



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Avances en Lenguas Electrónicas  
Voltamperométricas y su aplicación en la  
multideterminación de compuestos presentes en  
muestras complejas**

Laura Moreno Barón

Tesis Doctoral

Doctorado en Química

Director: Manel del Valle Zafra

Departament de Química

Facultat de Ciències

Barcelona, 2016

---

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por

Laura Moreno Barón

Visto bueno del Director

Dr. Manel del Valle Zafra  
Profesor Titular, Departamento de Química Analítica  
Univeristat Autònoma de Barcelona

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), a 14 de noviembre 2016

---

# Agradecimientos

---

El presente trabajo fue desarrollado en los laboratorios del Grup de Sensors i Biosensors (GSB) del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona. A lo largo de su desarrollo se realizaron estancias de doctorado en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV, Ciudad de México) , financiados por las Becas de Formación Investigadora del Proyecto ALFA II BioSenIntg (II-0486-FCFA-FCD-FI) “Métodos de procesamiento avanzado e inteligencia artificial en sistemas sensores y biosensores”.

Agradecer al Dr. Salvador Alegret el apoyo recibido y las facilidades que me prestaron él mismo y sus colaboradores del GSB en los inicios de este proyecto.

Agradecer también a los Dres. Roberto Muñoz y Lorenzo Leija, así como a sus colaboradores, el brindarme la oportunidad de aprender de los proyectos compartidos con su grupo de investigación, relacionados con esta tesis doctoral, durante mis estancias en el CINVESTAV. Me gustaría hacer extensivo este agradecimiento al trato personal recibido desde la primera estancia realizada y en todas las ocasiones posteriores en las que he tenido el placer de visitarles.

Por último, agradecer al Dr. Manel del Valle el apoyo y confianza durante la realización y para llevar a término esta tesis doctoral.

Grup de Sensors i Biosensors  
Unitat de Química Analítica  
Departament de Química  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Edifici Cn, 08193, Bellaterra





*A Juan Manuel*

*A mis padres*



# Índice de Contenidos

---

1. Introducción .....	1
1.1. Antecedentes y breve introducción al objetivo de la tesis doctoral .....	2
1.2. Las especies estudiadas .....	3
1.2.1. Los amino ácidos. Detección y determinación clásica de aminoácidos electroactivos en solución .....	3
1.2.2. Los metales pesados .....	6
1.3. Sistemas de detección integrados. Transductores y sensores .....	8
1.3.1. Transductores y sensores electroquímicos basados en composites .....	11
1.3.2. Materiales utilizados en la preparación de composites .....	15
1.3.3. Composites conductores .....	16
1.4. Fundamentos electroquímicos .....	20
1.4.1. Sensores amperométricos .....	22
1.4.2. Sensores voltamperométricos de redisolución .....	24
1.5. Técnicas amperométricas .....	25
1.5.1. Voltamperometría Cíclica .....	26
1.5.2. Voltamperometría diferencial de impulsos .....	27
1.5.3. Voltamperometría por redisolución anódica .....	27
1.6. Sistemas bioinspirados .....	29
1.7. Interpretación de los datos. Calibración multivariable .....	30
1.7.1. Análisis de componentes principales .....	33
1.7.2. Regresión parcial por mínimos cuadrados .....	34
1.7.3. Redes neuronales artificiales. Fundamentos matemáticos y proceso de aprendizaje .....	35
1.7.4. Transformada wavelet .....	45



1.7.5.Red neuronal wavelet .....	51
1.8.  Lenguas electrónicas. Análisis cualitativo y cuantitativo .....	58
2.  Objetivos.....	63
3.  Experimental.....	65
3.1.  Equipos y software.....	65
3.2.  Configuración del sistema de medida.....	66
3.3.  Construcción del electrodo de trabajo .....	67
3.4.  Determinación de amino ácidos oxidables .....	69
3.4.1 Reactivos y soluciones .....	70
3.4.2 Preparación de las muestras. Muestras sintéticas y reales .....	71
3.5.  Determinación de metales pesados .....	72
3.5.1.Reactivos y soluciones .....	73
3.5.2.Preparación de las muestras .....	73
3.5.3.Características del electrodo de trabajo .....	74
3.5.4.Protocolos de medida .....	76
4.  Resultados y discusión .....	77
4.1.  Determinación de aminoácidos oxidables .....	78
4.1.1 Caracterización del sistema de medida.....	78
4.1.2 Análisis multivariable .....	81
4.2.  Determinación de metales pesados .....	92
4.2.1 Caracterización del sistema de medida.....	92
4.2.2 Curvas de calibración e interpretación de la señal .....	94
4.2.3 Análisis multivariante. Aplicación de una Red Neuronal Wavelet.....	97
5.  Conclusiones .....	107
6.  Estudios posteriores y tendencias a futuro.....	113
7.  Bibliografía .....	115
8.  Anexos.....	133

## Abreviaturas

---

ANN	del inglés <i>Artificial Neural Networks</i>
ASV	del inglés <i>Anodic Stripping Voltammetry</i>
CV	del inglés <i>Cyclic Voltammetry</i>
CWT	del inglés <i>Continuous Wavelet Transform</i>
DFA	del inglés <i>Discriminant Function Analysis</i>
DPASV	del inglés <i>Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry</i>
DPV	del inglés <i>Differential Pulse Voltammetry</i>
DWT	del inglés <i>Discrete Wavelet Transform</i>
FT	del inglés <i>Fourier Transform</i>
GRNN	del inglés <i>Generalized Regression Neural Networks</i>
IDWT	del inglés <i>Inverse Discret Wavelet Transform</i>
ISFET	del inglés <i>Ion-Selective Field Effect Transistor</i>
LDA	del inglés <i>Linear Discriminant Analysis</i>
LS-SVM	del inglés <i>Least Squared-Support Vector Machines</i>
MLP	del inglés <i>Multiple Layer Perceptron</i>
MSE	del inglés <i>Mean-Squared Error</i>
OPA	del inglés <i>Orthogonal projection approach</i>

PCA	del inglés <i>Principal Components Analysis</i>
PCR	del inglés <i>Principal Component Regression</i>
PLS	del inglés <i>Partial Least Squares regression</i>
PLS-DA	del inglés <i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>
PLSR	del inglés <i>Partial Least Squares Regression</i>
PNN	del inglés <i>Probabilistic Neural Network</i>
PR	del inglés <i>Percent Recovery</i>
RAE	del inglés <i>Relative Absolute Error</i>
RBF	del inglés <i>Radial Base Function</i>
SOFM	del inglés <i>Linear Networks And Self-Organizing Maps</i>
SVM	del inglés <i>Support Vector Machines</i>
WNN	del inglés <i>Wavelet Neural Network</i>
WT	del inglés <i>Wavelet Transform</i>

# ***Resumen***

---

La presente tesis doctoral he tenido como objetivo la aplicación de lenguas electrónicas en dos áreas concretas, la determinación de aminoácidos oxidables en matrices complejas (muestras de pienso animal), y la determinación de metales pesados en muestras de agua que contiene como interferentes otros metales a nivel de traza.

Para ambos casos se ha establecido un protocolo de trabajo que ha consistido en la caracterización de sistema de medida mediante el estudio de la respuesta amperométrica y posterior el análisis de la señal a través de técnicas clásicas, (quimiometría PLS en el caso de los aminoácidos, y calibración lineal en el caso de los metales pesados).

Paralelamente, y como propuesta de utilización de electrodos de trabajo más sostenibles, se ha aplicado el desarrollo de un sensor composite grafito-epoxi, que además de la ambiental, involucra una serie de mejoras relacionada con sus propiedades eléctricas favorables para la medición, así como el bajo coste y sencillo uso asociados a los materiales que lo conforman.

Posteriormente al estudio previo de los sistemas mencionados, se procesaron los datos voltamperométricos a través de redes neuronales artificiales. Dada la magnitud y la complejidad de la señal voltamperométrica, que impedían el desempeño de una red neuronal artificial de manera directa; el tratamiento de la información que se llevó a cabo para el caso de los aminoácidos oxidables, consistió en una compresión de datos vía transformada Wavelet, previo a la entrada de la información a la red neuronal, que es lo que constituye la aportación más novedosa de la presente tesis doctoral. Para el caso de

los metales pesados, concretamente la resolución de mezclas de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ , se optó por poner en práctica la novedosa aplicación de las redes neuronales Wavelet, que llevaban a cabo la compresión de la información y su modelado en un solo paso.

La combinación del sistema de sensado y las redes neuronales artificiales en lo que se conoce como Lenguas Electrónicas, supone un avance demostrado por los resultados que aquí se exponen, en su aplicación en la multideterminación de compuestos presentes en muestras complejas, tal y como establece el título de esta tesis doctoral.

Con aplicaciones claras al campo de la alimentación y la monitorización ambiental, se abren puertas, además, a nuevas posibilidades de estudio. La base científica es común, y la futura aplicación de las lenguas electrónicas voltamperométricas en el análisis de rutina, se muestran como un reto y una oportunidad científica.

# Summary

---

This thesis has been aimed at the implementation of electronic tongues in two specific areas, determination of oxidizable amino acids in complex matrices (samples of animal feed), and the determination of heavy metals in water samples containing as interfering species, other metals at trace levels.

For both cases it has been established a working protocol that involves the characterization of measurement system by studying amperometric and subsequent responses of the signal analysis through classical techniques (PLS chemometrics in the case of amino acids, and linear calibration in the case of heavy metals).

In parallel, as a proposal for the use of more sustainable working electrodes, there has been developed a composite graphite-epoxy sensor. Its use, besides environmental respect, involves a series of improvements relating to their favorable measuring electrical properties, plus the low cost and simple use associated with their composing materials.

Following the preliminary study of the above systems, the voltammetric data were processed through artificial neural networks. Given the magnitude and complexity of the voltammetric signal, which prevents the performance of an artificial neural network directly; the information processing that was performed for the case of oxidizable aminoacids, involved data compression via Wavelet transform, prior to entry the information into the neural network. The latter constitutes the most novel concept in this doctoral thesis. In the case of heavy metals, specifically in the resolution of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$

and Cd<sup>2+</sup> mixtures, it was decided to implement the novel application of Wavelet Neural Networks, carrying out compression of information and modeling it in one step.

The combination of the sensing system and artificial neural networks in what is known as electronic tongues represents a clear improvement in the analysis field as demonstrated by the results presented here, the multidetermination of compounds in complex samples, established by the title of this thesis.

With clear applications in the field of food and environmental monitoring, doors open also to new possibilities of study. The scientific basis is common, and the future implementation of voltammetric electronic tongues in routine analysis, appears like a challenging and scientific opportunity.

## Capítulo I.

---

### 1. Introducción

Existe una demanda cada vez más imperante, para la obtención de información química fiable y de forma rápida, en todos los sectores de la sociedad, especialmente en aquellos que involucran componentes tecnológicos o científicos.

Este interés cada vez mayor en ámbitos como el médico, industrial, y de control en general, han provocado que la comunidad científica desarrolle metodologías de análisis que cumplan con los requisitos de inmediatez en la respuesta. Así pues se tiende a la innovación en dispositivos de uso más fácil, ya sea por su tamaño (desde lo micro hasta lo nano), o bien por su disponibilidad (económicos y de un solo uso).

Por otro lado, aprovechando la inagotable evolución de la tecnología, en las últimas décadas se han desarrollado metodologías asociadas al procesamiento de la información difíciles de imaginar hace tan solo algunos años; y que consiguen emular, aunque de modo muy sutil, el funcionamiento del cerebro humano, como máquina de procesamiento universal.

El propósito de la tesis que aquí se presenta, consiste precisamente en la combinación de ambos aspectos. Más concretamente en el contexto que aquí nos incumbe, consiste en el desarrollo y aplicación de sensores químicos y metodologías de procesamiento de



la señal, comúnmente conocidos como lenguas electrónicas, en ámbitos como el alimentario y la monitorización ambiental, que den respuesta a una necesidad real, y que supongan un paso más en la evolución de los mecanismos de análisis.

Así pues, a lo largo de este trabajo se explicará la aplicación de sensores de tipo composite a lenguas electrónicas para la determinación de amino ácidos y metales pesados en muestras complejas, obteniendo respuesta al problema analítico mediante dispositivos económicos, fáciles de usar y que proporcionan respuestas fiables en tiempos razonables; todo ello con una nula manipulación de la muestra y exentos de toxicidad.

Esta combinación de elementos en el análisis de rutina, es actual y prometedor en muchos de los ámbitos de la vida. El último capítulo de esta tesis pretende actualizar al lector en el trabajo que se ha desarrollado desde que se inició el proyecto que aquí se presenta, hasta la actualidad, exponiendo brevemente las publicaciones que han surgido en los últimos años, en colaboración con otros investigadores expertos en el procesamiento multivariable.

## **1.1. Antecedentes y breve introducción al objetivo de la tesis doctoral**

La selección de las especies a estudiar provenía de trabajos en curso de nuestro grupo de investigación, en los que, por un lado se realizaron estudios anteriores relacionados con la composición de alimentos animales (motivo de la elección de los aminoácidos analizados), y por otro el análisis y monitorización de parámetros de interés ambiental (como los metales pesados).

Ambos campos, el alimentario y el medioambiental, necesitan de metodologías novedosas que ayuden a la industria y al control a obtener datos de forma ágil, económica y a tiempo real; que promuevan la mejora en la tecnología sin que suponga un mayor coste de explotación.

Antes de avanzar en el desarrollo de esta tesis, cabe mencionar que, aun cuando no todo el contenido del presente trabajo está únicamente basado en el desarrollo de sensores voltamperométricos, sí es cometido de nuestro grupo de investigación esta área de la ciencia, por lo que más adelante en este texto se explica la utilización de sensores basados en composites como parte del desarrollo de este trabajo. Únicamente en el capítulo dedicado al análisis de aminoácidos oxidables, el trabajo desarrollado fue realizado en base a la utilización de un electrodo de trabajo comercial de platino, dado que los primeros resultados eran muy favorables para la determinación, y se consideró necesario continuar el tema de estudio en esta línea. Señalar que uno de los objetivos fundamentales de este trabajo consistía en la aplicación de redes neuronales para la resolución de mezclas de este tipo de analitos, y no únicamente el desarrollo del material sensor.

Dicho esto, en el siguiente apartado se realiza una breve introducción a las características y el interés analítico de las especies estudiadas, así como sus técnicas clásicas más habituales de análisis.

## **1.2. Las especies estudiadas**

### **1.2.1. Los amino ácidos. Detección y determinación clásica de aminoácidos electroactivos en solución**

Tal como se ha comentado anteriormente, en la actualidad, existe una demanda imperante por la determinación de aminoácidos mediante procedimientos simples y rápidos, en sectores tales como la elaboración de alimentos y el análisis clínico. Este requerimiento ha llevado a la comunidad científica a investigar y desarrollar métodos alternativos a los clásicos que permitan un análisis de rutina adecuada a las necesidades del fabricante o usuario.

En concreto, el presente trabajo de investigación está enfocado al análisis de los aminoácidos cisteína (Cys), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr); de gran importancia en los

campos bioquímicos, farmacéuticos y dietéticos, ya que son moléculas precursoras de hormonas, neurotransmisores y otras biomoléculas pertinentes [1]. La elección concreta de esta tríada se debe a que son los aminoácidos que presentan actividad electroquímica con más claridad; por desgracia, estas ideas no son extensibles a la totalidad de los aminoácidos de interés, ya que algunos, los más simples no son electroactivos.

### **Métodos analíticos para la determinación de aminoácidos**

Según el tipo de muestra, los aminoácidos en la naturaleza pueden estar presentes en forma libre o bien formando parte de péptidos y proteínas. En el segundo caso se debe realizar una hidrólisis previa antes de proceder a su análisis.

La hidrólisis de las proteínas tiene por finalidad romper todos los enlaces que mantienen unida la estructura proteica hasta liberar sus componentes monoméricos, es decir, los aminoácidos. La hidrólisis ácida es la más ampliamente utilizada. Consiste en un ataque de la muestra con ácido clorhídrico 6 M a 110°C durante 24 horas.

La detección espectrofotométrica directa de los aminoácidos puede realizarse a 190nm. Pero la mayoría de aminoácidos presentan una baja sensibilidad a esta longitud de onda. Tan sólo algunos, como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina, tienen una absorción destacable o fluorescencia nativa que puede aprovecharse para su determinación.

El análisis clásico de aminoácidos se basa comúnmente en cromatografía líquida [2–4] y la electroforesis capilar [5, 6], previa reacción de derivatización, mediante la cual los aminoácidos son convertidos en otros compuestos derivados altamente absorbentes o fluorescentes que permiten su correspondiente detección espectrofotométrica [7]. Así como sucede con otros aminoácidos, el triptófano se determina usualmente por cromatografía de líquidos con derivatización pre- y post-columna utilizando reactivos del tipo ninhidrina, *o*-ftaldialdehído, fenilisotiocianato y 1,2-naftoquinona-4-sulfonato sódica.

Sin embargo, la detección electroquímica en combinación con técnicas de separación (HPLC-ED) [8–11] presenta una serie de ventajas adicionales que caben ser

consideradas, como es la alta sensibilidad de la técnica y la detección directa de los analitos sin necesidad de una etapa previa de derivatización.

Los métodos voltamperométricos resultan ser una alternativa interesante a las técnicas de separación para el análisis de aminoácidos oxidables sobre la base de la electroactividad inherente de los grupos tiol o aromáticos que pueden estar contenidos en la molécula [12–17]. En la literatura encontramos que para estas aplicaciones, hasta hace poco más de dos décadas, se han utilizado habitualmente materiales tales como carbón, platino y oro, como electrodos tradicionales.

En los últimos años se han estudiado otras técnicas y métodos para la determinación de amino ácidos que requieran una menor y más práctica manipulación o tratamiento de la muestra, y que presentan una mejoras significativas que serán explicadas con mayor detalle más adelante en este texto; mediante el uso de electrodos modificados o composites [18–23].

La principal desventaja de la detección voltamperométrica es su respuesta más compleja y menos intuitiva en comparación con la espectroscopia clásica. Por esta razón, la extracción directa de información cualitativa y cuantitativa de los datos electroquímicos puede resultar una tarea difícil. Sin embargo, el análisis de los datos se ve facilitado en gran medida mediante el uso de técnicas quimiométricas que permiten la extracción de la información relevante [24, 25].

Las aplicaciones quimiométricas se dedican principalmente a la resolución multivariante de las especies involucradas en un proceso dado [26, 27] y la cuantificación mediante el uso de la calibración multivariante [15, 27–40]. Hasta hace menos de dos décadas, la mayor parte de las aplicaciones cuantitativas descritas en la literatura se utilizaban el modelado de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) lineal de los datos generados mediante voltamperometría de redisolución anódica [27, 38], voltamperometría de redisolución de adsorción [37], polarografía de impulso diferencial [31–33], y voltamperometría de redisolución diferencial de impulsos [36]. Más recientemente, la

aplicación de métodos no lineales, tales como PLS polinómicos y redes neuronales artificiales (ANN) está ganando popularidad en el campo del electroanálisis [28–30, 35].

### **1.2.2. Los metales pesados**

La contaminación ambiental es un tema de gran preocupación en la actualidad, sobre todo desde el punto de vista de la recuperación del daño causado, y de la sostenibilidad. Existen diversos tipos de contaminantes denominados como tal, siendo los metales pesados unos de los que presentan particularidades propias.

Los llamados metales pesados (plomo, cobre, cinc, cadmio, manganeso, etc.) pueden incorporarse al agua principalmente por dos vías: el arrastre de compuestos inorgánicos que forman parte de la composición de las tierras o conductos por donde circula el agua, o bien por la adición en forma iónica o de compuestos derivados de la actividad industrial y antropogénica.

La toxicidad de los metales pesados depende de la forma física o química en que se encuentra el metal. En la naturaleza se encuentran en estado sólido o solubilizados en estado iónico. Su forma cuando son generados por procesos industriales, es más bien como productos residuales; vertidos al agua o a la atmósfera en forma de partículas en suspensión. La legislación europea es cada vez más estricta en cuanto al vertido de estos elementos en las aguas residuales de proceso y en las emisiones atmosféricas, y es por ello que resulta necesario un control efectivo de estos parámetros.

El carácter tóxico de los metales pesados viene definido actualmente por los límites legales que definen la concentración en el medio donde se encuentran, por encima de la cual se conocen sus efectos nocivos. Estos límites son establecidos y revisados cuando se considera necesario, fruto de estudios y conocimientos sanitarios.

