] M. Esteban, C. Arino, and J. M. Diaz-Cruz, "Chemometrics for the analysis of voltammetric data," *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 25, pp. 86-92, Jan 2006.
- [17] D. W. Kimmel, G. LeBlanc, M. E. Meschievitz, and D. E. Cliffel, "Electrochemical Sensors and Biosensors," *Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 685-707, Jan 17 2012.
- [18] F. J. Holler, D. Skoog, and S. Crouch, "Principles of instrumental analysis," *Belmont: Thomson*, 2007.
- [19] P. Gründler, *Chemical sensors: an introduction for scientists and engineers*: Springer, 2007.
- [20] J. M. G. Salgado, "Sistema de monitoreo en tiempo real para la cuantificación de compuestos en soluciones acuosas basadas en lenguas electrónicas híbridas e inteligencia artificial.," PhD, Ingeniería Eléctrica, Cinvestav, México D.F., 2008.
- [21] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnology Advances*, vol. 30, pp. 489-511, May-Jun 2012.
- [22] M. del Valle, "Electronic Tongues Employing Electrochemical Sensors," *Electroanalysis*, vol. 22, pp. 1539-1555, Jul 2010.
- [23] D. Ebrahimi, E. Chow, J. J. Gooding, and D. B. Hibbert, "Multi-analyte sensing: a chemometrics approach to understanding the merits of electrode arrays versus single electrodes," *Analyst*, vol. 133, pp. 1090-1096, 2008.
- [24] A. Mimendia, J. M. Gutierrez, L. Leija, P. R. Hernandez, L. Favari, R. Munoz, *et al.*, "A review of the use of the potentiometric electronic tongue in the monitoring of environmental systems," *Environmental Modelling & Software*, vol. 25, pp. 1023-1030, Sep 2010.
- [25] M. Esteban, C. Arino, and J. M. Diaz-Cruz, "Chemometrics in electroanalytical chemistry," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 36, pp. 295-313, 2006 2006.
- [26] R. G. Brereton, *Applied chemometrics for scientists*: John Wiley & Sons, 2007.
- [27] G. M. Escandar, N. M. Faber, H. C. Goicoechea, A. Munoz de la Pena, A. C. Olivieri, and R. J. Poppi, "Second- and third-order multivariate calibration: Data, algorithms and applications," *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, pp. 752-765, Jul-Aug 2007.
- [28] J. Gabrielsson and J. Trygg, "Recent developments in Multivariate calibration," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 36, pp. 243-255, 2006.
- [29] O. Y. Rodionova and A. L. Pomerantsev, "Chemometrics: Achievements and prospects," *Uspekhi Khimii*, vol. 75, pp. 302-321, 2006.
- [30] E. H. Hansen and M. Miro, "How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses," *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, pp. 18-26, Jan 2007.
- [31] R. B. R. Mesquita and A. Rangel, "A review on sequential injection methods for water analysis," *Analytica Chimica Acta*, vol. 648, pp. 7-22, 2009.
- [32] E. J. Llorent-Martinez, P. Ortega-Barrales, M. L. Fernandez-de Cordova, and A. Ruiz-Medina, "Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 684, pp. 30-39, Jan 17 2011.