De entre los metales pesados, el mercurio, plomo, cromo, cobre, cadmio, níquel, arsénico, están entre los más problemáticos, y requieren de mayor esfuerzo a nivel

analítico, debido a los efectos adversos y tóxicos que causan sobre la salud humana, incluso a concentraciones muy bajas (en partes por billón). Los metales pesados se bioacumulan en el cuerpo humano que no es capaz de procesarlos, produciendo enfermedades graves e irreversibles.

#### **1.2.2.1. Metodologías de análisis clásico de metales pesados. Detección y determinación**

Más adelante en el texto (§ 1.4.2. y § 1.5.3.), se explicará con más detalle la aplicación de métodos basados en electrodos de mercurio, entre otras por su propiedad de amalgamarse, como los más utilizados dentro de las técnicas clásicas para la determinación de metales, en particular mediante voltamperometría de redisolución anódica.

Cuando uno comprueba las técnicas más comunes para la determinación de metales pesados, los enfoques clásicos han utilizado mercurio como soporte para su determinación. Sin embargo, debido a su problemática, han ido surgiendo a lo largo de las últimas décadas nuevos materiales que tratan de sustituir los electrodos de mercurio o sus modificaciones en la determinación de metales a niveles de traza. Algunas de las variantes que se encuentran en la literatura, están basadas en electrodos de bismuto o antimonio [41–54], y/o en pastas de carbono [15, 46, 48, 55–57], entre otros.

#### **1.2.2.2. El problema ecológico. Nuevos procedimientos de análisis**

Las metodologías clásicas de análisis químico están evolucionando en las últimas décadas hacia conceptos ambientalmente más sostenibles, en términos de materiales más económicos y menos contaminantes, así como en la simplificación del proceso analítico a través de la potenciación de herramientas informáticas y de procesamiento, con un claro potencial de futuro.

La preocupación medioambiental y el avance tecnológico están conllevando en las últimas décadas a un desuso progresivo de técnicas de análisis que utilicen mercurio,

tales como la popular polarografía y sus derivados. Aun cuando el análisis de rutina más sensible al problema ecológico intenta evitar estas técnicas, sí ha de tenerse en cuenta que la sensibilidad que presentan es excelente, y su fiabilidad es un referente; por lo que de algún modo los protocolos de validación de otras metodologías analíticas más novedosas, en muchos casos se llevan a cabo contrastando los nuevos resultados con los obtenidos por estas técnicas.

Hasta ahora se ha comentado la problemática asociada a los electrodos basados en mercurio. Sin embargo, la motivación de dedicar una parte de la tesis a determinar metales pesados en solución, tiene su origen también en el interés por la preservación del medio ambiente. Es por ello que resulta cada vez más necesario encontrar técnicas que permitan determinar metales pesados a concentración muy bajas; estamos hablando de niveles de partes por billón e incluso partes por trillón. Como decimos, es necesario llegar a límites de detección muy bajos, pero además conseguir metodologías que reduzcan tiempos de análisis que permitan el análisis en campo a tiempo real (incluso en continuo) y que la manipulación de la muestra sea innecesaria. Estos son los objetivos a alcanzar a nivel de análisis ambiental.

Así pues, la parte de esta tesis dedicada a los metales pesados pretende ser un paso más avanzado en lograr estos hitos, consiguiendo unos resultados satisfactorios mediante una metodología aún novedosa y con gran potencial en la monitorización ambiental, las lenguas electrónicas basadas en redes neuronales wavelet.

### **1.3. Sistemas de detección integrados. Transductores y sensores**

Un sensor químico [58] es un dispositivo que transforma información química en una señal analíticamente útil. Estrictamente hablando, esta definición correspondería a la de un transductor químico, sin embargo ambos conceptos tienden a utilizarse indistintamente en el campo analítico.

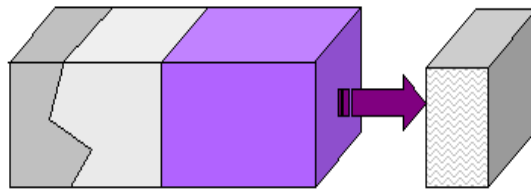
Un sensor se diferencia de un transductor en que el sensor está siempre en contacto con la variable de instrumentación, de manera que puede decirse también que es un dispositivo que aprovecha una de sus propiedades con el fin de adaptar la señal que mide para que la pueda interpretar otro dispositivo. Un ejemplo sencillo de magnitud física que permite entender este concepto, es el caso del termómetro de mercurio, que aprovecha la propiedad que posee el mercurio de dilatarse o contraerse por la acción de la temperatura.

A través de la electrónica y la informática, este sistema de medición es capaz de establecer una relación entre la concentración de un componente específico, e incluso de proporcionar la composición total de una muestra. Un sensor se caracteriza por sus reducidas dimensiones, robustez, facilidad de uso y capacidad de suministrar información analítica fiable de manera continua. Así pues, los sensores tienen unas características físicas que permiten realizar medidas de forma rápida, reproducible y en ubicaciones de difícil acceso. Estas mismas características les permiten ser de gran utilidad en la automatización de procesos de manera sencilla.

Cualquier tipo de sensor químico consta de dos componentes básicos conectados en serie [58–60]: el receptor y el transductor. El receptor reconoce el analito a través de una propiedad física propia, como podría ser su estructura, o bien a través de una reacción química o interacción biológica o biomimética específica, produciendo una señal primaria de tipo eléctrica, óptica, térmica o másica.

El transductor, mediante un sistema electrónico y / o informático, transforma la señal recibida en una señal eléctrica, más fácilmente cuantificable, medible y manipulable. El componente eléctrico de detección no necesariamente tiene que estar integrado físicamente en la parte sensible. La señal eléctrica producida proporciona información sobre la muestra, el proceso o el sistema a investigar.





**Analito-Receptor    Transductor    Componente eléctrico**

**Figura 1.1.** Esquema simple de la estructura funcional de un sensor y del proceso de reconocimiento analítico.

Los sensores químicos también se llaman quimiosensores, si el elemento de reconocimiento es de naturaleza sintética, y biosensores, si el elemento de reconocimiento es de naturaleza biológica.

Los sensores químicos se pueden clasificar en función de la propiedad física medida por el transductor. Así pues, pueden ser clasificados como:

- Sensores basados en *transductores ópticos*: dispositivos basados en fibras ópticas, resonancia de plasmones superficiales y sensores de onda evanescente.
- Sensores basados en *transductores piezoeléctricos*: dispositivos basados en onda acústica de volumen y dispositivos basados en onda acústica superficial.
- Sensores basados en *transductores electroquímicos y eléctricos*: sensores amperométricos, potenciométricos, conductimétricos, de impedancia y de carga iónica o de efecto de campo (ISFET). Los sensores electroquímicos más ampliamente utilizados se basan en las técnicas amperométricas y potenciométricas.

Se presentan en la siguiente tabla, una clasificación de los sensores químicos en función de la propiedad física de medida del transductor.

**Tabla 1.1.** Materiales utilizados en la construcción de sensores químicos.

Tipo de Sensor	Transductor
Electroquímicos	Membranas, Composites Conductores: Pt, Au, C, nanocomposites de grafeno [61–69]
Eléctricos	Sensores cerámicos de gases, nanomateriales de carbono [70]
Ópticos	Fibras Ópticas [71–73] Resonancia de plasmones superficiales [71, 72, 74, 75] Dispositivos fotoeléctricos (fotodiodos)
Másicos	Cuarzo piezoeléctrico
Térmicos	Termistores
Diversos	Sólido-gel [76], MOFs [77], MOX [78]

### 1.3.1. Transductores y sensores electroquímicos basados en composites

Los quimiosensores y biosensores representan una de las áreas más interesantes de investigación en el campo del electroanálisis y son un claro ejemplo de sistemas analíticos integrados. Hay tres aspectos que deben ser considerados a priori a fin de definir un sensor electroquímico:

- La selección de un receptor o elemento químico o biológico de reconocimiento molecular,
- la elección de un elemento de transducción electroquímico, o transductor, y
- la integración de ambos elementos, realizada normalmente vía inmovilización del receptor en la superficie del transductor.

Anteriormente a la aparición de la aplicación de composites en la elaboración de los sensores, el receptor químico o biológico era inmovilizado sobre la superficie, tanto directamente (adsorción, inmovilización covalente, atrapamiento en una matriz polimérica, etc.) o mediante otra fase que podía ser un gel o una membrana. Desde el punto de vista de la construcción de los electrodos, estas técnicas "clásicas" de inmovilización requieren de un control meticuloso de las variables que afectan al proceso de inmovilización. Entre estas variables se encuentran la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la pureza de los

reactivos utilizados, la concentración, el tiempo, etc. Aun siendo viable la utilización de estas técnicas para la construcción de sensores electroquímicos en el ámbito de laboratorio, la producción a gran escala resulta difícil y económicamente costosa, especialmente para asegurar su reproducibilidad. Hay que remarcar, además, que la mayoría de los métodos de modificación de la superficie del transductor resultan en una degradación del sensor con el tiempo y el uso, que hacen que sea necesaria una nueva inmovilización o una reposición del material sensor.

Los composites y biocomposites conductores constituyen una interesante alternativa como materiales de construcción de sensores electroquímicos. La capacidad de integrar diversos materiales es una de sus principales ventajas.

Un electrodo de material compuesto, o composite, puede ser definido como un electrodo constituido por un material sensor compuesto como mínimo de una fase conductora de la electricidad y al menos de una fase aislante. La naturaleza de cada una de las fases, así como su disposición en el espacio, ha permitido establecer una serie de clasificaciones que, según el sistema de fabricación de los electrodos, permitirá predecir algunas de las características más importantes de estos materiales.

Algunas de las clasificaciones mencionadas pueden venir dadas por el grado de ordenación de las partículas conductoras y aislantes [79, 80]. Así pues, podemos distinguir entre:

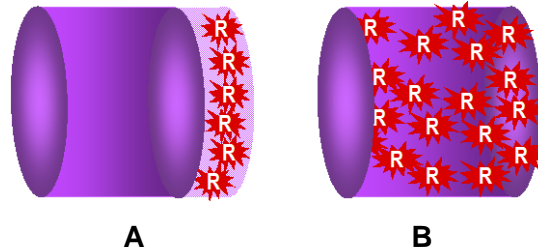
- a) *composites ordenados*: presentan un cierto grado de ordenación de los componentes que lo forman. Dentro de las distribuciones ordenadas, los materiales que forman el composite se pueden encontrar confinados a la superficie del electrodo o en la matriz de éste.
- b) *composites aleatorios*: las partículas se encuentran distribuidas de manera aleatoria en el material. Estos, a su vez, se pueden a su vez clasificar en:

- *dispersos*, si la distribución del conductor es totalmente aleatoria (por ejemplo: electrodos de pasta de carbono, grafito-epoxi, grafito-polietileno, TTF-TCNQ-PVC, etc.).
- *consolidados*, cuando, aunque exista una distribución aleatoria de partículas conductoras en la matriz del composite, se encuentran áreas de predominio del conductor puro, y áreas en las que predomina fase aislante, no existiendo un estado intermedio (por ejemplo: electrodos formados por impregnación de barras de grafito, o los fabricados por procedimientos como la segregación) [81].

Entre los materiales conductores, se emplean metales nobles (platino, oro), minerales como el grafito, así como también una gran variedad de polímeros. La elección del material conductor depende del propósito del sensor, en cuanto al medio en que va a ser utilizado, y los analitos que se pretenden medir. La elección del sensor, por tanto, forma parte del diseño del procedimiento analítico. Los primeros transductores electroquímicos basados en composites descritos en la bibliografía fueron los de pasta de carbono [82], [83]. Están formados por partículas de polvo de grafito (fase conductora), y un líquido aislante viscoso (aceite mineral). Debido a inconvenientes en el uso, debido a la baja resistencia del material [79], se han desarrollado composites rígidos [84]. Algunas ventajas de estos composites rígidos es su facilidad de mecanización y regeneración mediante un simple pulido, lo que aumenta el tiempo de vida de éstos. Éste y otros aspectos que caracterizan los composites rígidos, utilizados en el desarrollo de esta tesis doctoral, se explicarán más adelante.

Algunos de los componentes que son incorporados al material composite pueden mejorar sus propiedades electroquímicas, aumentar su sensibilidad, así como incrementar su selectividad hasta convertirlos en materiales específicos. Esta integración es posible llevarla a cabo, bien a través de una modificación previa de uno de los componentes del composite antes de su preparación o bien a través de una incorporación física de éste a la matriz del composite. Los composites y biocomposites ofrecen un gran número de ventajas en comparación con los transductores tradicionales consistentes en una superficie conductora continua modificada superficialmente (Fig. 1.2). Ambos diseños

representan diferentes aproximaciones de la integración del material receptor con el transductor.



**Figura 1.2.** Diseños básicos para la construcción de electrodos modificados química o biológicamente, conocidos como sensores / biosensores: (A) Consistente en una superficie modificada del transductor, y (B) consistente en la modificación de la matriz del transductor. Los receptores (R) pueden ser materiales de reconocimiento químico o biológico, y los transductores son materiales tales como carbono, oro o platino.

Los electrodos basados en composites pueden ser fabricados con gran flexibilidad en cuanto al tamaño y forma del material, permitiendo de esta manera una adaptación fácil a una gran variedad de configuraciones tales como planar, cilíndrica, tubular o de microelectrodo.

La superficie de los composites puede ser pulida y suavizada a fin de obtener un material activo nuevo preparado para un ensayo posterior. Cada nueva superficie conlleva resultados reproducibles, ya que cada componente individual está homogéneamente dispersado y comprimido a la matriz y al volumen del composite.

Otra de las ventajas de los composites como materiales transductores, es el carácter dual de su superficie [85], formada por partículas de grafito en un medio polimérico, lo que hace prever unos fenómenos de superficie más ricos en comparación con las superficies continuas de materiales conductores, tales como el grafito, oro o polipirrol. Esto puede ser explicado por el fenómeno de haz de microelectrodos. Si se reduce la superficie de un macroelectrodo, la señal y el ruido asociado disminuyen. En los microelectrodos, se establece una difusión no lineal que aumenta la calidad de la señal [80, 86]. Este efecto se traduce en una mejora de la relación señal/ruido, y en límites de detección más favorables, aunque las bajas corrientes producidas por los microelectrodos requieren de una instrumentación costosa. Una alternativa es la construcción de haces de

microelectrodos separados por una matriz aislante y conectados en paralelo. La señal producida por el macroelectrodo construido de esta forma es la suma de las señales de cada microelectrodo, y contiene las mejoras de la relación señal/ruido que otorga el uso de varios microelectrodos. La construcción de un haz de microelectrodos es costosa y difícil, pero una aproximación a este dispositivo se consigue con los composites [79, 85], constituidos por partículas conductoras dispersas en una matriz polimérica, que muestran las mismas propiedades electroquímicas que un haz de microelectrodos.

Cabe destacar, como ventaja adicional de los composites, que cuando alguno de sus componentes sea un metal precioso, el composite siempre será de menor coste y densidad en comparación a los conductores puros que los integran. Más recientemente, se han propuesto electrodos de prestaciones avanzadas si el material conductor se incorpora en forma de nanopartículas.

### **1.3.2. Materiales utilizados en la preparación de composites**

Las prestaciones de los métodos electroquímicos de análisis se ve fuertemente afectada por el material que constituye el electrodo de trabajo. Un electrodo de trabajo ideal, definido para ser utilizado en técnicas voltamperométricas, debería tener las siguientes características: baja resistencia óhmica, inercia química y electroquímica a lo largo de un amplio rango de potenciales, elevado sobrevoltaje de hidrógeno y oxígeno que se traduciría en una amplia ventana de potenciales de trabajo, baja corriente residual, fácil reproducción de la superficie del electrodo, máxima versatilidad, bajo coste y toxicidad nula. Hasta la actualidad, diferentes tipos de materiales han sido utilizados como electrodos de trabajo en técnicas electroanalíticas, siendo los más populares los consistentes en una única fase conductora, como sería de mercurio, platino, oro o carbono vitrificado (en inglés *glassy carbon*). Como se ha comentado con anterioridad en este capítulo, la elección de los materiales receptor y transductor es un punto clave en el desarrollo del sensor. Por tanto, el desarrollo de los electrodos basados en composites está siendo de gran importancia en el campo de la analítica electroquímica, y en particular, en la aplicación de los dispositivos sensores.

Durante la última década podemos encontrar en la bibliografía gran cantidad de aplicaciones de materiales compuestos para la fabricación de sensores. Algunos ejemplos se pueden consultar en: [67, 68, 87–93].

En los siguientes apartados se describen los materiales utilizados en la construcción de composites.

### **1.3.3. Composites conductores**

Un composite es el resultado de la combinación o integración de dos o más materiales diferentes. Cada componente individual mantiene sus características originales, al tiempo que proporciona al composite propiedades químicas, mecánicas y físicas distintivas. Estas propiedades son diferentes de las mostradas por los elementos que conforman el composite, de manera individual [94].

En general, los composites se clasifican según la naturaleza del material conductor (platino, oro, carbono, etc.) y la disposición de sus partículas en la matriz polimérica. Además, se pueden utilizar diferentes tipos de polímeros, lo que establece una nueva tipificación: composites de epoxi, composites de metacrilato, composites de silicona, etc. Otra clasificación de acuerdo a la rigidez de los composites, los separaría en composites rígidos o blandos, conocidos estos últimos también como "pastas".

Si la distribución del carbono es aleatoria, el composite resulta de fácil preparación. Un polvo de grafito puede ser dispersada en una matriz blanda, produciendo una "pasta de carbono". Alternativamente, una matriz rígida puede ser construida con un monómero que puede ser polimerizado químicamente, térmicamente, etc. o bien utilizando un polímero fundido que endurece cuando es sometido a enfriamiento.

Por otra parte, hay dos formas de construir composites de consolidación. La primera, en la que los composites de impregnación son construidos con un material conductor poroso que se encuentra embebido de un material aislante. En este caso, la consolidación de la

fase conductora viene determinada por la estructura porosa del conductor. Y la segunda forma, en la que los compuestos de segregación están contruidos a base de una mezcla de polvo de partículas conductoras y de material aislante. Esta mezcla está posteriormente sometida a presión. Algunos ejemplos de estas sustancias son mezclas de grafito-polietileno, grafito-Teflon, grafito-Kel F, etc. En los últimos años, con la irrupción de la nanotecnología en prácticamente todas las áreas de la ciencia y tecnología, también se habla de los nanocomposites, que implican el uso de alguno de sus componentes a escala nanométrica, por ejemplo con el uso de nanopartículas metálicas [21, 95–98].

### **Conductividad y propiedades eléctricas del material conductor**

Los materiales basados en carbono son utilizados frecuentemente como fase conductora en los electrodos de tipo composite. Estos materiales se encuentran disponibles en diferentes morfologías, como son polvo de grafito, fibras de carbono, etc., y más recientemente en formas como nanotubos de carbono, multicapa y monocapa, y grafeno. La utilización de carbono es una elección ideal debido a que es un material inerte, dispone de un amplio rango de potenciales de trabajo, baja resistencia eléctrica y tiene una estructura cristalina característica que lo hace responsable de la baja corriente residual generada.

Las propiedades eléctricas inherentes del composite dependen de la naturaleza de cada uno de los componentes, de sus cantidades relativas y de su distribución. La resistencia eléctrica viene determinada por la conexión de las partículas conductoras en el seno de la matriz polimérica; así pues, la cantidad relativa de cada componente del composite debe ser valorada para conseguir una composición óptima. El punto óptimo consiste en encontrar aquella composición que contiene la mínima cantidad de material conductor con la que se obtiene un máximo de conductividad. Otro parámetro clave a considerar es la superficie activa del electrodo. Si la superficie del electrodo se reduce, también se da una disminución de la señal y del ruido asociado. El perímetro de la superficie sensora afecta también considerablemente a la calidad de la señal [80, 86]. Así pues, la configuración del sensor será también propósito de optimización.



## Consideraciones y propiedades del material polimérico aislante

Las bases para la construcción de electrodos de matriz modificada químicamente fueron propuestas por Creasy y colaboradores a finales de los años ochenta [99–101], con la construcción de electrodos por co-polimerización de estireno con divinilbenceno y vinilferroceno como modificador (catalizador), y diferentes morfologías de carbono como material conductor. Estos dispositivos mostraban mejores características físicas (disponían de una superficie renovable por simple pulido) y eran estables en disolventes orgánicos. En estudios posteriores se observó que diferentes modificaciones de estos electrodos daban lugar a variaciones en la señal de respuesta obtenida.

Las resinas epoxi constituyen una familia de polímeros ampliamente utilizada por sus excelentes propiedades químicas, su buena adherencia a otros materiales y sus excelentes propiedades aislantes. Además, se preparan con facilidad, son económicas y resultan de amplia disponibilidad. La adición de productos a base de carbono o metal en polvo, puede incrementar su conductividad térmica y química a la vez que se mantiene la facilidad de su mecanización y maleabilidad. La proporción de las fases varía ampliamente cuando se quiere conseguir una conductividad óptima y una buena estabilidad mecánica. La disponibilidad comercial de estas resinas epoxi ha dado lugar a una fácil, rápida y más reproducible fabricación de estos tipos de composites en retrimiento de los procedimientos propuestos con anterioridad. Esta posibilidad ha sido adaptada a nuestros laboratorios utilizando una resina aislante epoxi comercial (Epo-Tek, Epoxy Technology, Billerica, MA, USA) y polvo de grafito (tamaño de partícula menor de 50  $\mu\text{m}$ ). Nuestro procedimiento fue extendido a otras matrices poliméricas como silicona, polimetacrilato, poliéster y poliuretano. Las ventajas de estos polímeros son que pueden prepararse *in situ*, admiten con facilidad modificadores químicos y bioquímicos, mediadores, cofactores, etc. a su matriz, siguiendo un proceso de curado simple, y son disponibles comercialmente.

El polímero es escogido de acuerdo con la futura aplicación del sensor. Por ejemplo, cuando es necesaria una modificación química (adición de mediador redox, catalizador, etc.) la sustancia modificante no debería interferir en el curado del polímero. Finalmente,

cabe destacar que se debe considerar el medio en el que el sensor debe aplicarse, como pueden ser fluidos biológicos, soluciones orgánicas, etc. Este punto es importante a la hora de considerar efectos de biocompatibilidad, degradación, corrosión, etc. El material composite debe ser utilizado en consonancia con el polímero elegido. Algunos ejemplos de estos son compuestos de epoxi, silicona, poliuretano, poliestireno, metacrilato o Teflon<sup>TM</sup>. Las condiciones en las que se produce el curado, tales como tiempo de curado, temperatura y tipo de atmósfera (aire, nitrógeno, etc.), también deben ser optimizadas.

La fase en que se encuentra el polímero del composite define la viscosidad de la pasta antes del curado. En esta etapa, el material es blando y puede ser moldeado a fin de obtener la conformación deseada. Si la pasta es muy fluida puede ser utilizada como tinta en procesos serigráficos (*screen printing*) para producción masiva de sensores. La adición de disolventes volátiles como cloroformo, n-pentanol, etc., puede reducir la viscosidad de la pasta sin interferir en el proceso de curado. Idealmente, las pastas deben tener cierta viscosidad a fin de ser moldeables, pero no deben ser tan densas como para requerir un proceso de homogeneización dificultoso y largo. Tiempos de mezcla largos pueden ser un problema cuando se trabaja con polímeros que curan rápidamente, como son los metacrilatos, poliuretanos, etc., y daría lugar a una solidificación del polímero antes de que las partículas conductoras hubieran sido adecuadamente dispersadas.

Hay que decir que, cuando el polímero se endurece durante el proceso de curado, el composite resultante puede ser mecanizado, torneado, cortado y pulido sin que ello afecte a sus propiedades.

Y por último es necesario también, hacer hincapié en la utilización de matrices sol-gel para la inmovilización, en el seno de éstas, de material biológico, en transductores electroquímicos [102]. Un sol-gel puede entenderse como un vidrio poroso generado a partir de hidrólisis de precursores tipo silanos, que tal como se va formando atrapa en su interior componentes conductores (para formar el composite conductor) y elementos biológicos con actividad de reconocimiento que convertirán al dispositivo en un biosensor.

## 1.4. Fundamentos electroquímicos

Para llevar a cabo mediciones electroquímicas se utilizan montajes potencioestáticos, para el que se requieren sistemas de medida con tres electrodos: el electrodo de trabajo, el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia. El electrodo de trabajo es aquel sobre el cual es medido el paso de corriente por cada diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, actuando este último como contraelectrodo para cerrar el circuito eléctrico. El equipo de medida que se utiliza es un potencioestato el cual, mediante el electrodo de referencia, controla el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia suele ser de Ag/AgCl, mientras que los de trabajo y auxiliar son de materiales conductores e inertes, como metales nobles, derivados de carbono y polímeros conductores.

La intensidad de corriente es una medida directa de la velocidad de la reacción electroquímica (velocidad de reducción u oxidación del analito en el electrodo) descrita por la ley de Faraday (en forma diferencial) como:

$$i = nF \times \left( \frac{\partial c}{\partial t} \right) \quad (1.1)$$

donde  $\partial c / \partial t$  es la velocidad de oxidación o de reducción del analito, en mol/s,  $n$  es el número de electrones por molécula implicados en la reacción y  $F$  es la constante de Faraday (96.485 C/mol electrones). Como se deriva de la ecuación, la corriente es directamente proporcional a la velocidad de transformación del analito en la superficie del electrodo. Cuando las moléculas de la superficie se han electrolizado, se transfieren nuevas moléculas desde el seno de la solución a la superficie del electrodo. Así pues, la corriente también depende de manera crítica de la velocidad del transporte de masa (analito) desde la solución a la superficie del electrodo [103]. Este último parámetro depende de la concentración del analito en la solución, del área del electrodo y de las condiciones de migración, convección y difusión [104]. La aportación por migración, debida al transporte del analito por un gradiente eléctrico, generalmente se elimina

adicionando un electrolito soporte a la celda. La convección, debida al transporte del analito impulsada por un movimiento de la solución (mediante agitación, por ejemplo), puede ser controlada simplemente si no se aplica agitación a la solución, o bien si se aplica una agitación constante. La difusión, debida al transporte del analito resultado de un gradiente de concentración de éste, depende del tiempo, lo que limita este tipo de experimentos.

Si la respuesta de los electrodos se mide en una solución estática, la corriente  $I$  decrece con el tiempo, según la ecuación descrita por Cottrell [103]:

$$I = nFA \times \left( \frac{D}{t\pi} \right)^{1/2} C_s \quad (1.2)$$

donde  $C_s$  es la concentración de la especie electroactiva en la solución,  $A$  el área del electrodo y  $D$  el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en la solución. Debido a la dependencia del tiempo ( $t$ ), como se evidencia en la ecuación de Cottrell, la corriente debería disminuir hasta cero después de un período de tiempo, pero en realidad se obtienen intensidades bajas de corriente [104].

Una posible solución es utilizar técnicas hidrodinámicas en las que la convección es forzada, por ejemplo, por agitación de la solución o mediante la utilización de electrodos de trabajo de disco rotatorio. El transporte de masa en estos experimentos, que es más rápido, es una combinación de la convección y la difusión. De esta manera, se forma una capa de difusión estática en la superficie del electrodo de un grosor  $\delta$  que depende de la velocidad de agitación [105]. Así se consigue que el transporte de masa en la superficie del electrodo sea sólo determinado por la difusión a esta capa. Se obtiene entonces un estado estacionario en un tiempo relativamente breve, en el que el transporte de masa es estable y el valor final de la intensidad depende de la concentración del analito. Esta relación puede expresarse con la ecuación:

$$I = nFA \times \left( \frac{D}{\delta} \right) C_s \quad (1.3)$$

donde  $C_s$  es la concentración del analito en la solución. Esta ecuación puede simplificarse como:

$$I = KC_s \quad (1.4)$$

donde  $K$  es la constante que incluye la constante de Faraday, el área del electrodo y el coeficiente de difusión, entre otros. Para la utilización de esta ecuación se considera que la distribución del analito en la solución es uniforme hasta la capa de difusión, y que en la superficie del electrodo la concentración del analito es cero.

En los próximos apartados se explicará la utilización de las diversas técnicas electroanalíticas en el desarrollo del presente trabajo experimental.

#### **1.4.1. Sensores amperométricos**

Los sensores amperométricos se basan en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva en la superficie de un electrodo, el cual es polarizado a un potencial determinado. La elección de este potencial aporta cierta selectividad electroquímica, ya que promueve la reacción de unas u otras especies químicas [106]. Convencionalmente, la estructura de estos electrodos está constituida por un conductor puro (metales como platino y oro o derivados del grafito como carbono vitrificado o grafito pirolítico) [107], sin embargo, a menudo la selectividad que ofrecen es insuficiente, por lo que en algunos casos se modifica su superficie (química, física o biológicamente) con el objeto de ofrecer propiedades catalíticas o de supresión de ciertas especies, a fin de aumentar la selectividad y la sensibilidad de la detección [81, 106].

La propuesta de utilizar pastas de carbono en la construcción de transductores amperométricos fue planteada por Adams en 1958 [82]. Estas pastas se preparan mezclando material inerte conductor (por ejemplo polvo de grafito) con un líquido aislante (como el aceite de parafina, silicona, etc.). El líquido aislante tiene una viscosidad específica y la pasta tiene una cierta consistencia. El material resultante es de fácil preparación y resulta extremadamente económico.

Sin embargo, estas pastas tienen una estabilidad física y mecánica limitada, especialmente cuando se trabaja con sistemas de flujo. Además, las pastas se disuelven en algunos solventes apolares cuando son utilizadas en determinaciones electroquímicas en medio no acuoso, dando lugar a un deterioro de la señal. La degradación general de estos compuestos tiene lugar rápidamente y ha limitado, por lo tanto, su uso en investigación. Desde entonces se han desarrollado múltiples electrodos de pasta de carbono modificados químicamente y bioquímicamente.

A principios de los años noventa, comenzaron a aparecer los sensores amperométricos basados en compuestos composite rígidos [85]. Éstos presentaban características físicas, mecánicas, electroquímicas y económicas ventajosas. Los electrodos de tipo composite basados en carbono no muestran los inconvenientes de estabilidad que presentan los de pasta de carbono, y mantienen las ventajas físicas y de bajo coste de estos últimos. Supusieron, por tanto, una buena alternativa para la construcción de sensores amperométricos. Además, el método de construcción puede trasladarse a la producción industrial masiva.

En este sentido se han desarrollado tanto sensores como biosensores amperométricos. En el caso de los biosensores, la ausencia de membranas reduce las dimensiones de los perfiles de difusión produciendo rápidamente una señal analítica, ya que las especies electroactivas son generadas cerca de los sites activos conductores, en la superficie del biosensor, facilitando la transferencia electrónica directa. Además, la naturaleza rígida de los biocomposites garantiza una estabilidad mecánica a la vez que constituye una reserva de material biológico, permitiendo la utilidad del dispositivo para varias medidas. La tecnología de estos dispositivos permite también una integración de mediadores redox

y/o cofactores, así como material inmunológico o genético, a la estructura del biocomposite, constituyendo asimismo, una reserva de este tipo de materiales para mediciones consecutivas. Diferentes biosensores y genosensores han sido desarrollados en nuestro grupo de investigación. La utilización de composites grafito-epoxi como superficies modificadas, ha supuesto un avance importante en el desarrollo de materiales transductores para el análisis electroquímico del DNA [106].

La siguiente figura muestra un esquema del montaje del sistema de medida utilizado para el desarrollo del presente trabajo. En esta se puede observar la celda analítica compuesta por el sistema de tres electrodos, conectada al potencióstato de medida. El electrodo de trabajo está compuesto por un sensor composite conectado eléctricamente al potencióstato; los elementos de referencia y auxiliar son comerciales.

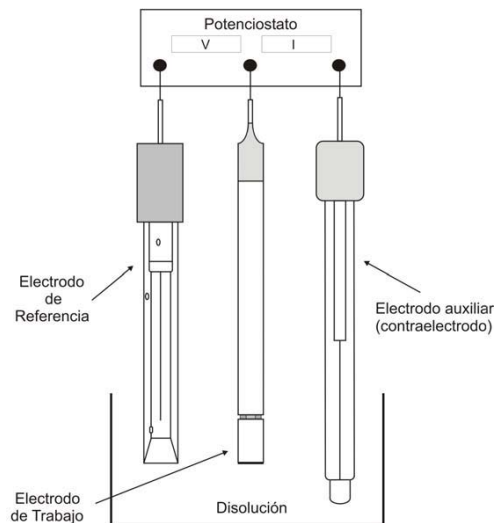


Figura 1.3. Sistema de medida amperométrico.

#### 1.4.2. Sensores voltamperométricos de redisolución

La voltamperometría de redisolución (en inglés *Stripping Voltammetry*) ha resultado ser una técnica electroquímica muy poderosa en la detección y medida de metales a niveles

de traza. Esta técnica ofrece una excelente sensibilidad y la posibilidad de hacer análisis multicomponente. La respuesta de esta técnica, como de otras técnicas electroquímicas, se ve fuertemente afectada por el material que constituye el electrodo de trabajo. Hasta la actualidad, un amplio rango de materiales han sido utilizados como transductores para la detección de metales pesados utilizando esta técnica, siendo los más populares los electrodos de basados en mercurio. La gran utilidad de los electrodos de mercurio para la determinación de metales viene dada por la habilidad que presenta este material para formar amalgamas, permitiendo una concentración previa de los iones metálicos en la superficie del electrodo. Otra ventaja de la utilización de mercurio en electrodos de trabajo está asociada al elevado sobrepotencial de hidrógeno que estos electrodos presentan. A pesar de estas ventajas, actualmente tienen gran peso las implicaciones medioambientales en la elección de los procesos, y los severos daños potenciales asociados a la utilización de mercurio, han dado lugar al desarrollo de varios electrodos en los que se ha evitado la manipulación de este metal. Durante los últimos años, ha surgido un creciente interés en la utilización de electrodos sin contenido en mercurio (*mercury free*), utilizados en el presente trabajo de investigación, lográndose sistemas de prestaciones parecidas con electrodos que utilizan película de bismuto o de antimonio [41-43, 45, 108].

## 1.5. Técnicas amperométricas

Las técnicas amperométricas están basadas en las propiedades redox de determinadas especies químicas. Se dice entonces que estas especies son electroquímicamente activas y tienen la característica de oxidarse y/o reducirse dependiendo del potencial que se aplique al sistema. La ganancia o pérdida de electrones que caracteriza a la especie química, provoca un aumento o disminución de la intensidad respecto a una corriente de fondo característica de cualquier sistema electrolítico conductor.

Esta variación de intensidad está directamente relacionada con la concentración de la especie electroactiva mediante un modelo matemático que dependerá de la técnica utilizada.



### 1.5.1. Voltamperometría Cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) consiste en variar el potencial aplicado al electrodo de trabajo linealmente a lo largo del tiempo dentro de un rango escogido, primeramente hacia potenciales más negativos (barrido de oxidación), y cuando se alcanza el valor más negativo del rango, el sentido del barrido se invierte y el potencial vuelve, también linealmente, hasta su valor original (barrido de reducción). Así pues, la variación de intensidad de un electrodo estacionario pequeño situado en una disolución no agitada está provocada por una señal de potencial de forma triangular. Este ciclo de excitación a menudo se repite hasta obtener la estabilidad del sistema. El intervalo de potenciales escogido para un experimento dado es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción, controladas por difusión, de uno o más analitos.

Los parámetros importantes en un voltamperograma cíclico son el potencial de pico catódico, el potencial de pico anódico, la intensidad de pico catódico y la intensidad de pico anódico. Para una reacción reversible, las intensidades de pico anódico y catódico son aproximadamente iguales y la diferencia entre los potenciales de pico es de  $0.0592/n$ , donde  $n$  es el número de electrones implicados en la semi-reacción. Asimismo, para reacciones reversibles, los voltamperogramas cíclicos son característicos para cada sistema redox. Así pues, la caracterización básica de especies redox puede llevarse a cabo mediante la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica [109].

La voltamperometría cíclica se utiliza normalmente para proporcionar información cualitativa sobre procesos electroquímicos en diversas condiciones, y permite caracterizarlos y obtener conclusiones respecto a parámetros como potenciales de oxidación y reducción, los aspectos cinéticos de transferencia electrónica sobre la superficie del transductor, la evaluación de la evolución de ésta respecto a una señal de excitación como es el potencial, la reversibilidad de la reacción redox, y aspectos interfaciales como la adsorción de sustancias electroactivas, etc.

### 1.5.2. Voltamperometría diferencial de impulsos

La voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), consiste en aplicar un barrido de potencial no lineal a lo largo del tiempo, de impulsos idénticos y periódicos respecto a lo que sería la línea base de un barrido lineal. Se realizan dos medidas alternativas de la intensidad obtenida, una pocos milisegundos antes de aplicar el pulso, y el otro después de éste. La diferencia de intensidad por impulso se registra en función del potencial que aumenta linealmente. Así pues, se obtiene una curva diferencial en forma de pico, la altura de la cual es directamente proporcional a la concentración de la muestra analizada. Para una reacción reversible el potencial de pico es aproximadamente igual al potencial estándar de semi-reacción. Una ventaja de los voltamperogramas de tipo derivada es que se pueden observar máximos de picos individuales para sustancias que tienen potenciales de semi-onda que difieren en tan sólo unos milivoltios. Por lo menos, la principal ventaja de esta técnica es que permite aumentar significativamente la sensibilidad del método utilizado.

### 1.5.3. Voltamperometría por redisolución anódica

La voltamperometría por redisolución anódica (ASV) es una técnica de determinación analítica que consta de dos etapas fundamentales, la pre-concentración y la redisolución anódica [110]. Durante la pre-concentración del analito es depositado en la superficie del electrodo mediante la aplicación de un potencial catódico (o potencial de acumulación,  $E_{acc}$ ) que provoca su reducción. Este potencial suele fijarse en un valor de 0.3 a 0.5 V más negativo que el potencial estándar del componente que se reduce a un potencial más bajo. Esta pre-concentración se realiza durante un tiempo de acumulación ( $\tau_{acc}$ ) que normalmente varía entre 30 segundos y 20 minutos, en función de la concentración aproximada del metal en solución. Habitualmente la etapa de pre-concentración se lleva a cabo en una disolución agitada, a fin de minimizar los efectos de la difusión por diferencia de gradiente de concentración. La etapa de redisolución, sin embargo, se lleva a cabo en reposo, precisamente para evitar un aporte adicional de electrolito hacia la superficie del electrodo.

La voltamperometría por redisolución anódica es especialmente útil en aquellos casos en que la concentración de la especie a estudiar, está en muy bajas concentraciones, incluso a nivel de traza. El efecto de la pre-concentración de analito en la superficie del electrodo genera en la práctica una concentración mayor, y por tanto más fácilmente detectable, que la concentración real. El control de los parámetros relativos a la dimensión de la superficie del electrodo, y el tiempo de pre-concentración, el potencial de deposición y la velocidad de la agitación, los cuales han de ser mantenidos constantes; permiten hacer un cálculo preciso de la concentración real del analito en la disolución.

En la bibliografía clásica [111], se asocia la técnica de voltamperometría por redisolución anódica con la utilización de electrodos basados en mercurio, debido a la elevada capacidad que tiene éste a amalgamar metales, lo que incrementa la sensibilidad del análisis.

Hoy en día la voltamperometría por redisolución anódica, dentro de las técnicas amperométricas de análisis, es una técnica habitual en la detección y determinación de iones metálicos en solución, que se ha extendido también en el uso de todo tipo de electrodos.

Las técnicas amperométricas son características en la monitorización ambiental, ya que presenta numerosas ventajas que la hacen adecuada para su implementación. Entre estas: relación directa entre la concentración y la intensidad de corriente; se basan en reacciones que tienen lugar en la superficie del electrodo, por lo que no depende del volumen de la muestra; la señal analítica obtenida puede ser directamente procesable, lo que favorece su aplicación en el control de procesos y la automatización; no es susceptible de interferencias de tipo físico (color, turbidez), lo que evita la necesidad de tratamiento de muestra; etc.

Su principal desventaja viene dada por la interferencia en la señal, derivado de la actividad redox de todas las especies electroactivas presentes en una matriz compleja.

## 1.6. Sistemas bioinspirados

Las llamadas tecnologías bioinspiradas nacen de la aplicación de conceptos de inspiración biológica en el diseño de sistemas analíticos; y están basadas en sistemas que emulan la capacidad sensorial del ser humano, desde el aprendizaje hasta el reconocimiento. Diversos ejemplos de estas tecnologías se encuentran disponibles en la vida actual: visión artificial, reconocimiento del habla, capacidad olfativa y del gusto, etc.