- [33] J. Ruzicka and E. H. Hansen, "Retro-review of flow-injection analysis," *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, pp. 390-393, May 2008.
- [34] J. Ruzicka and E. H. Hansen, "FLOW INJECTION ANALYSES .1. NEW CONCEPT OF FAST CONTINUOUS-FLOW ANALYSIS," *Analytica Chimica Acta*, vol. 78, pp. 145-157, 1975.
- [35] C. E. Lenehan, N. W. Barnett, and S. W. Lewis, "Sequential injection analysis," *Analyst*, vol. 127, pp. 997-1020, 2002.
- [36] J. Ruzicka and G. D. Marshall, "SEQUENTIAL INJECTION - A NEW CONCEPT FOR CHEMICAL SENSORS, PROCESS ANALYSIS AND LABORATORY ASSAYS," *Analytica Chimica Acta*, vol. 237, pp. 329-343, Oct 1990.
- [37] C. Wagner, S. Armenta, and B. Lendl, "Developing automated analytical methods for scientific environments using LabVIEW," *Talanta*, vol. 80, pp. 1081-1087, Jan 15 2010.
- [38] A. Gutes, A. B. Ibanez, F. Cespedes, S. Alegret, and M. del Valle, "Simultaneous determination of phenolic compounds by means of an automated voltammetric "electronic tongue"," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 382, pp. 471-476, 2005.
- [39] J. M. Gutiérrez, L. Moreno-Barón, F. Céspedes, R. Muñoz, and M. del Valle, "Resolution of heavy metal mixtures from highly overlapped ASV voltammograms employing a wavelet neural network," *Electroanalysis*, vol. 21, pp. 445-451, 2009.
- [40] X. Ceto, F. Cespedes, and M. del Valle, "BioElectronic Tongue for the quantification of total polyphenol content in wine," *Talanta*, vol. 99, pp. 544-551, Sep 15 2012.
- [41] J. Sha, C. Qinqin, H. Xuefang, Y. Yang, and N. Yuanying, "Application of electronic tongue on black tea beverage discrimination," *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, vol. 2009, 2009.
- [42] R. I. Krieger, *Handbook of pesticide toxicology* vol. 1: Academic Press, 2001.
- [43] J. S. Van Dyk and B. Pletschke, "Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment," *Chemosphere*, vol. 82, pp. 291-307, Jan 2011.
- [44] M. C. R. Alavanja, J. A. Hoppin, and F. Kamel, "Health effects of chronic pesticide exposure: Cancer and neurotoxicity," *Annual Review of Public Health*, vol. 25, pp. 155-197, 2004 2004.
- [45] D. Hamilton, A. Ambrus, R. Dieterle, A. Felsot, C. Harris, B. Petersen, *et al.*, "Pesticide residues in food - acute dietary exposure," *Pest Management Science*, vol. 60, pp. 311-339, Apr 2004.
- [46] F. Arduini, A. Amine, D. Moscone, and G. Palleschi, "Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B-1 detection (review)," *Microchimica Acta*, vol. 170, pp. 193-214, Sep 2010.
- [47] S. Andreescu and J. L. Marty, "Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications," *Biomolecular Engineering*, vol. 23, pp. 1-15, Mar 2006.
- [48] S. Andreescu, L. Barthelmebs, and J. L. Marty, "Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides," *Analytica Chimica Acta*, vol. 464, pp. 171-180, Aug 6 2002.
- [49] Y. Xu and E. Wang, "Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles," *Electrochimica Acta*, vol. 84, pp. 62-73, Dec 1 2012.