Los sentidos utilizan conjuntos de receptores muy parecidos con selectividad cruzada; es decir, ante cierto estímulo, no responde un único receptor sino que responden muchos de ellos con una intensidad diferente. Ante un nuevo estímulo, lo que cambia es la proporción de la respuesta entre los diferentes receptores. El conjunto de señales generado es recopilado en continuo por el sistema nervioso, quien procesa la información para descodificar la información precisa, identificando una percepción precisa (el sabor particular de una fruta, por ejemplo).

Las narices electrónicas fueron los primeros sistemas bioinspirados en aparecer en la década de los 90 [112, 113]. La combinación de diferentes sensores de gases en forma de matriz de sensores no específicos representó un avance considerable en el ámbito de los sistemas de control analítico.

Como consecuencia del aporte de las narices electrónicas, años más tarde aparecieron en el panorama científico las lenguas electrónicas, al extender el concepto anterior al análisis en medio líquido. Las primeras referencias bibliográficas de su desarrollo aparecen a finales de los años 90 y principios del 2000 [114–116].

El fundamento básico de estos sistemas es el uso de matrices de sensores genéricos que ofrecen una baja selectividad y que por tanto responden a la mayoría de componentes contenidos en una muestra. Al presentar una respuesta entrecruzada la señal obtenida de ellos puede aportar un gran valor a la información recolectada.

La informática y las herramientas de procesamiento al alcance de la ciencia en la actualidad permiten que la información generada por las matrices de sensores pueda procesarse de manera factible, lo cual ha permitido que los sistemas bioinspirados tengan aplicaciones de elevado interés.

Cuando los sentidos que se propusieron mimetizar fueron los del olfato y el gusto, estas tecnologías fueron introducidas bajo el nombre de narices y lenguas electrónicas, respectivamente.

Dependiendo del objeto del análisis, se emplearán narices y lenguas electrónicas para la obtención de información cualitativa o cuantitativa. En el caso que el objeto sea la cuantificación de especies presentes en la muestra, la cuantificación simultánea que permiten los sistemas bioinspirados son de especial interés en problemas analíticos con presencia de interferentes, donde una etapa previa de separación era la etapa necesaria en la aproximación clásica, y donde la propuesta ahora es modelar el analito de interés más sus interferentes.

Así pues, dependiendo de la aplicación, encontramos narices [117-119], lenguas electrónicas [120, 121], e incluso integraciones de ambas [122, 123], para la obtención de información tanto cualitativa como cuantitativa, en tareas de control de calidad en la industria alimentaria y medioambiental, entre otros. En el apartado 1.8, se expone más extensamente algunos de los ejemplos que encontramos en la bibliografía relativos a la aplicación de los sistemas bioinspirados.

### **1.7. Interpretación de los datos. Calibración multivariable**

Cuando se trabaja con sistemas complejos, muestras analíticas multicomponente, matrices interferentes y señales de dimensiones elevadas; los métodos convencionales de calibración y de interpretación de las señales son del todo insuficientes.

La química clásica ha resuelto estas situaciones, en la medida de lo posible, bien llevando a cabo un pretratamiento de la muestra para reducir su dificultad de análisis, bien buscando dentro del conjunto de la información aquellas partes o sectores que permiten interpretar los resultados, por ejemplo, con la identificación de picos de corriente que permiten cuantificar especies redox, áreas bajo una curva que permiten también la cuantificación, señales cromatográficas o espectrofotométricas que permiten identificar analitos, etc. Siempre buscando una imagen que nuestra vista permita identificar. No ha sido hasta las últimas décadas que a nivel analítico se ha dado paso al uso de la informática que permita el tratamiento de la información y su interpretación, más allá de nuestra vista.

Otras de las dificultades habituales en la interpretación de la información, que además caracteriza a las señales amperométricas, tratadas en el presente trabajo, es la posible situación de interferencia de la señal de los analitos en muestras complejas, que da como resultado una pobre relación señal/ruido; así como el comportamiento de carácter no lineal que relaciona los datos con los analitos a determinar.

El poder extraer información útil de este tipo de señales y ser capaz de interpretar los datos para que puedan ser utilizados en modelos útiles para la predicción, se ha convertido en una tarea compleja que hace indispensable el uso de herramientas de procesamiento multivariable.

Las técnicas de análisis multivariable permiten determinar la contribución de varios factores en un evento o resultado. Estos factores están relacionados con las variables explicativas del sistema, que en las lenguas electrónicas suelen ser determinadas de forma experimental y están relacionadas con las señales de cada sensor. La variable de respuesta por su parte, se encuentra relacionada con el valor de concentración a determinar.

En las últimas décadas el incremento de capacidad de los sistemas informáticos para el tratamiento de datos, ha hecho el uso de un potente análisis multiparamétrico de las

señales analíticas. Los cálculos sofisticados antaño inconcebibles, son posibles en la época actual, y el potencial de cálculo parece ilimitado.

El tratamiento masivo de información, lo que popularmente se conoce como *big data*, ha permitido a la química analítica disponer de herramientas capaces de discriminar, clasificar, cualificar, cuantificar, y modelar sistemas complejos, que de otro modo serían imposibles de interpretar. Estas herramientas aplicadas a la química se conocen bajo el nombre de herramientas quimiométricas.

La propuesta y desarrollo de diversos métodos basados en cálculos matemáticos, estadísticos y de lógica formal, tiene por fin establecer o seleccionar procedimientos que permitan efectuar tareas para discriminar, cuantificar, clasificar y modelar sistemas tratando de usar la máxima información relevante de los datos analíticos disponibles [25, 124].

En este sentido, la utilización de algoritmos de clasificación está ampliamente difundida. Algunos de ellos son herramientas especializadas en el análisis de datos y de dominios particulares. Así, es posible encontrar modelos estadísticos puros, metodologías como el Análisis de Componentes Principales (PCA), algoritmos genéticos, algoritmos no lineales basados en redes neuronales, clasificadores Bayesianos, Máquinas de Soporte Vectorial (SVM), entre algunos de los más utilizados [125]. Por otro lado, los modelos de cuantificación están relacionados principalmente con técnicas de análisis de regresión. Por lo general, estos modelos se utilizan para describir el efecto de ciertas variables sobre otras, con el fin de estimar el efecto cuantitativo entre ellas. La regresión se puede considerar como un problema de optimización para el que se intenta encontrar una solución en la que se reduce al mínimo el error. Algoritmos tales como la Regresión de Componentes Principales (PCR), la Regresión Parcial por Mínimos Cuadráticos (PLS) y la Regresión Lineal Múltiple (MLR), se suelen utilizar para resolver este problema de optimización [126].

Se describen a continuación algunas de las herramientas más habituales para el tratamiento de los datos, y que además han sido utilizadas en el presente trabajo.

Concretamente se introducen el análisis de componentes principales, las técnicas de regresión parcial PLS, las redes neuronales artificiales, la transformada Wavelet y las redes neuronales tipo Wavelet.

### **1.7.1. Análisis de componentes principales**

Una de las metodologías más comunes para el procesamiento multivariable, es la reducción de datos empleando métodos de cálculo capaces de disminuir el volumen de la información de forma que ésta quede contenida, sin pérdidas relevantes, en un menor número de variables. El método de análisis de componentes principales (PCA) permite reducir el número de variables tratando de conservar la información significativa. Su fundamento consiste en observar la varianza en los datos experimentales en unos nuevos ejes de coordenadas que agrupen la información [127]. El análisis en PCA puede ser considerado como un cambio de ejes de coordenadas en el que se obtienen unas nuevas variables (llamados componentes principales) que explican la mayor parte de la variabilidad del conjunto de datos. Esta técnica resulta útil cuando conseguimos explicar el sistema analítico de forma significativa con un conjunto reducido de componentes principales. A fin de plantear el problema y entender el resultado obtenido con PCA, es necesario tener conocimientos previos para intentar asignar un significado físico a cada uno de los componentes principales que nos han permitido la agrupación de las muestras según sus características.

Otras técnicas empleadas en la reducción de datos, son los polinomios de Legendre en donde la respuestas de los sensores son aproximados a una serie de potencias [128, 129], la Transformada de Fourier (FT) empleada para descomponer la señal en una serie de coeficientes que corresponden al contenido frecuencial de la señal original [130] y la descomposición por wavelets [131], consistente en descomponer la señal en distintos componentes frecuenciales de manera que cada uno de ellos tenga una resolución de acuerdo a una escala [132]. Estas técnicas posibilitan la obtención de información relevante y permiten construir a partir de ella modelos de calibración adecuados.



### **1.7.2. Regresión parcial por mínimos cuadráticos**

En análisis multivariable puede darse el caso de tener que estudiar sistemas analíticos con gran cantidad de variables medidas y con un número muy reducido de muestras, lo que supone una situación poco favorable para la predicción de nuevas muestras en modelos de calibración. En situaciones de este tipo es útil llevar a cabo un análisis por Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS). Se trata de un modelo estadístico lineal que permite la cuantificación predictiva, previo a unas etapas de entrenamiento y validación. Este tipo de análisis es una variante del análisis por PCA. En este caso se aplica una transformación similar a PCA, tanto a las respuestas de los sensores, como a los valores de las concentraciones de los elementos químicos que se están prediciendo. Posteriormente se aplica una regresión lineal a cada componente principal a fin de obtener un modelo de regresión entre datos y concentraciones. Así pues, PLS no proyecta los componentes principales que presentan mayor variabilidad, sino que se utilizan aquellas direcciones que presenten mayor capacidad de predicción del modelo analítico presentado. De este modo los componentes obtenidos corresponden a los encontrados por PCA aplicando una corrección que permite una mayor capacidad predictiva.

El método PLS otorga buenos resultados cuando existe una relación lineal entre alguna variable medida y las concentraciones de las especies buscadas. Los métodos de calibración multivariante utilizados en este trabajo fueron los de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS1 y PLS2) y PLS polinómicas. Se puede encontrar una descripción detallada de estos métodos en la bibliografía [133].

En el próximo apartado se lleva a cabo una introducción a otra de las herramientas actuales que permite la obtención de un modelo a partir de un conjunto de datos de calibración, las Redes Neuronales Artificiales.

### **1.7.3. Redes neuronales artificiales. Fundamentos matemáticos y proceso de aprendizaje**

La inteligencia artificial engloba un conjunto de técnicas de procesamiento computacional que intentan reproducir las operaciones internas del cerebro humano. Dentro de esta disciplina, las Redes Neuronales Artificiales (ANN) son sistemas de cómputo que emergieron como modelos matemáticos simplificados de las unidades fundamentales que constituyen el cerebro humano, las neuronas, a fin de entender mejor la neurobiología y la psicología cognitiva.

El interés y el objetivo inicial del desarrollo de estos sistemas surgió de áreas biológicas y de la necesidad del conocimiento del cerebro, la percepción y la cognición humana [134, 135]. Sin embargo su uso se ha extendido a otras áreas científicas, debido a su óptimo funcionamiento en tareas como la clasificación, regresión y el pronóstico [136, 137] en sistemas hasta entonces difíciles de modelar, sistemas no lineales con una gran cantidad de variables de entrada.

Una de las áreas de aplicación de las ANNs con mayor éxito ha sido la del desarrollo de sistemas bioinspirados, basados en los sentidos del olfato y del gusto. La nariz electrónica [118], fue la primer aplicación en ser concebida y aplicada, ganando el reconocimiento en campos como el alimentario y el diagnóstico médico. La lengua electrónica [114], desarrollada posteriormente, tiene interés especial en el área química. Las redes neuronales son especialmente interesantes debido a su adaptabilidad con casi cualquier transformada matemática. Los modelos que se obtienen pueden ser lineales o no lineales, lo que les permite adaptarse a diferentes tipos de sensores, haciéndolas útiles no solo la calibración multivariable de Lenguas Electrónicas, sino en otras muchas tareas propias de la química analítica, como son la cualificación y cuantificación de múltiples analitos en muestras complejas [115, 138–152].

Ambos sistemas están en desarrollo continuo y las ANN han desempeñado un papel dominante.

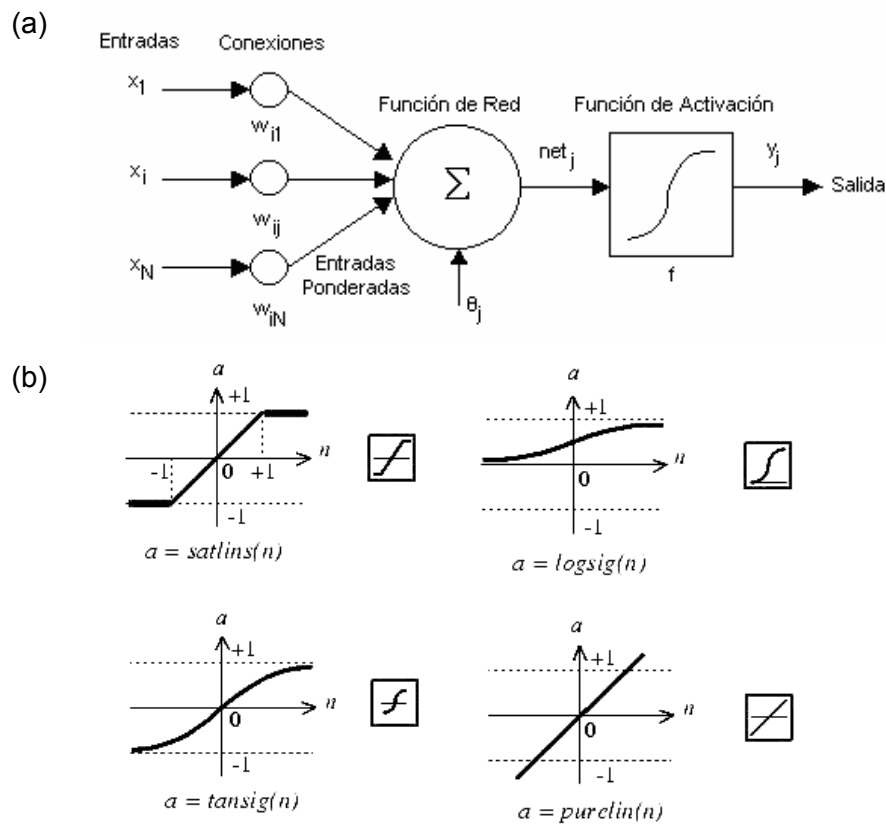
### **Unidad básica de procesamiento. El perceptrón.**

El elemento fundamental de procesamiento que se asimila a las neuronas se conoce con el nombre de perceptrón. El perceptrón es una unidad de toma de decisión compuesta de múltiples entradas ponderadas y una sola salida. Estos elementos simples se conectan entre sí para formar estructuras más complejas, que intentan reproducir el comportamiento del cerebro humano.

En una neurona artificial (perceptrón) las entradas se ponderan con valores positivos o negativos antes de entrar en la neurona. Un valor positivo representa una conexión excitatoria mientras que un valor negativo representa una conexión inhibitoria. La suma de estos valores ponderados produce una salida que depende de si la suma ponderada ha alcanzado o no el umbral de disparo predefinido; de forma equivalente al comportamiento de una neurona real. Así pues, el perceptrón se comporta de una forma determinada, en función de la señal, los pesos o ponderación aplicada a cada señal, y el valor umbral que debe superar para transferir la información. El aprendizaje de la neurona consistirá entonces en el ajuste de los valores de los pesos y el umbral de transferencia, de manera que con el tiempo el perceptrón llegue a producir el estímulo deseado.

El valor umbral que condiciona la transferencia de información de una neurona a otra, a nivel computacional viene expresada como una función, la función de activación, que puede corresponder a un valor binario (tal y como describe la neurona artificial descrita por McCulloch-Pitts [153], precursor de la de los estudios de las redes neuronales vinculados a la computación moderna), u otras funciones que han demostrado en aplicaciones más actuales, mayor capacidad para la resolución de determinados problemas.

La siguiente figura corresponde al esquema de una red neuronal y a diferentes funciones de activación de aplicación actual:



**Figura 1.4.** (a) Unidad de proceso típica y (b) Funciones de transferencia utilizadas habitualmente en ANNs (sat-lineal, log-sigmoidal, tan-sigmoidal y lineal pura).

A nivel computacional, cada unidad de proceso se compone de una red de conexiones de entrada, una función de red (de propagación) encargada de computar la entrada total combinada de todas las conexiones, un núcleo central de proceso encargado de aplicar la función de activación, y la salida, por dónde se transmite el valor de activación a otras unidades.

Para comprender el funcionamiento del modelo, definiremos los siguientes conceptos:

**Conexiones ponderadas:** Ejercen el papel de las conexiones sinápticas. El peso de la conexión equivale a la fuerza o efectividad de la sinápsis. La existencia de conexiones

determina si es posible que una unidad influya sobre otra, el valor de los pesos y el signo de los mismos definen el tipo (excitatorio/inhibitorio) y la intensidad de la influencia.

*Función de propagación o de red:* Calcula el valor neto de la entrada total a la unidad, generalmente corresponde a la suma de todas las entradas ponderadas recibidas, es decir, de las entradas multiplicadas por el peso o valor de las conexiones. Esta suma equivale a la combinación de las señales excitatorias e inhibitorias de las neuronas biológicas. Si asumimos que tenemos un número  $N$  de entradas, se tiene la siguiente definición:

$$net_j = \sum_{i=1}^N w_{ji} \cdot x_i \quad (1.5)$$

*Función de activación:* Es quizá la característica principal de la neurona, y la encargada de definir el comportamiento de la misma. Como se ha explicado anteriormente, se usan diferentes tipos de funciones, desde simples funciones de umbral hasta funciones no lineales. De modo que una vez que la entrada neta de la neurona ha sido calculada, se transforma al valor de activación o activación simplemente. Este valor de activación puede escribirse como sigue:

$$a_j(k) = f(a_j(k-1), net_j(k)) \quad (1.6)$$

De lo anterior se observa que la activación  $a_j(k)$  es función de la entrada total  $net_j$  y que depende también del valor anterior de la activación  $a_j(k-1)$ . La notación de  $k-1$  denota un paso previo antes del instante  $k$ .

En la mayoría de los casos, la activación y la entrada total son idénticas y los términos pueden intercambiarse. De éste modo, el único parámetro que es modificado por la función de activación  $f$  de la neurona será directamente la suma ponderada  $net$ . Por lo que la salida de la neurona  $y_j$  viene dada por la siguiente expresión:

$$y_j = f(\text{net}_j + \theta_j) = f\left(\sum_{i=1}^N w_{ji} x_i + \theta_j\right) \quad (1.7)$$

El término  $\theta_j$  que aparece en esta última definición obedece al hecho de que la función de activación no está centrada en el origen del eje que representa el valor de la entrada total, sino que existe cierto desplazamiento debido a las características internas de la propia neurona y que difiere en cada una de ellas, por lo que su valor tan sólo representa un parámetro de ajuste y no una entrada más. Este valor es conocido como *bias* y representa el nivel de activación de la neurona.

*Salida:* Corresponde al valor calculado por la función de activación de la neurona, este valor cumpliría la función de la tasa de disparo en las neuronas biológicas.

Aun cuando el perceptrón ha representado un avance fundamental en las nuevas técnicas de procesamiento multivariable, posee ciertas limitaciones, y no es capaz de modelar algunos tipos de sistemas complejos. Para solventar estos inconvenientes, se propone utilizar una combinación de perceptrones, imitando también la conformación del cerebro; este nuevo concepto es el origen de las redes neuronales artificiales.

Así pues, identificadas las características esenciales del modelado de una neurona artificial, para implementar el modelo es importante establecer como estarán conectadas unas unidades con otras y determinar adecuadamente los pesos de las conexiones. Para diseñar una red lo más usual es disponer las unidades en forma de capas. Se conoce como capa o nivel a un conjunto de neuronas cuyas entradas provienen de la misma fuente y cuyas salidas se dirigen al mismo destino. En esencia, una red dispone de tres tipos de capas:

- Capa de Entrada. Siendo la primera capa, recibe datos del exterior de la red, almacenando la información bruta suministrada a ésta. En general esta capa estará compuesta de  $n$  neuronas, una por cada una de las variables que abastecen de información a la red.

- Capa/s Oculta/s. También conocidas como intermedias, son las encargadas de extraer, procesar y memorizar la información. Así pues, recibe y envía datos entre capas. La configuración exacta de ésta capa, se determina en la fase de entrenamiento.
- Capa de Salida. Almacenando la respuesta de la red para que pueda ser utilizada, envía datos fuera de ésta.

### **Taxonomía de las ANNs**

Arquitecturas más grandes emergieron a partir de este concepto de perceptrón. Pueden establecerse dos tipos de clasificación de las ANNs; según la dirección del flujo de información, y según el proceso de aprendizaje.

Por un lado podemos diferenciar entre las redes neuronales feedforward (o unidireccional) y las redes recurrentes [154, 155]. En una red feedforward las señales se propagan en una dirección, todas las neuronas de una capa reciben señales de entrada de otra capa anterior, más cercana a la entrada de la red, y envían las señales de salida a una capa posterior, más cercana a la salida de la red. Esto es, la información fluye de la entrada hacia la salida. En las redes recurrentes existen conexiones de realimentación y conexiones de retroalimentación, entre capas.

El aprendizaje, también conocido como entrenamiento, se define como la optimización de los pesos en las conexiones entre neuronas para modelar correctamente una relación entrada-salida. Así, podemos hablar de entrenamiento mediante un procedimiento *supervisado* o *no supervisado*. En el entrenamiento supervisado la red ajusta los valores de los pesos en base a la diferencia entre los valores de salida de la red y los valores esperados para un determinado patrón de entrada. En el entrenamiento no supervisado la red aprende a agrupar los valores de entrada sin recibir información adicional de los grupos esperados.

El Perceptrón Multicapa (MLP) es la red más usada en la actualidad ya que se puede aplicar en problemas de clasificación, modelado, predicción de series temporales, control

discreto, etc. [156–158]. La arquitectura de un MLP está formada por capas con propagación hacia delante (*feedforward*) siguiendo un procedimiento de aprendizaje supervisado.

Los MLP no son la única clase de red que existen, pero son los que han demostrado el mejor funcionamiento para el desarrollo de sistemas bioinspirados [159]. Otros tipos de redes son las Redes de Función Radial Base (RBF), la Red Neuronal Probabilística (PNN), las Redes Neuronales de Regresión Generalizada (GRNN), Redes Lineales y Mapas Autoorganizativos (SOFM) [158, 160–162].

Todas estas redes pueden ser utilizadas para predecir valores, encontrar patrones, filtrar señales, clasificar, comprimir y modelar relaciones de entrada-salida de datos. Esta última aplicación junto con su capacidad para generalizar nuevas situaciones, son las principales razones que motivan a utilizar arquitecturas neuronales como modelos de calibración de lenguas electrónicas.

### **Aprendizaje de las ANNs**

Biológicamente, se suele aceptar el hecho de que la información memorizada en el cerebro está más relacionada con los valores sinápticos de las conexiones entre las neuronas que con ellas mismas, del mismo modo, en el modelo de una ANN, son los pesos de las conexiones los que determinan el “conocimiento” de la red. Por consiguiente, resulta indispensable conocer los procedimientos para establecer los valores de las conexiones entre neuronas (conocidos como algoritmos de aprendizaje).

De ese modo, una ANN aprende, adaptando los pesos de las conexiones entre las neuronas con el objeto de modelar correctamente una relación de la entrada-salida [163]. Las redes del tipo MLP aprenden la relación entre las variables de entrada y salida usando un algoritmo de entrenamiento supervisado conocido como retropropagación del error (*backpropagation*) [137, 154, 157, 161, 164–167].



Con su implementación, la red aprende un conjunto predefinido de pares de entradas y salidas dados como ejemplo, empleando un ciclo de propagación-adaptación de dos fases. Durante la primera fase el patrón de entrada es presentado a la red y propagado a través de las capas superiores hasta llegar a la capa de salida. Obtenidos los valores de salida de la red, se inicia la segunda fase, comparándose estos valores con la salida esperada para obtener un error, en base a éste se ajustan los pesos de la última capa para después retropropagarlo hacia la capa anterior, ajustando convenientemente los pesos y continuando con este proceso hasta llegar a la primera capa. De este modo, es como se modifican los pesos de conexión de cada unidad, para lograr que la red converja hacia un estado que permita identificar todos los patrones de entrenamiento. En esencia se trata de un proceso de minimización multivariable, en el que intentamos encontrar los pesos que producen un error mínimo, es decir conseguimos el aprendizaje. Cada ciclo completo de propagación a través de la red y la consecuente reasignación de pesos, es conocido como *época*.

La Figura 1.5 muestra un esquema simple del modo en que opera una ANN clásica.

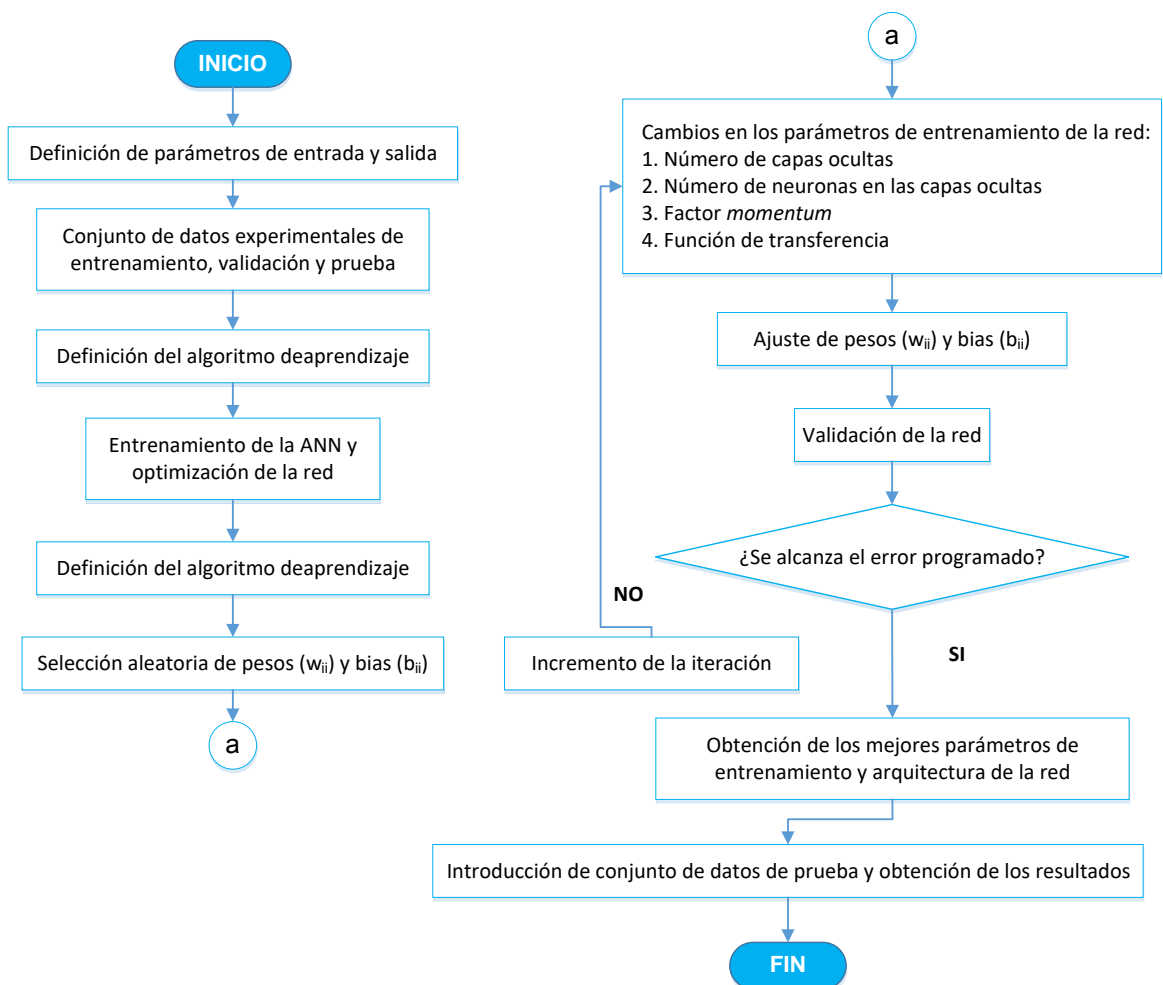


Figura 1.5 Esquema simple que muestra la forma en como opera la ANN

El algoritmo de retropropagación usa una técnica de minimización del error mediante una variación gradual, esto significa que sigue a una función o superficie del error asociada a la red mediante un descenso gradual que intenta alcanzar el mínimo global de la superficie. Esto hace imprescindible el uso de neuronas cuya función de activación sea continua y diferenciable.

Con el objeto de localizar el mínimo de forma estable y con buena precisión, se hace uso un parámetro que regula el progreso de aprendizaje de la red, a este término se le

conoce como tasa de aprendizaje (*learning rate*) [160], y se acostumbra a ir reduciéndolo a medida que avanza el proceso de aprendizaje.

En el mejor de los casos, se desea que la búsqueda culmine al encontrar el mínimo global, sin embargo, es precisamente durante la exploración de la superficie de error que se localizan muchos mínimos locales antes de llegar al mínimo global, por lo que, resulta probable que el entrenamiento se quede estancado en un mínimo local si el algoritmo únicamente está diseñado de forma tal que su tarea primordial sea la reducción del error global de entrenamiento. A fin de tratar de evitar este problema, existen variantes en los procedimientos de entrenamiento que utilizan un término para poder resarcir de la caída en un mínimo local, a estas variantes se les conoce como aprendizaje con momento (*momentum*).

### **El fenómeno de sobreentrenamiento**

La asignación de grandes cambios en los pesos de las conexiones que aceleran el entrenamiento, puede hacer que la red converja rápidamente. Esto implica una escasa generalización de la red y que el error asociado al entrenamiento sea tan pequeño que cuando se introduzca en la red una muestra que no haya formado parte del entrenamiento se obtenga un error asociado muy grande. Este fenómeno se conoce con el nombre de sobreentrenamiento (*overfitting*).

Existen dos metodologías que intentan proporcionar una buena generalización a modelos obtenidos con ANNs: el paro anticipado (*early stopping*) y la *Regularización Bayesiana* [168]. El primero consiste en parar el entrenamiento antes de que se produzca el sobreentrenamiento. Su implementación consiste en emplear un subconjunto de datos de prueba para evaluar el comportamiento de la red después de cada iteración; si la salida esperada para los datos de prueba mejora entonces se continúa el entrenamiento, si por el contrario la salida esperada empeora entonces se da por concluido el entrenamiento de la red. En la segunda metodología se basa en encontrar la ANN más simple posible que proporcione buenos resultados. En este caso se minimiza una combinación lineal de sumas de errores y pesos al cuadrado que al final del entrenamiento permite tener una

mejor capacidad de generalización de la red entrenada. La siguiente figura muestra una representación gráfica de la implicación del sobreentrenamiento de la red en la predicción de resultados.

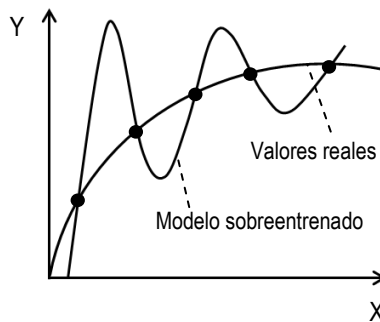


Figura 1.6 Representación esquemática de un sobreentrenamiento.

#### 1.7.4. Transformada wavelet

A pesar de que las redes neuronales feedforward con función de activación sigmoideal son capaces de aproximar cualquier función continua, experimentalmente se ha comprobado que no en todos los casos es posible modelar satisfactoriamente una señal compleja utilizando funciones de transferencia sencillas [169]. Evolutivamente, el uso de funciones de transferencia más complejas en las ANNs, como las funciones wavelet, ha permitido conseguir los resultados de modelación deseados.

La Transformada Wavelet (WT) es una técnica de procesamiento de señales usada para convertir una señal (o función) de su dominio original a otro dominio donde ciertas características de la señal original son más fáciles de estudiar [170, 171].

Podemos decir que la transformada wavelet tiene una base fundamentada en su precursora, la transformada de Fourier. Se puede representar una función periódica por un conjunto de ondas sinusoidales, funciones seno y coseno, utilizando la transformada de Fourier. Estas ondas sinusoidales son suaves, simétricas, capaces de dilatarse o contraerse (escalarse), y suficientes para analizar las señales de frecuencia constante.

Por otro lado, las funciones wavelets, utilizadas para el procesamiento mediante la transformada wavelet, son irregulares y a veces no simétricas, y se utilizan para analizar las señales transitorias, señales anómalas y pulsos. Las funciones wavelets, a diferencia de la transformada de Fourier, pueden además trasladarse en el tiempo. Estas propiedades que las diferencian hacen que la transformada wavelet sea una buena opción para el análisis de señales no estacionarias, con elevado componente de ruido, e intermitentes o transitorias.

Matemáticamente hablando, la transformación en sí, consiste en la convolución de la señal a analizar con un conjunto de funciones obtenidas mediante el escalamiento y la traslación de una función base conocida como *función wavelet madre* [170, 172].

Como hemos dicho, el punto de partida del análisis wavelet radica en una función  $\psi(x)$  de variable real  $x$  que se conoce como función wavelet madre, la cual por definición debe oscilar en el tiempo, tener energía finita y estar perfectamente localizada en el dominio temporal. El término *wavelet* debe su nombre a la relación entre el concepto de onda y el acotamiento de ésta en el tiempo. Una wavelet es por tanto una forma de onda de duración limitada que tiene un valor promedio igual a cero y que generalmente posee una forma irregular y asimétrica. Como toda herramienta de origen matemático, las wavelets presentan características propias que las hacen únicas. De estas características el concepto de localización temporal es expresado en la forma habitual de rápido decaimiento hacia cero cuando la variable independiente  $x$  tiende a infinito. Con lo que la idea de oscilación de la función es representada de acuerdo a las expresiones siguientes:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \psi(x) dx = 0 \quad \text{y} \quad \int_{-\infty}^{+\infty} x^{m-1} \psi(x) dx = 0 \quad (1.8)$$

siendo ( $m \Leftrightarrow 1$ ) el valor del orden del momento de la función  $\psi(x)$ .

Es a partir de una wavelet madre que se genera una familia de funciones escaladas y trasladadas conocidas como *wavelets hijas* expresadas por  $\psi_{s,t}(x)$  y que se encuentran definidas por:

$$\psi_{s,t}(x) = \frac{1}{\sqrt{|s|}} \psi\left(\frac{x-t}{s}\right), \quad s, t \in \mathcal{R} \quad (1.9)$$

El parámetro  $s$  es llamado *escala* y permite efectuar acciones de compresión o dilatación de la wavelet madre, y el parámetro  $t$  es la *traslación* de ésta a lo largo del eje del tiempo. El factor  $1/\sqrt{|s|}$  corresponde a un factor de normalización de la energía a lo largo de las diferentes escalas. En la figura 1.7, se representa el ejemplo de una wavelet madre (a) y el efecto que se produce al variar el parámetro de la escala (b y c), la traslación puede observarse en (d). Se puede notar que sin importar el factor de escala o de traslación, la forma de la onda se mantiene al igual que el número de oscilaciones.

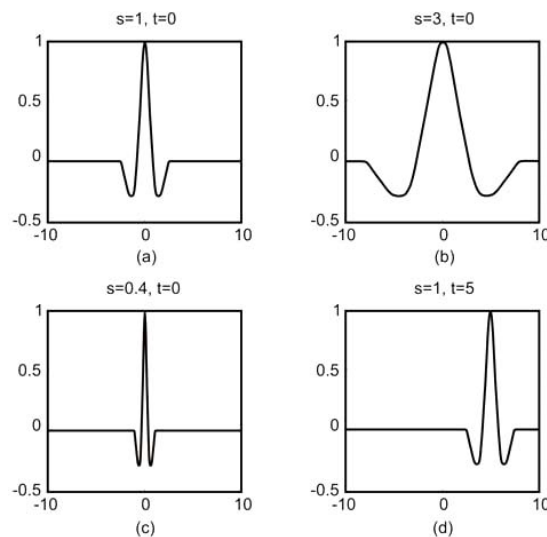


Figura 1.6. Traslación y Escalamiento de una wavelet.

La teoría wavelet generalmente se clasifica en transformada wavelet discreta (DWT) y transformada wavelet continua (CWT).

La elección de una u otra depende del propósito del procesamiento que se va a llevar a cabo. La DWT es capaz de eliminar ruido de la señal y comprimir los datos, a fin de disminuir la magnitud de los datos de la señal y facilitar su procesamiento, ya que es capaz de separar y eliminar ciertas frecuencias y reconstruir la señal original a través de la transformada inversa. Por otro lado, la CWT permite detectar discontinuidad en una señal.

Una wavelet  $\psi(x)$  es una función cuadrática integrable que satisface ciertas condiciones matemáticas descritas en las referencias [170–181]. Del análisis de las condiciones matemáticas más relevantes (admisibilidad y regularidad), se desprende que la transformada wavelet es un filtro pasa-banda en el plano de Fourier, por tanto, la transformación wavelet de una señal es equiparable a que la señal sea procesada a través de un banco de filtros.

Para entender con mayor detalle la transformación wavelet, es necesario hacer a continuación una breve introducción a los bancos de filtros.

### **Bancos de filtros**

Los bancos de filtros son la base de la comprensión del concepto de wavelets, tanto para la transformada discreta y como para la continua.

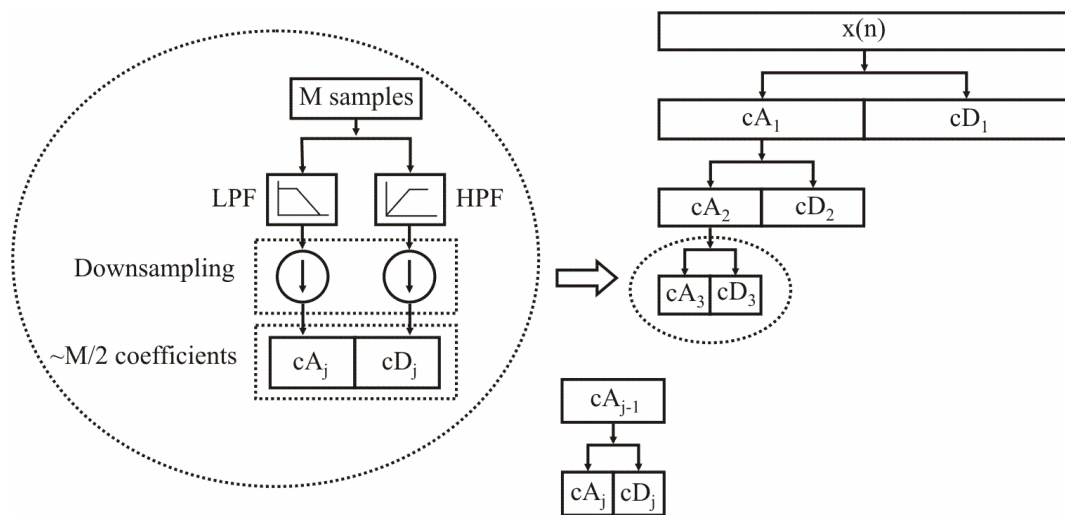
Partiendo de un sistema está formado por un banco de filtros de dos canales (pasa-baja y pasa-alta), la señal es filtrada primeramente por los filtros de descomposición pasa-alta y pasa-baja. A partir de los filtros pasa-alta y pasa-baja, se obtienen respectivamente coeficientes de detalle y de aproximación de la señal. El contenido espectral asociado a este primer coeficiente de aproximación, puede a su vez descomponerse a un mayor nivel de descomposición, dependiendo del objetivo del análisis. Y así sucesivamente, obteniendo un número  $n$  de coeficientes de detalle y un coeficiente de aproximación.

En cada nivel de descomposición los filtros producen señales que tienen la mitad del contenido espectral y el mismo periodo de muestreo que el nivel anterior.

Los filtros pasa-alta proporcionan detalles (coeficientes de detalle) de la señal, que podría incluir ruido de la señal medida. Los filtros pasa-baja corresponden a información de la parte de la señal suavizada (coeficientes de aproximación). Mediante la adición de detalles y aproximaciones, es posible reconstruir perfectamente la señal original, siempre y cuando ninguno de los coeficientes de detalle o aproximación se desestimara (por ejemplo en etapas de eliminación de ruido o de compresión de la señal).