- [50] A. P. Periasamy, Y. Umasankar, and S. M. Chen, "Nanomaterials - Acetylcholinesterase Enzyme Matrices for Organophosphorus Pesticides Electrochemical Sensors: A Review," *Sensors*, vol. 9, pp. 4034-4055, Jun 2009.
- [51] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, "A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY," *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, pp. 88-&, 1961 1961.
- [52] B. Prieto-Simon, M. Campas, S. Andreescu, and J.-L. Marty, "Trends in flow-based biosensing systems for pesticide assessment," *Sensors*, vol. 6, pp. 1161-1186, Oct 2006.
- [53] G. A. Alonso, R. B. Dominguez, J.-L. Marty, and R. Muñoz, "An approach to an inhibition electronic tongue to detect on-line organophosphorus insecticides using a computer controlled multi-commuted flow system," *Sensors*, vol. 11, pp. 3791-3802, 2011.
- [54] K. Tanaka and H. Imagawa, "Rapid and reagent-saving immunoassay using innovative stirring actions of magnetic beads in microreactors in the sequential injection mode," *Talanta*, vol. 68, pp. 437-441, Dec 15 2005.
- [55] A. Sassolas, A. Hayat, G. Catanante, and J.-L. Marty, "Detection of the marine toxin okadaic acid: Assessing seafood safety," *Talanta*, vol. 105, pp. 306-316, 2013.
- [56] COFEPRIS. (2010). *Marea Roja*. Available: http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/cfp_marea_roja/_rid/309?page=1
- [57] A. Hayat, L. Barthelmebs, and J.-L. Marty, "Enzyme-linked immunosensor based on super paramagnetic nanobeads for easy and rapid detection of okadaic acid," *Analytica chimica acta*, vol. 690, pp. 248-252, 2011.
- [58] K. Campbell, N. Vilarino, L. M. Botana, and C. T. Elliott, "A European perspective on progress in moving away from the mouse bioassay for marine-toxin analysis," *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, pp. 239-253, Feb 2011.
- [59] I. T. Center, *The coffee Exporter's Guide*, Third ed. Switzerland, 2012.
- [60] I. C. Organization, ed.
- [61] *CAFÉ VERDE – PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU USO EN ANÁLISIS SENSORIAL*, S. d. Economía, 2008.
- [62] *CAFE VERACRUZ - ESPECIFICACIONES Y METODOS DE PRUEBA*, S. d. Economía, 2001.
- [63] *Café Chiapas-Especificaciones y métodos de prueba.*, S. d. Economía, 2007.
- [64] W. B. Sunarharum, D. J. Williams, and H. E. Smyth, "Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective," *Food Research International*, vol. 62, pp. 315-325, 2014.
- [65] V. Sberveglieri, I. Concina, M. Falasconi, E. Ongio, A. Pulvirenti, and P. Fava, "Identification Of Geographical Origin Of Coffee Before And After Roasting By Electronic Noses," in *OLFACTION AND ELECTRONIC NOSE: PROCEEDINGS OF THE 14TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OLFACTION AND ELECTRONIC NOSE*, 2011, pp. 86-87.
- [66] R. M. Alonso-Salces, F. Serra, F. Reniero, and K. Heberger, "Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 57, pp. 4224-4235, 2009.
- [67] B. Bertrand, R. Boulanger, S. Dussert, F. Ribeyre, L. Berthiot, F. Descroix, *et al.*, "Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green

- Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality," *Food Chemistry*, vol. 135, pp. 2575-2583, Dec 15 2012.
- [68] D. F. Barbin, A. L. d. S. M. Felicio, D.-W. Sun, S. L. Nixdorf, and E. Y. Hirooka, "Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview," *Food Research International*, 2014.
- [69] D. E. Briggs, P. Brookes, R. Stevens, and C. Boulton, *Brewing: science and practice*: Elsevier, 2004.
- [70] C. N. d. I. I. d. I. c. y. I. Malta, ed.
- [71] G. A. Alonso, G. Istamboulie, A. Ramirez-Garcia, T. Noguer, J.-L. Marty, and R. Munoz, "Artificial neural network implementation in single low-cost chip for the detection of insecticides by modeling of screen-printed enzymatic sensors response," *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 74, pp. 223-229, Nov 2010.
- [72] G. A. Alonso, G. Istamboulie, T. Noguer, J.-L. Marty, and R. Munoz, "Rapid determination of pesticide mixtures using disposable biosensors based on genetically modified enzymes and artificial neural networks," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 164, pp. 22-28, Mar 31 2012.
- [73] A. Gunther and U. Bilitewski, "CHARACTERIZATION OF INHIBITORS OF ACETYLCHOLINESTERASE BY AN AUTOMATED AMPEROMETRIC FLOW-INJECTION SYSTEM," *Analytica Chimica Acta*, vol. 300, pp. 117-125, Jan 1995.
- [74] X. Llopis, M. Pumera, S. Alegret, and A. Merkoci, "Lab-on-a-chip for ultrasensitive detection of carbofuran by enzymatic inhibition with replacement of enzyme using magnetic beads," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 213-218, 2009 2009.
- [75] R. K. Mishra, R. B. Dominguez, S. Bhand, R. Muñoz, and J.-L. Marty, "A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 32, pp. 56-61, 2012.
- [76] R. B. Dominguez, A. Hayat, A. Sassolas, G. A. Alonso, R. Munoz, and J.-L. Marty, "Automated flow-through amperometric immunosensor for highly sensitive and on-line detection of okadaic acid in mussel sample," *Talanta*, vol. 99, pp. 232-237, 2012.
- [77] M. Campas, P. de la Iglesia, M. Le Berre, M. Kane, J. Diogene, and J. L. Marty, "Enzymatic recycling-based amperometric immunosensor for the ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 24, pp. 716-722, Dec 2008.
- [78] A. X. J. Tang, M. Pravda, G. G. Guilbault, S. Piletsky, and A. P. F. Turner, "Immunosensor for okadaic acid using quartz crystal microbalance," *Analytica Chimica Acta*, vol. 471, pp. 33-40, Oct 2002.
- [79] A. Tang, M. Kreuzer, M. Lehane, M. Pravda, and G. G. Guilbault, "Immunosensor for the determination of okadaic acid based on screen-printed electrode," *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 663-670, Jul-Aug 2003.
- [80] L. G. C. Santos, E. A. N. Fernandes, M. A. Bacchi, F. S. Tagliaferro, and S. M. Tsai, "Evaluation of conventional and organic beans by instrumental neutron activation analysis," *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 270, pp. 249-252, Oct 2006.
- [81] R. M. Barbosa, B. L. Batista, R. M. Varrique, V. A. Coelho, A. D. Campiglia, and F. Barbosa Jr, "The use of advanced chemometric techniques and trace element levels for controlling the authenticity of organic coffee," *Food Research International*, vol. 61, pp. 246-251, 2014.