Los bancos de filtros de dos canales y los multicanales se utilizan para construir bancos de filtros con estructura de árbol, que luego se utilizan para implementar DWT.

La siguiente figura muestra la estructura de árbol de un banco de filtros y los coeficientes wavelet obtenidos.



**Figura 1.8.** Algoritmo piramidal de Mallat utilizado para implementar la DWT. Los vectores de aproximación y detalle se indican con  $cA$  y  $cD$ , respectivamente; y los subíndices corresponden al nivel de descomposición [182].

La estructura de árbol traspassa la señal obtenida en el filtro pasa-baja a un segundo nivel de filtros pasa-alta y pasa-baja de forma recurrente, y el número de recurrencias (nivel de descomposición) depende del tipo de análisis.



La señal original se puede reconstruir a partir de los coeficientes de aproximación y detalle obtenidos de la DWT. El proceso de reconstrucción, conocido como Transformada Wavelet Discreta Inversa (IDWT) es básicamente lo opuesto al proceso de descomposición. Si los coeficientes de aproximación y detalle obtenidos son suficientes para interpretar la señal, el resultado de la reconstrucción proporciona una señal esencialmente idéntica a la original.

La transformada wavelet discreta se aplica utilizando una estructura de árbol con banco de filtros de banda de octava, y un determinado nivel de descomposición propuesto.

Las bases en el DWT son ortogonales entre sí. DWT se utiliza para la detección de singularidad en una señal.

Las funciones wavelet se construyen utilizando funciones de escala mediante el escalamiento y la translación de la función original de escala iterando un banco de filtros. En DWT el proceso de iteración se limita a un número finito. CWT se construyen mediante la iteración del filtro de un número infinito de veces.

La CWT tiene algunos inconvenientes que hacen que sea difícil de implementar directamente. La primera desventaja es la redundancia de la CWT, cuando la transformada wavelet se calcula por la continua traslación de una función escalable sobre la señal y el cálculo de la correlación entre los dos. Estas funciones escaladas son continuas y por lo tanto la obtención de coeficientes wavelet son altamente redundantes. El segundo es el número infinito de wavelets que intervienen en la transformada. El tercer problema es que para la mayoría de las funciones la transformada wavelet no tiene solución analítica y sólo puede calcularse numéricamente. Por lo tanto, la DWT ha desarrollado algoritmos que puede superar los inconvenientes de la CWT. La DWT tiene la capacidad de resolver un amplio conjunto de situaciones [183].

Las funciones wavelet seleccionados deben aproximarse de manera eficiente a la señal de interés y proporcionar solamente unos coeficientes que no sean cero. Por lo tanto, las wavelet deben optimizarse utilizando una familia de wavelets para producir el mayor número de coeficientes wavelet con apenas valores cero.

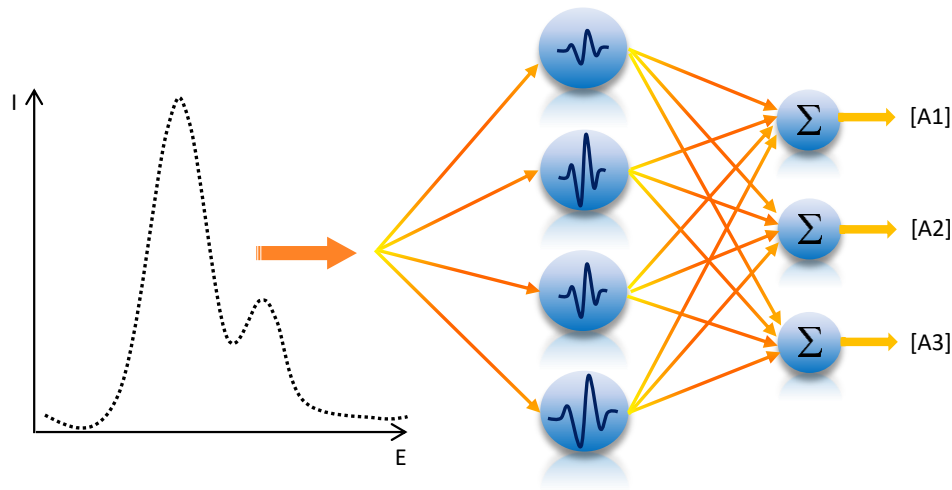
Para una información más detallada de las ecuaciones asociadas a la teoría CWT y DWT, puede consultarse bibliografía específica que profundiza en su descripción matemática [171, 174, 184, 185].

#### **1.7.5. Red neuronal wavelet**

La señal de partida de las lenguas voltamperométricas es muy compleja, ya que incumbe a un voltamperograma completo en que cada valor de intensidad correspondería a una entrada a la red neuronal. De forma directa es inviable su procesamiento, y por tanto resulta necesario llevar a cabo una compresión o simplificación de esa información, antes de incorporarla a una ANN. Este problema es todavía más comprometido cuando se trata de procesar señales de varios sensores, pues se incrementa la dimensionalidad.

Una solución aplicada hasta el momento consiste en comprimir la información mediante PCA, FT o WT, e ingresar la información comprimida a la ANN.

Tradicionalmente, las ANNs y WT han sido dos disciplinas empleadas en el procesamiento de datos de forma separada. La fusión de la teoría wavelet con las redes neuronales artificiales, ha originado en los últimos años una estrategia para el procesamiento de señales, conocida como Red Neuronal Wavelet (WNN) [186], de carácter no estacionario, es una propuesta que permite introducir la señal voltamperométrica completa a la ANN, optimizando a la vez el grado de compresión que se realiza.



**Figura 1.9.** Gráfico ilustrativo de la arquitectura de una WNN. Cada punto del voltamperograma corresponde a una entrada de la red. A1, A2 y A3 corresponden a los analitos objeto de estudio.

Esta novedosa metodología de procesamiento de señales ha demostrado proporcionar unos buenos resultados, desde el punto de vista de rapidez en el procesamiento así como en la calidad de los resultados, en comparación con la aplicación de ANN a señales preprocesadas. Así, se encuentra en la bibliografía aplicaciones efectivas para tareas de modelización, predicción y procesamiento de señales en diversas disciplinas científicas [187].

Como hemos visto en el apartado anterior, una de las aplicaciones de la transformada wavelet es la compactación de señales, representándolas mediante un conjunto de coeficientes. Por su parte la red neuronal artificial es la encargada de transformar al conjunto de coeficientes en la información buscada [131].

Sin embargo, el trabajo fundamental para el desarrollo e implantación de esta estrategia viene determinado por la obtención de la combinación adecuada de WT y ANN que permita obtener los mejores resultados. De esta forma, primero es necesario determinar la función wavelet madre y el máximo nivel de compactación que mejor represente a la señal original. En segundo lugar, se debe encontrar un tipo de ANN y su estructura

apropiada para interpretar la señal compactada. Así pues, se requiere de dos procesamientos por separado.

La idea principal que introdujo la teoría wavelet en una estructura neuronal, consiste en la sustitución de las funciones de activación de la capa oculta de la red convencional, por funciones wavelet.

La primera aproximación a un modelo de WNN toma sentido, si la fórmula de inversión de la WT es observada como una suma de productos entre los coeficientes wavelet y la familia de wavelets hijas [132]. Esta definición establecida por Strömber substituye las integrales correspondientes por una suma:

$$f(x) = \sum_{s=-\infty}^{\infty} \sum_{t=-\infty}^{\infty} w_{s,t} \psi_{s,t}(x) \text{ con } t, s \in \mathfrak{R} \quad (1.10)$$

donde  $w_{s,t}$  representa los coeficientes wavelets de la descomposición de  $f(x)$  y  $\psi_{s,t}$  las wavelets hijas.

La WNN se basa en la semejanza encontrada entre la ecuación propuesta por Strömberg y la capa oculta en un Perceptrón Multicapa [132]. De hecho, la descomposición wavelet puede ser vista como una red neuronal, de forma que en el modelo las wavelets estarán indexadas por  $i=1, \dots, k$ , en lugar del doble índice  $(s,t)$  que representaba el escalamiento y traslación de la wavelet madre respectivamente (figura 1.10).

$$y = \sum_{i=1}^k w_i \psi_i(x) \quad (1.11)$$

Estudios relacionados con la implementación de redes, han demostrado que con un sistema compacto de funciones situadas en la capa oculta de un MLP de sólo tres capas, es posible aproximar cualquier función arbitraria y continua con una precisión

predeterminada que está definida por las características de la familia de funciones empleadas así como por el error de aproximación establecido para el ajuste [188], [189]. Así, para el desarrollo de una WNN suele considerarse la estructura de un MLP de tres capas (entrada, capa oculta y capa de salida) debido a que resulta más simple su análisis y por tanto su implementación.

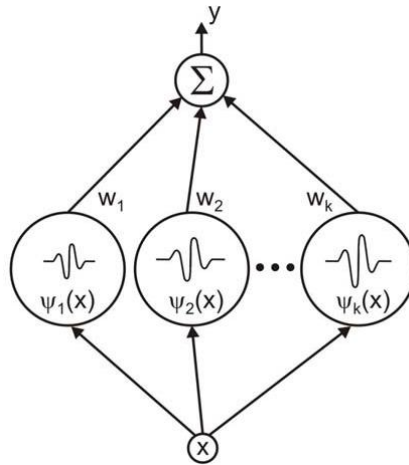


Figura 1.10. Expansión wavelet vista como una red neuronal.

Esta última definición representa un caso unidimensional en donde la aproximación de la entrada se efectúa sólo en un plano, representando así la base para arquitecturas más complejas.

### Arquitecturas WNN

- **Red Neuronal Wavelet de una salida**

Tal y como se ha mencionado, en el área química se ha establecido la red neuronal wavelet, como una potente herramienta de procesamiento multivariable, con ejemplos tales como en procesos de control [138, 190–199], áreas de cromatografía [200], cronopotenciometría [201], y en el desarrollo de modelos de calibración para la determinación de compuestos [149, 151, 176, 190, 191, 193, 199, 202–212].

De manera común, las arquitecturas reportadas hasta hace una década, hacían uso de una arquitectura MLP de una salida, similar a la que se muestra en la Figura 1.11.

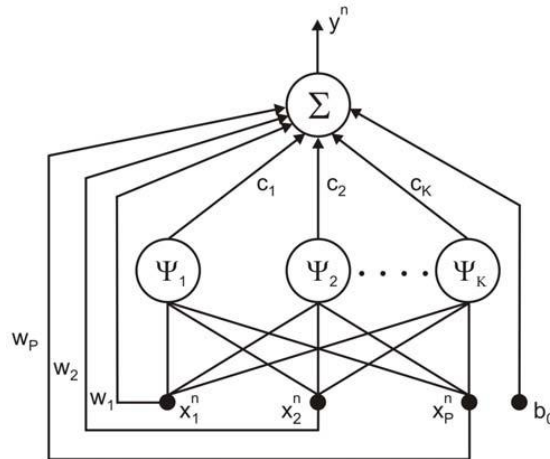


Figura 1.11. WNN de una sola salida.

En este modelo la salida  $y^n$  es un escalar que representa el valor que se espera mapear por cada vector  $x^n$  de entrada, su definición está establecida por:

$$y^n = \sum_{i=1}^K c_i \Psi_i(x^n) + b_0 + \sum_{j=1}^P w_j x_j^n \quad (1.12)$$

donde  $x^n$  corresponde al n-ésimo vector de muestras de entrada que posee  $P$  elementos de forma que  $x^n = [x_1^n, x_2^n, \dots, x_p^n]$ ,  $K$  representa el número de neuronas wavelet,  $\Psi_i$ , en la capa oculta y  $b_0$  una entrada de bias.

De la definición 1.12, empezando desde la izquierda, la primer parte de la ecuación corresponde a la salida de un MLP que utiliza wavelets multidimensionales como funciones de activación mientras que el segundo sumatorio corresponde a las conexiones directas de las entradas ponderadas hacia la salida. La multidimensionalidad en las neuronas wavelet puede ser obtenida como el producto de  $P$  wavelets monodimensionales derivadas de una misma wavelet madre de forma que:

$$\Psi_i(x) = \prod_{j=1}^P \psi(a_{ij}) \quad \text{con} \quad a_{ij} = \frac{x - t_{ij}}{s_{ij}} \quad (1.13)$$

donde  $s_{ij}$  corresponde a los coeficientes de escala y  $t_{ij}$  a los de traslación, con  $i=1, \dots, K$ ;  $j=1, \dots, P$ ;  $K, P \in \mathbb{Z}$ .

El modelo es de carácter multivariable, así los valores  $b_0$ ,  $w_j$ ,  $c_j$ ,  $t_{ij}$ ,  $s_{ij}$ , deberán ser ajustados durante el entrenamiento de forma que al culminar la fase de aprendizaje de la red, la salida  $y^n$  consiga mapear un valor de  $\mathfrak{R}^1 \rightarrow \mathfrak{R}^P$ . Este ajuste suele hacerse utilizando el algoritmo de retropropagación del error.

Los detalles de implementación y aplicaciones pueden ser consultados en la bibliografía [176].

Señalar en este punto que esta aproximación resultó útil en la calibración multivariable de señales voltamperométricas solapadas, que se presentan en el presente trabajo de investigación, y que se desarrollan más adelante.

- **Red Neuronal Wavelet Multisalida**

De forma general, las arquitecturas reportadas utilizadas en el área química, hasta hace pocos años, permitían efectuar modelos de calibración de elementos presentes en muestras de manera individual, debido a que la arquitectura de la red utilizada sólo tenía una salida, y por tanto era necesario construir un modelo por cada elemento por cuantificar.

El desarrollo de arquitecturas que promueven el modelado de varias especies presentes en una muestra, pero conservando el desempeño y funcionalidad de las arquitecturas

existentes, representa un importante aporte en los últimos años, para evaluar distintos elementos presentes en una mezcla de manera simultánea.

Como se verá más adelante, en el presente trabajo se desarrollaron nuevos algoritmos para la implementación de WNNs multisalida, en la determinación simultánea de diferentes metales pesados en disolución.

Sin embargo, como ya se visto antes, para modelos de aplicaciones multivariable es necesario el uso de wavelets multidimensionales.

La arquitectura de WNN mostrada en la figura 1.12 corresponde a una arquitectura MLP tipo feedforward con múltiples salidas. La salida  $y^n(m)$  (donde  $n$  es un índice y no una potencia) depende de los pesos  $c_i(m)$  de conexión entre la salida de cada neurona y la salida  $m$ -ésima de la red, los pesos de la conexión  $w_j(m)$  entre los datos de entrada y cada salida y un valor de bias  $b_0(m)$  útil al ajustar funciones que no tenga un valor medio distinto de cero, el  $n$ -ésimo vector de la entrada  $x^n$  y la función wavelet  $\Psi_i$  de cada neurona.

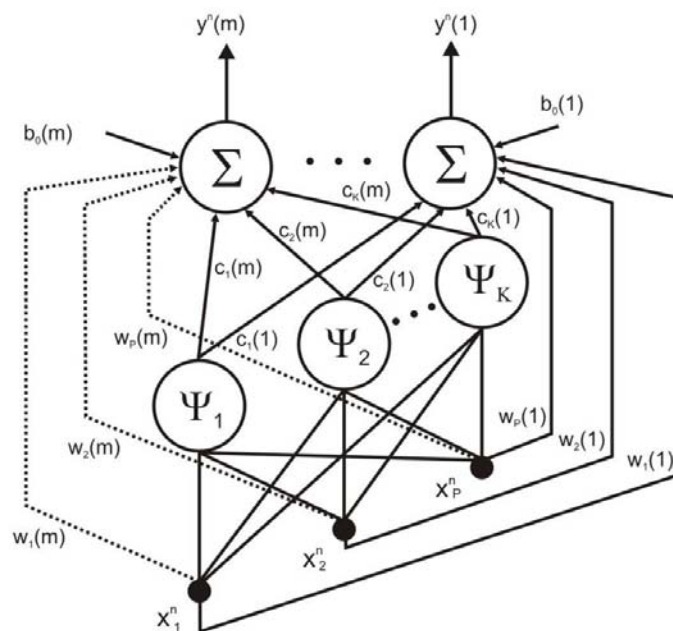


Figura 1.12. Arquitectura de WNN multisalida.



De esta forma, la señal aproximada del modelo se puede representar mediante:

$$y^n(m) = \sum_{i=1}^K c_i(m) \Psi_i(x^n) + b_o(m) + \sum_{j=1}^P w_j(m) x_j^n \quad \{i, j, K, P\} \in Z \quad (1.14)$$

donde los subíndices  $i$  y  $j$  corresponden al  $i$ -ésima neurona de la capa oculta y al  $j$ -ésimo elemento en el vector de entrada  $x^n$ , respectivamente,  $K$  es el número de neuronas wavelets y  $P$  es el número de elementos en el vector de entrada  $x^n$ .

La neurona básica será una wavelet multidimensional  $\Psi_i(x^n)$  que se construye siguiendo la definición de la ecuación 1.13, y cuyos coeficientes de escala  $(s_{ij})$  y traslación  $(t_{ij})$  son los parámetros ajustables de la  $i$ -ésima neurona wavelet. Con este modelo matemático las salidas de la red se convierten en una combinación lineal de varias wavelets multidimensionales [182, 186, 213, 214].

El entrenamiento y ejemplos de implementación de este tipo de redes se encuentran en la bibliografía [215].

## 1.8. Lenguas electrónicas. Análisis cualitativo y cuantitativo

El concepto de Lenguas Electrónicas más aceptado es el propuesto por Holmberg [216], quien la define como: “una matriz de sensores químicos de respuesta no específica y entrecruzada, combinada con una herramienta matemática de reconocimiento y/o cuantificación”.

Así, para interpretar el significado de una lengua electrónica, es necesario abordar dos apartados.

Por un lado, la parte esencial de una lengua electrónica, es la matriz de sensores seleccionados para un determinado problema. La mayoría de las lenguas electrónicas, sin embargo, no han sido desarrolladas con la pretensión de conseguir un sistema de

reconocimiento tan complejo como lo es el sentido del gusto, sino que se encuentran limitadas a proporcionar información analítica restringida de ciertos parámetros establecidos por las necesidades de análisis en áreas concretas y específicas. La elección de la matriz de sensores será consecuencia pues de las características físicas o químicas a medir, y la selectividad analítica de los elementos de reconocimiento de los propios sensores.

Los principales tipos de lenguas electrónicas utilizan normalmente matrices de sensores potentiométricos [139, 144, 217–220] o voltamperométricos [140, 145, 195, 221], aunque también se han descrito variantes empleando sensores de naturaleza impedimétrica [147, 222, 223], gravimétrica [224], óptica [225] y biosensores [150].

La segunda parte la formarían los modelos de clasificación y cuantificación, los cuales son ampliamente utilizados en diversos campos de la ciencia. Su objetivo es o bien clasificar una amplia serie de muestras entre las clases predefinidas, o la estimación de algunos parámetros de una muestra.

El uso más difundido de las lenguas electrónicas, ha sido el de proporcionar información cualitativa, lo que las ha convertido en herramientas de interés, sobre todo para identificar variedades de bebidas y alimentos. El análisis cualitativo con lenguas electrónicas es muy empleado en el mundo de la industria como herramienta útil de control o monitorización. Dentro de las aplicaciones más habituales son en la industria alimentaria (especialmente bebidas), la industria farmacéutica y el control y monitorización ambiental. La tabla 1.2 recopila algunos ejemplos de publicaciones en este campo. Varias de las lenguas electrónicas aquí presentadas han sido desarrolladas en nuestros laboratorios.

Cabe señalar que existen en la actualidad dos lenguas electrónicas comerciales, la lengua electrónica ASTREE (de Alpha MOS, Francia), y la TS-5000Z (de INSENT, Japón), ambas de tipo potenciométrico; lo que ha facilitado la introducción de esta tecnología especialmente para el análisis de control en la industria alimentaria.

**Tabla 1.2.** Aplicación de las lenguas electrónicas al análisis cualitativo.

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Matriz de sensores</b>	<b>Herramienta de Procesamiento</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Aguas residuales</b>	Amperométrica	PCA,PLS,ANN	Monitorización del proceso de depuración de aguas	[195]
<b>Vinos</b>	Amperométrica	PCA+ANN	Clasificación de vinos por variedad	[226]
<b>Cavas</b>	Amperométrica	PLS, ANN	Análisis de fenoles	[152]
<b>Cavas</b>	Amperométrica	PCA WT+ANN	Clasificación de cavas	[227]
<b>Leches</b>	Amperométrica	PCA	Control de proceso industrial	[192]
<b>Aguas minerales, bebidas de naranja y té</b>	Potenciométrica	PCA	Clasificación de bebidas	[139]
<b>Cervezas</b>	Potenciométrica	PCA, LDA	Clasificación de cervezas	[141]
<b>Cervezas</b>	Potenciométrica Amperométrica	WT, LDA	Clasificación de cervezas	[143]
<b>Cervezas</b>	Amperométrica	FFT, PCA PLS-DA,LDA	Clasificación de cervezas	[228]
<b>Cafés</b>	Amperométrica	LDA, SVM	Clasificación de cafés	[229]
<b>Miel</b>	Potenciométrica Amperométrica	PCA, DFA PCR, PLSR, LS-SVM	Clasificación de la miel	[230]
<b>Manzanas</b>	Potenciométrica Amperométrica	PLS-DA	Análisis parámetros organolépticos	[231]

La segunda aplicación de lenguas electrónicas es la cuantificación simultánea de parámetros, generalmente de concentraciones de diferentes especies, para un conjunto de muestras. Es común, que en este tipo de aplicaciones, la carencia de la selectividad en los sensores produzca respuestas entrecruzadas que contiene información referente al conjunto de especies, y que debido a la complejidad de las señales recolectadas de la matriz multisensorial, posean características no lineales, establecidas por las relaciones desconocidas entre los analitos y la propia respuesta de los sensores. En la tabla 1.3, se mencionan algunos trabajos relacionados con el análisis cuantitativo. De nuevo cabe

indicar que varias de las lenguas electrónicas aquí presentadas han sido desarrolladas en nuestros laboratorios.

**Tabla 1.3.** Aplicación de las lenguas electrónicas al análisis cuantitativo.

Tipo de Muestra	Matriz de sensores	Herramienta de Procesamiento	Objetivo	Referencia
<b>Aguas contaminadas</b>	Potenciométrica	PCA+PLS, ANN+SOFM	Análisis multicomponente	[196]
<b>Aguas residuales</b>	Potenciométrica	ANN	Monitorización ambiental	[144]
<b>Aguas superficiales</b>	Potenciométrica	ANN	Monitorización ambiental	[198]
<b>Suelo</b>	Potenciométrica	ANN	Determinación de metales pesados	[151]
<b>Fertilizantes</b>	Potenciométrica	ANN	Determinación de iones K y NH <sub>4</sub>	[220]
<b>Fertilizantes</b>	Impedimétrica	ANN	Determinación de iones salinos	[147]
<b>Fenoles</b>	Amperométrica	ANN	Determinación de fenoles	[145]
<b>Aguas dulces</b>	Potenciométrica	ANN	Determinación de iones alcalinos y metales pesados	[138]
<b>Ácidos ascórbico y úrico, paracetamol</b>	Amperométrica	ANN	Determinación de compuestos clínicos	[140]
<b>Vinos</b>	Amperométrica	FFT+ANN	Determinación de polifenoles	[142]
<b>Vinos</b>	Amperométrica	WT+PLS WT+ANN	Determinación polifenoles totales	[146]
<b>Manzanas</b>	Potenciométrica Amperométrica	PLS-DA	Análisis de parámetros organolépticos	[231]
<b>Perejil, tomate, pepino</b>	Espectrofotométrica	OPA, WT	Determinación de metales pesados	[149]
<b>Orina</b>	Potenciométrica	PLS, ANN	Determinación de iones alcalinos y urea	[150]



## Capítulo II.

---

### 2. Objetivos

Los objetivos principales de esta tesis doctoral son:

- ✓ Construcción y caracterización de sensores amperométricos basados en composites para la determinación de aminoácidos oxidables y de metales pesados en solución.
- ✓ Modelización de respuestas amperométricas mediante redes neuronales artificiales y redes Wavelet, con el fin de cuantificar simultáneamente diversos analitos en muestras complejas, tanto en el caso de muestras que contienen aminoácidos oxidables, como en el caso de metales pesados.
- ✓ Evaluación de la funcionalidad de las técnicas desarrolladas a lo largo del proyecto.

Estos dos objetivos troncales se han desarrollado en el entorno de aplicación a dos tipos de analitos distintos: aminoácidos oxidables en piensos animales (dentro del ámbito alimentario) y metales pesados (dentro del ámbito medioambiental).

Como objetivos específicos se señalan:

- Estudio analítico y caracterización de los materiales composites y utilización de estos como electrodos de trabajo en técnicas voltamperométricas de análisis, aplicadas al análisis de aminoácidos oxidables y metales pesados.
- Selección de la mejor combinación técnica amperométrica – electrodo de trabajo, en términos de calidad de respuesta analítica, para la determinación de los aminoácidos cisteína, tirosina y triptófano; en muestras que contienen diferentes concentraciones de cada uno.
- Determinación amperométrica de los aminoácidos cisteína, tirosina y triptófano en muestras complejas sintéticas y reales, y posterior procesamiento de las señales obtenidas mediante quimiometría multivariable.
- Modelado de los conjuntos de datos voltamperométricos de muestras sintéticas y reales, de diferentes concentraciones de los tres aminoácidos, mediante Redes Neuronales Artificiales.
- Aplicación de la transformada Wavelet para la compresión de datos y extracción de información significativa previa a la modelización mediante Redes Neuronales Artificiales.
- Determinación de metales pesados (plomo, cobre y cadmio) en mezclas complejas que contienen diferentes concentraciones de cada uno de ellos, mediante voltamperometría de redisolución anódica; utilizando como electrodo de trabajo el sensor composite grafito-epoxi.
- Determinación de los mismos metales pesados en una matriz compleja que contiene indio y talio como interferentes, mediante una Red Neuronal Wavelet.

## Capítulo III.

---

### 3. Experimental

#### 3.1. Equipos y software

El equipo utilizado para la adquisición de los voltamperogramas obtenidos en el estudio de aminoácidos consistió en un potenciostato Autolab PGSTAT 20 System (Eco-Chemie, The Netherlands), conectado a un PC que procesa la señal a través del software GPES suministrado por la misma empresa.

El tratamiento de los datos voltamperométricos se llevó a cabo mediante Windows MATLAB versiones 6.0, 6.1 y 7.0 (MathWorks, Natick, MA), utilizando sus Toolbox para procesamiento PLS, WT+ANN, y WNN; respectivamente.

La celda de medida estaba compuesta por un electrodo de referencia de doble unión Ag/AgCl (Orion 900200), la solución de referencia interna se suministrada por la misma firma (solución de AgCl "Double Junction Reference Electrode Inner Filling Solution") y como solución externa se utilizó en cada grupo de experimentos la misma solución tampón (electrolito soporte) con que éstos se llevaron a cabo. Como electrodo auxiliar se utilizó un electrodo de platino (Crison 52-67 1). Y como electrodos de trabajo se utilizaron en algunos experimentos un electrodo de platino idéntico al de referencia, y en el resto

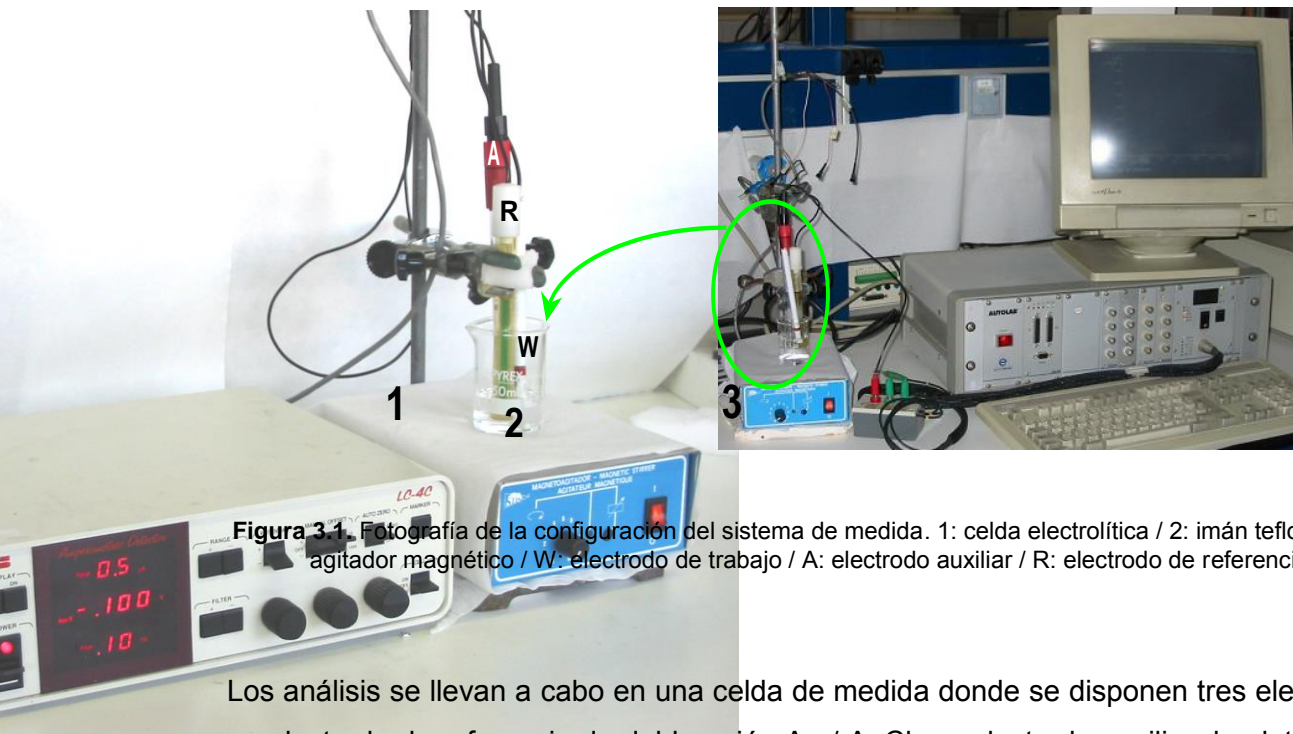


sensores composite fabricados internamente en el laboratorio, mediante el protocolo que se explica más adelante en este texto.

Algunos experimentos requirieron de equipamiento adicional, cuya descripción se llevará a cabo en el apartado correspondiente.

### 3.2. Configuración del sistema de medida

Se muestra en la siguiente imagen (Figura 3.1.) la configuración del sistema de medida utilizado para llevar a cabo los experimentos relacionados en esta tesis doctoral.



**Figura 3.1.** Fotografía de la configuración del sistema de medida. 1: celda electrolítica / 2: imán teflonado / 3: agitador magnético / W: electrodo de trabajo / A: electrodo auxiliar / R: electrodo de referencia.

Los análisis se llevan a cabo en una celda de medida donde se disponen tres electrodos: un electrodo de referencia de doble unión Ag / AgCl, un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de trabajo.

En el caso de la determinación de aminoácidos, el electrodo de trabajo es idéntico al electrodo auxiliar de platino. Y en el caso de la determinación de metales pesados, éste será el sensor composite construido.

La celda de medición contiene 25 ml de solución electrolito soporte, a la que se adicionan alícuotas del componente a determinar.

### **3.3. Construcción del electrodo de trabajo**

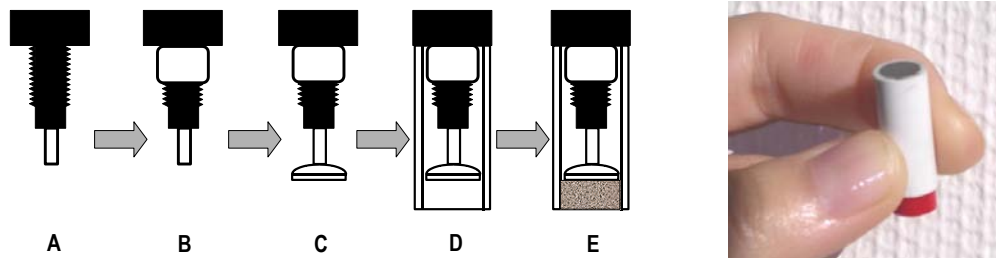
Dadas las ventajas que presentan los transductores integrados basados en composites rígidos, como se ha comentado anteriormente y como se detallará en los capítulos de resultados, la mayor parte de este trabajo parte del interés en utilizar este tipo de materiales como electrodos de trabajo en sistemas redox.

Se detalla a continuación la metodología de construcción de estos electrodos basado en un material compuesto de tipo grafito-epoxi, en nuestros laboratorios.

#### **Construcción del cuerpo del transductor**

Para la construcción del cuerpo del transductor se utiliza un conector eléctrico convencional hembra de 2 mm de diámetro. En su extremo se suelda con estaño una lámina de cobre circular de 5 mm de diámetro, de la que se elimina previamente, mediante un lavado instantáneo con una disolución diluida de  $\text{HNO}_3$ , la capa de óxido que pueda contener. Esta capa de óxido, en el caso de no eliminarse, podría aumentar la resistencia al paso de corriente, y por tanto disminuir la sensibilidad del transductor. La conexión obtenida se introduce en un tubo cilíndrico de PVC de 6 mm de diámetro interno, de 8 mm de diámetro externo y de 18 mm de longitud. La rosca metálica que posee la conexión permite que esta última quede bien fijada a un extremo del tubo de PVC, mientras que en el otro extremo queda una cavidad virtual de 3 mm de profundidad.

En el interior de esta cavidad se introduce posteriormente el composite preparado antes de curar, tal y como se puede observar en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Etapas de la construcción del cuerpo del transductor. En el conector hembra de 2 mm de diámetro (A), se le coloca una rosca metálica (B). Después, se suelda una lámina de cobre circular (C). Posteriormente, se coloca el tubo de PVC (D). En la cavidad virtual se introduce el composite preparado (E). Se muestra una fotografía del sensor una vez se ha pulido la superficie.

### **Preparación y curado del composite. Incorporación al cuerpo del transductor**

El material composite grafito-epoxi se prepara mezclando, en un primer paso, la base de resina y el endurecedor en una proporción 20:3 (p/p). Posteriormente, y después de homogeneizar correctamente la mezcla anterior, se añade el grafito en polvo en una proporción resina:grafito de 4:1 (p/p), es decir, un contenido del 20% en material conductor [81]. Se procede, en este punto, a una perfecta homogeneización manual de la mezcla resultante. Esta perfecta homogeneización es importante, dado que la reproducibilidad de los análisis depende en gran medida de este parámetro. Al finalizar este proceso, la pasta de grafito-epoxi se aplica llenando la cavidad del cuerpo del sensor, y se compacta sobre la placa de cobre, dejando sobresalir parte del material composite para asegurar un máximo aprovechamiento del espacio de la cavidad.

Los electrodos, una vez contruidos, son introducidos en una estufa a una temperatura aproximada de 40°C durante 7 días, a fin de asegurar un curado apropiado y completo del composite. Una vez curados, son retirados de la estufa y se elimina el material sobrante mediante un lijado con un simple papel de lija de grano grueso hasta obtener

una superficie aproximadamente plana. Previo a cada uso, la superficie del sensor se renueva según se indica a continuación.

### **Renovación de la superficie de trabajo**

Parte del procedimiento experimental consiste en la evaluación de la reproducibilidad de la superficie del transductor después de someterla a procedimientos de pulido, con el objetivo de regenerar la superficie para usos posteriores.

La renovación de la superficie consiste en un procedimiento de pulido mediante el uso sucesivo de papeles abrasivo de mayor a menor grano, de manera que progresivamente se vaya obteniendo una superficie más fina. El último papel utilizado es el de alúmina de 3  $\mu\text{m}$ , mediante el cual se llega a obtener una superficie especular.

Resulta de extrema importancia llevar a cabo un pulido exhaustivo cuando se pretende realizar experimentos sucesivos comparables, a fin de que la superficie del transductor pueda considerarse reproducible.

### **3.4. Determinación de amino ácidos oxidables**

Como se ha señalado con anterioridad uno de los hitos del presente trabajo de investigación ha sido el desarrollo de una metodología simple, ágil y económica, para la determinación de aminoácidos oxidables en matrices complejas.

La primera fase de este procedimiento consistió en ensayar diferentes combinaciones de técnica voltamperométrica y el electrodo de trabajo, con el fin de determinar la mejor estrategia para el desarrollo del método de análisis más adecuado. Una vez resuelto este punto, se estudian algunas propiedades del sistema que permiten conocer el tipo de información que ofrece el experimento, y que posteriormente va a ser procesada y modelada con la finalidad de obtener resultados óptimos.

Se seleccionó la técnica DPV con un electrodo de trabajo Pt para llevar a cabo las mediciones. A pesar de la falta de selectividad completa, la resolución y la cuantificación de mezclas de aminoácidos oxidables, antes de acudir a métodos quimiométricos multivariantes, se basan en las diferencias existentes entre los voltamperogramas. Durante el estudio se han encontrado algunas dificultades adicionales en la aplicación de métodos de calibración multivariante debido a la fuerte señal de superposición y la falta de bilinealidad y aditividad de datos.

La identificación de la mejor combinación técnica-eléctrodo de trabajo, así como la caracterización del sistema de medida, fueron motivo de la realización de un proyecto de máster previo a este trabajo de tesis doctoral, por lo que no se desarrollara extensamente en este trabajo, sino que únicamente se expondrán los resultados numéricos obtenidos.

El estudio de la información se llevó a cabo en dos etapas, la primera de ellas fue utilizando métodos quimiométricos clásicos multivariantes. En este sentido se evaluaron las capacidades de predicción de los distintos métodos de calibración, tales como PLS y PLS no lineales para las mezclas sintéticas y para muestras de alimento. La segunda etapa consistió en el análisis de los mismos conjuntos de datos mediante redes neuronales artificiales. Los resultados obtenidos para ambos casos se exponen en los siguientes apartados.

### **3.4.1 Reactivos y soluciones**

Todos los reactivos utilizados en la experimentación son de calidad analítica. Las soluciones de las muestras se prepararon usando agua bidestilada Mili-Q (Millipore). La solución de soporte de electrolito estaba formada por cloruro de potasio 0,1M y monohidrogenofosfato de potasio 0,1M. El pH de esta solución se ajustó a 7,5 con un 37% (w/w) de ácido clorhídrico. La mezclas sintéticas para una evaluación preliminar del método voltamperométrico se prepararon a partir de soluciones madre 0,1M de cada aminoácido.

### 3.4.2 Preparación de las muestras. Muestras sintéticas y reales

Tanto para la preparación de la serie de muestras sintéticas, como para la serie de muestras alimentarias, a fin de cubrir un amplio rango de concentraciones similares para los tres aminoácidos en muestras ternarias de distinta proporción pero de forma homogénea, se prepararon tres series de soluciones sintéticas para el análisis Cys, Trp y Tyr. Para cada analito se consideraron los seis niveles de concentración siguientes:  $5 \times 10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ ;  $2 \times 10^{-4}$ ;  $2,5 \times 10^{-4}$ ;  $3 \times 10^{-4}$  y  $3,5 \times 10^{-4}$  M para la Cys y Tyr; y  $2 \times 10^{-5}$ ;  $6 \times 10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ ;  $1,4 \times 10^{-4}$ ;  $1,7 \times 10^{-4}$  y  $2,1 \times 10^{-4}$  M para el Trp. Cada interferencia fue estudiada en dos niveles:  $10^{-4}$  y  $2,5 \times 10^{-4}$  M para la Cys y Tyr; y  $6 \times 10^{-5}$  y  $1,4 \times 10^{-4}$  M para el Trp. Como resultado, se disponía de una serie de 24 soluciones mezcla para el estudio de cada analito, y un conjunto total de 72 voltamperogramas.

A fin de conocer el contenido en aminoácidos de las muestras alimentarias, piensos animales, se llevó a cabo una determinación mediante un método estándar basado en la cromatografía de intercambio catiónico líquido con derivatización con ninhidrina post-columna. La cuantificación de los aminoácidos en las muestras alimentarias era necesaria para el establecimiento de modelos de calibración y evaluación de los errores de predicción, en el procesamiento multivariable.

Los aminoácidos libres oxidables (no-proteicos) presentes en las muestras de pienso se recuperaron de acuerdo al siguiente procedimiento de lixiviación: 5g de muestra de alimento se trataron con 50ml de solución 0,1M de HCl durante 30min en un matraz cónico con agitación magnética. La solución del extracto resultante se filtró a continuación a través de una membrana de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y se refrigeró una vez aislada.