- [82] R. B. Domínguez, L. Moreno-Barón, R. Muñoz, and J. M. Gutiérrez, "Voltammetric Electronic Tongue and Support Vector Machines for Identification of Selected Features in Mexican Coffee," *Sensors*, vol. 14, pp. 17770-17785, 2014.
- [83] K. A. Anderson and B. W. Smith, "Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, pp. 2068-2075, 2002.
- [84] D. Borsato, M. V. R. Pina, K. R. Spacino, M. B. dos Santos Scholz, and A. Androcioli Filho, "Application of artificial neural networks in the geographical identification of coffee samples," *European Food Research and Technology*, vol. 233, pp. 533-543, 2011.
- [85] R. Muñoz-Valencia, J. M. Jurado, S. G. Ceballos-Magaña, Á. Alcázar, and J. Hernández-Díaz, "Characterization of Mexican coffee according their to mineral contents by means of multilayer perceptrons artificial neural networks," *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014.
- [86] Á. A. A. Almario and R. L. T. Cáceres, "Electronic Tongue and Neural Networks, Biologically Inspired Systems Applied to Classifying Coffee Samples," *American Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2014, 2014.
- [87] X. Cetó, J. M. Gutiérrez, A. Mimendia, F. Céspedes, and M. del Valle, "Voltammetric Electronic Tongue for the Qualitative Analysis of Beers," *Electroanalysis*, vol. 25, pp. 1635-1644, 2013.
- [88] F. Marini, "Artificial neural networks in foodstuff analyses: Trends and perspectives A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 635, pp. 121-131, 2009.

Anexo

Artículos desarrollados como resultado de este trabajo

Artículo 1

G.A. Alonso, **R.B. Domínguez**, R. Muñoz, J.L. Marty “*An approach to an inhibition electronic tongue to detect on-line organophosphorous pesticides using a computer controlled multi commuted flow system*”. Sensors 11(2011)3791-3802

Artículo 2

R.K. Mishra, **R.B. Domínguez**, S. Bhand, R. Muñoz, J.L. Marty “*A novel automated flow based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk*”. Biosensors and Bioelectronics. 32(2012)56-61

Artículo 3

R.B. Domínguez, A. Hayat, A. Sassolas, G.A. Alonso, R. Muñoz, J.L. Marty “*Automated flow-through amperometric immunosensor for highly sensitive and on-line detection of okadaic acid in mussel sample*”. Talanta 99(2012)232-237

Artículo 4

R.B. Domínguez, L. Moreno-Barón, R. Muñoz, J.M. Gutiérrez “*Voltammetric Electronic Tongue and Support Vector Machines for Identification of Selected Features in Mexican Coffee*”. Sensors 2014, 14(9)