### 3.5. Determinación de metales pesados

El segundo bloque de esta tesis doctoral está focalizado en a la aplicación de análisis multivariable avanzado en la cuantificación de metales pesados en solución acuosa.

La manera de proceder fue similar a la del caso de los aminoácidos, tratado en el capítulo anterior. Se llevó a cabo una primera aproximación a las características de la muestra y del sistema de análisis, y posteriormente se realizó un análisis multivariable mediante una WNN.

La caracterización del sistema de medida, a su vez, consistió en la evaluación de diferentes factores que afectarían al tipo de resultados obtenidos y a su calidad.

Así pues, en un primer momento se llevó a cabo un estudio de la superficie del electrodo de trabajo utilizado a fin de entender sus propiedades físicas; y se establecieron dos procedimientos de medida amperométrica que permitían estudiar el efecto del pH de la solución analizada y el efecto del tiempo en la etapa de preconcentración de la técnica de stripping en la cuantificación de los analitos, y en el resultado experimental en general. Seguidamente se realizaron una serie de medidas de muestras de calibración, a unas condiciones ya prefijadas, y se interpretaron químicamente los resultados obtenidos de las curvas voltamperométricas.

Aunque la sensibilidad de la técnica utilizada (voltamperometría de redisolución anódica, DPASV) es elevada pues permite obtener señales a concentraciones de partes por millón, la selectividad del electrodo es pobre debido a que cada uno de los componentes metálicos analizados así como las especies intermetálicas formadas contribuyen a la corriente medida [232].

En los próximos apartados se explica con más detalle el procedimiento seguido y los resultados obtenidos.

### 3.5.1. Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados en la experimentación fueron de calidad analítica. Las soluciones soporte se prepararon a partir de ácido clorhídrico 37%, y ácido acético 96% y acetato de sodio; en cada caso.

La preparación de las soluciones consistió en la adición de alícuotas de soluciones patrón de metales preparadas a diferentes concentraciones, a partir de reactivos comerciales. En todos los casos las muestras se prepararon usando agua bidestilada Mili-Q (Millipore).

Para la preparación del composite se utilizó polvo de grafito de tamaño de partícula de 50  $\mu\text{m}$  (BDH, Reino Unido), Epotek H77 (resina epoxi) y endurecedor (ambos de Epoxy Technology, EE.UU.). La fabricación de los electrodos utilizados en este capítulo está descrita anteriormente en este documento (§ 3.3.).

### 3.5.2. Preparación de las muestras

A fin de llevar a cabo el estudio multivariante de la señal ASV, para la segunda parte del estudio de metales pesados, se llevó a cabo la preparación de un conjunto de muestras, tal y como se indica a continuación.

Se prepararon soluciones de plomo, cobre, cadmio, indio y talio, a partir de reactivos químicos de grado analítico, en solución tampón de acetato (0,1 M, pH 3,76). A partir de éstas, se prepararon 27 muestras, además de un blanco (solución electrolito soporte), de acuerdo con un diseño factorial fraccional (FFD) con tres niveles de concentración y cinco factores (los cinco metales considerados,  $3^{5-2}$ ), en un intervalo de concentración de 0.4 - 20 ppm. Las concentraciones en cada muestra fueron seleccionadas con el fin de generar un modelo espacial simplificado en ausencia de tendencias y derivas, que asegure que el aprendizaje de la WNN no esté condicionado por la medición previa de otras muestras. Un conjunto adicional de muestras, formado por 10 soluciones sintéticas preparadas de la

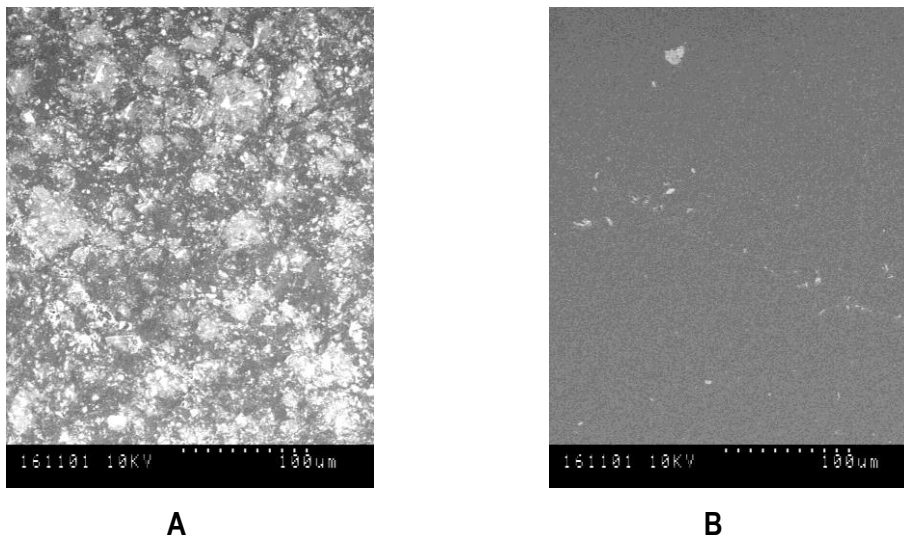


misma manera pero con concentraciones generadas aleatoriamente dentro del modelo espacial, se utilizó para evaluar las prestaciones del modelo de respuesta.

Todas las mediciones se efectuaron en presencia de oxígeno y en ninguna de ellas se renovó la superficie del electrodo previo una nueva medición.

### 3.5.3. Características del electrodo de trabajo

A fin de comparar los resultados obtenidos con los que se obtienen por superficies de electrodos típicamente utilizados en el uso de las técnicas voltamperométricas de redisolución, se llevó a cabo un estudio microscópico de la superficie del composite grafito-epoxi y de la superficie de un electrodo clásico de carbono vitrificado. La técnica empleada fue la Microscopía de Barrido Electrónico (SEM). La Figura 3.3 muestra la imagen microscópica obtenida a un voltaje de 10 KV y a una resolución de 100  $\mu\text{m}$ . A efectos únicamente comparativos se incluye la imagen obtenida en las mismas condiciones, para la superficie de un electrodo de carbono vitrificado.



**Figura 3.3.** (A) Imagen microscópica del electrodo grafito-epoxi y (B) imagen microscópica del electrodo de carbono vitrificado, después de haber pulido la superficie de ambos electrodos. Voltaje de aceleración: 10 KV. Resolución: 100 $\mu\text{m}$ .

Al contrario de la imagen obtenida para el electrodo de carbono vitrificado, la imagen resultante para el sensor grafito-epoxi, presenta una serie de clústeres de material agregado situado aleatoriamente a lo largo de la zona rastreada por la microscopía. Este hecho es debido a la naturaleza del propio composite, formado por partículas de grafito (de un tamaño medio  $<50\mu\text{m}$ ) distribuidas y orientadas al azar dentro de la matriz de resina epoxi. Por este motivo, la morfología de la superficie del electrodo grafito-epoxi tiene una apariencia rugosa.

La presencia de los clústeres en la superficie del electrodo grafito-epoxi se traduce en un incremento de área de superficie activa. Una de las principales características de los sensores grafito-epoxi, que los hace útiles para la utilización en las técnicas voltamperométricas diferenciales de impulsos, es precisamente esta gran zona superficial activada.

Tal y como se explica anteriormente en este texto (§ 1.3.1), esta distribución de las partículas en el seno de la resina epoxi, se podría asimilar a un macroelectrodo formado por una gran cantidad de microdiscos de carbono o de microfibras. Estos microelectrodos se encuentran separados por material aislante y están conectados en paralelo. La señal obtenida será la suma de las corrientes faradáicas individuales generadas por cada microelectrodo individual. El producto final es un sensor de sensibilidad comparable a la de un macroelectrodo pero que presenta una relación señal/ruido propia de un microelectrodo [79, 233]. Esta aleatoriedad en la aglutinación del material composite impide la modelización teórica basada en la distribución homogénea de discos de formas regulares que podrían describir adecuadamente el comportamiento observado. Por lo tanto, el comportamiento voltamperométrico de estos compuestos sólo puede ser optimizado si las regiones electroquímicamente activas son localizadas y si se conoce la relación estructura-reactividad. En este sentido y dentro nuestro grupo de investigación fueron llevados a cabo estudios a fin de determinar la distribución física de las partículas de grafito en la matriz polimérica y la electroactividad de estas zonas [34, 79, 85, 234-238].

#### **3.5.4. Protocolos de medida**

Tal y como se ha indicado al inicio de este capítulo, en la determinación de metales se seleccionaron dos procedimientos experimentales distintos a fin de obtener información respecto del sistema de medida.

Para ambos casos se utilizó la técnica DPASV. La diferencia fundamental entre los dos protocolos estudiados, era el pH del medio, tampón acético/ acetato 0,1M (pH 3,76) en un caso, y HCl 0,1 M en el otro.

Se ajustaron otros parámetros propios de la señal del potencióstato, que ayudaban a obtener una señal más nítida, pero que no eran significativos a efectos de caracterizar el sistema de medida. En ambos casos la etapa de preconcentración se llevó a cabo con agitación constante de la solución.

A fin de obtener las curvas de calibración que se comentarán en el próximo apartado, se añade una cantidad conocida de solución patrón en la celda de medida, y las etapas de pre-concentración y de redisolución anódica son llevadas a cabo manteniendo el sistema electroquímico invariante.

## Capítulo IV.

---

### 4. Resultados y discusión

Se presentan en este capítulo los resultados obtenidos del trabajo de investigación de esta tesis doctoral.

Por un lado se establecen los resultados referentes a la determinación de aminoácidos oxidables, y por otro lo relacionado con la determinación de metales pesados, en el marco de esta tesis doctoral.

Al final de este documento se anexan los artículos que resultaron del presente trabajo, y que forman parte del mismo.

En concreto, se presentan las siguientes publicaciones:

- Artículo 1.** L. Moreno-Baron, A. Merkoçi, S. Alegret, Graphite-epoxy composite as an alternative material to design mercury free working electrodes for stripping voltammetry, *Electrochimica Acta* 48 (2003) 2599-2605.
- Artículo 2.** L. Moreno, A. Merkoçi, S. Alegret, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, Analysis of amino acids in complex samples by using voltammetry and multivariate calibration methods, *Analytica Chimica Acta* 507 (2004) 247–253.

- Artículo 3.** L. Moreno-Barón, R. Cartas, A. Merkoçi, S. Alegret, M. del Valle, L. Leija, P.R. Hernández, R. Muñoz, Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic tongue, *Sensors and Actuators B* 113 (2006) 487–499.
- Artículo 4.** J. M. Gutiérrez, L. Moreno-Barón, F. Céspedes, R. Muñoz, M. del Valle, Resolution of heavy metal mixtures from highly overlapped ASV voltammograms employing a wavelet neural network, *Electroanalysis* 21 (2009) 445–451.

## 4.1. Determinación de aminoácidos oxidables

Tal y como se avanzaba en apartados anteriores, el trabajo realizado en este capítulo fue abordado en tres etapas, la primera de las cuáles consistió en la determinación del sistema de trabajo técnica-electrodo de trabajo óptimo, y su caracterización. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de la información obtenida mediante PLS lineal y no lineal, por un lado, y mediante el procesamiento de una red neuronal, por otro.

### 4.1.1 Caracterización del sistema de medida

En la primera etapa del experimento se consideraron las técnicas de voltamperometría cíclica y voltamperometría de impulsos diferenciales. Como electrodos de trabajo se probaron algunos materiales composites y composites modificados en superficie. Asimismo se consideró evaluar el Pt puro como potencial electrodo de trabajo. Para este propósito, algunas características analíticas tales como la reproducibilidad, sensibilidad y selectividad se evaluaron preliminarmente. Los análisis preliminares se llevaron a cabo para una muestra de concentración de  $10^{-4}$  M de los tres analitos, y en un rango de potencial de entre 0,4 y 1,0 V. Seguidamente se caracterizó el sistema de medida mediante la evaluación de los parámetros de linealidad, bilineabilidad y aditividad.

En los análisis de muestras que contenían los tres analitos, se observó una fuerte superposición de los voltamperogramas debido a que los tres aminoácidos se oxidan en el mismo rango de potenciales. Así pues la primera característica que se estudió fue la selectividad de la señal. La selectividad de la respuesta es una propiedad fundamental del método analítico con el fin de evitar interferencias. Precisamente la escasa selectividad de la señal hizo necesario el procesamiento quimiométrico multivariable de la información.

Se calculó la correlación entre voltamperogramas como una medida de disimilitud de las formas de la señal, por tanto como medida de selectividad o capacidad de discriminar los analitos, para cada combinación técnica-electrodo. Valores de correlación elevados indican voltamperogramas fuertemente solapados.

La sensibilidad de las mediciones se estimó a partir de la intensidad de corriente del pico voltamétrico de patrones puros de cada analito.

Los valores concretos de selectividad, sensibilidad y reproducibilidad; pueden encontrarse detallados en la correspondiente publicación científica (Anexo I de este trabajo).

El uso de un electrodo de polipirrol (composite modificado superficialmente), proporcionaba resultados de elevada sensibilidad; sin embargo fue una opción desestimada por dos motivos esenciales: la imposibilidad de reproducir la superficie de trabajo en mediciones sucesivas, y el carácter ambientalmente tóxico del propio material. Las diferentes combinaciones dieron como óptima la combinación DPV-Pt. Y fue con ésta con la que se caracterizó más a fondo el sistema de medida, a través del estudio de linealidad, bilinealidad, y aditividad, de la señal.

En este punto el lector puede apuntar como antagónico el hecho de presentar como ventajosa la fácil renovación de la superficie del transductor composite, mediante un simple pulido, cuando sin embargo en este capítulo de la tesis se muestra como elección el uso de un electrodo de trabajo Pt en lugar del composite. En este caso, y a diferencia

de lo que ocurre en muchos otros experimentales, entre los que se incluye el análisis de metales pesados de esta tesis, ni la meticulosa regeneración de la superficie del transductor composite, ni los procedimientos de pulido contribuyeron a la mejora de la precisión de la medida. Por el contrario, la reproducibilidad de los datos mejoraba significativamente con el uso del electrodo de Pt.

Del estudio de linealidad se desprende que en el rango de concentraciones más bajas, dentro de las estudiadas, y del orden de entre  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M las respuestas muestran una relación lineal, con coeficientes de correlación  $>0,99$ .

El estudio de bilinealidad, o variación de la forma de voltamperograma en función de la concentración de aminoácido, se llevó a cabo como medida de correlación entre señales. Se observó que para las disoluciones de Trp de concentración inferior a  $8 \times 10^{-6}$  M todos los voltamperogramas tenían la misma forma, y por tanto los datos eran bilineales. Ligeras variaciones de la forma se detectaron en el rango de  $10^{-5}$  y  $7 \times 10^{-5}$  M, mientras que se observaban unos cambios más relevantes para las concentraciones entre  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M, tratándose por tanto, de datos fuertemente no bilineales. Resultados similares se obtuvieron para la Cys y Tyr. Como posible explicación, se podría decir que la pérdida de bilinealidad así como la variación en las formas de los voltamperogramas son debidas a efectos dinámicos en las proximidades de la superficie del electrodo de trabajo (disminución de la cantidad de analito en la superficie del electrodo). Las variaciones en la forma de la señal hacen más difícil el establecimiento de modelos cuantitativos, de forma que en principio, se espera que la determinación del analito sea más difícil fuera del rango bilineal.

La aditividad de las respuestas DPV con el electrodo de Pt fue analizada a partir del estudio de varias mezclas de dos y tres componentes de aminoácidos. La respuesta experimental para cada mezcla se comparó con la estimada a partir de las señales de patrones puros matemáticamente reproducidos a partir de la suma de las respuestas de cada componente individual de la mezcla. Numéricamente, la falta de ajuste se expresa como error relativo en porcentaje.

La falta de concordancia entre los datos experimentales y estimados se hizo evidente, con resultados incluso mayores de 20-40% para algunos casos.

La falta de aditividad de algunas señales voltamperométricas, que también ha sido citada por otros autores en la bibliografía [15], puede atribuirse a la competencia de los analitos por los centros activos de oxidación en la superficie del electrodo. Este fenómeno, que seguramente es despreciable a bajas concentraciones, es especialmente notable cuando los analitos sobrepasan niveles de concentración de  $10^{-4}$ M. Como consecuencia, la cuantificación de los analitos por métodos clásicos monovariantes, resulta difícil ya que su sensibilidad depende de la concentración de los otros componentes electroactivos en la muestra.

#### **4.1.2 Análisis multivariable**

A continuación se describen los resultados obtenidos para, en primera instancia una aproximación quimiométrica clásica para el análisis multivariable de muestras complejas. Y en segundo lugar, un modelado de los datos mediante una red neuronal artificial.

En ambos casos se lleva a cabo en análisis en dos etapas, la primera utilizando muestras sintéticas de laboratorio, y una segunda etapa, para la que se evalúa la capacidad de los modelos para predecir el resultado de muestras reales, y por tanto, para el que se utilizan muestras hidrolizadas provenientes de piensos animales.

##### **4.1.2.1 Análisis quimiométrico clásico. Metodología PLS lineal y polinómico**

La cuantificación de Cys, Tyr, y Trp en series de mezclas sintéticas se centró en evaluar el rendimiento de los algoritmos PLS para modelar la información cuantitativa contenida en los datos voltamperométricos. Además de los tres componentes electroactivos, la caracterización del sistema de medida preliminar, mostró otras fuentes de variabilidad en la información. Entre ellos, las contribuciones de fondo, las variaciones en las formas de



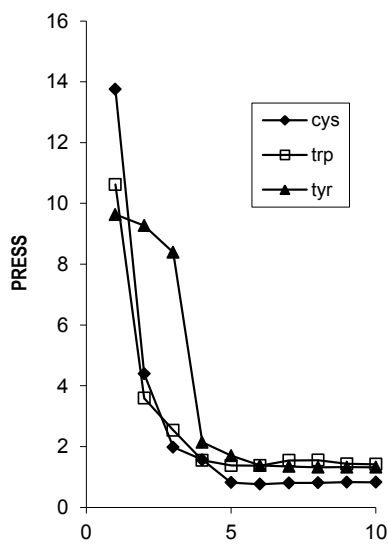
los voltamogramas como una función de concentraciones de analito, interacciones entre los componentes y la escasa aditividad de las respuestas. El efecto de estas es mayor cuanto mayor es la concentración de los analitos en las muestras.

En este caso se escogió el método PLS1 a fin de valorar de entrada la calibración multivariante para cuantificar los aminoácidos en las soluciones complejas. Esta primera aproximación se llevó a cabo estudiando las muestras sintéticas. La estimación del número de factores que se utilizan para la construcción de modelos de calibración se basó en una validación cruzada del conjunto de datos.

A modo de ejemplo de aplicación, la Figura 4.1 muestra la elección del número de factores a considerar mediante la identificación del valor mínimo en la representación de la función PRESS (Prediction Error of the Sum of Squares) frente al número de factores, para los tres analitos.

Se escogieron cinco componentes para el modelado de la Cys y el Trp, y seis para la Tyr. El número óptimo de factores resultó ser mayor que el número de componentes químicos presentes en la muestra, debido precisamente, a que existen otras fuentes de variabilidad además de las tres especies electroactivas. El establecimiento de modelos multivariados eficientes cuando se trata de desviaciones dependientes de la concentración en la linealidad de la respuesta es complejo, y por tanto, para que el modelado proporcione resultados satisfactorios, es necesario trabajar no un mayor número de factores de los tres que corresponderían a la concentración de los tres aminoácidos.

Los errores globales de predicción calculados fueron 6,2; 6,3; y 15,2% para Cys, Trp y Tyr, respectivamente. Estos datos hicieron concluir que el análisis quimiométrico de los voltamogramas, de entrada era apropiado para la cuantificación de los aminoácidos oxidables en la serie de muestras sintéticas.



**Figura. 4.1.** Estimación del número óptimo de los componentes del modelo PLS mediante validación cruzada.

Una vez que la técnica de DPV se ensayó en muestras sintéticas, el siguiente paso fue el análisis de aminoácidos oxidables libres presentes en los extractos de alimentación. Mediante cromatografía de líquidos se obtuvieron las cantidades de aminoácidos oxidables en las muestras, que oscilaron entre 0,002 y 0,03% (w/w). Para llevar a cabo las mediciones voltamperométricas, 5ml de solución de extracto alimentario se añadían a 10ml de solución de soporte de electrolito. Por lo tanto, la concentración resultante de analitos en el recipiente de medida se encontraba en el intervalo de  $4 \times 10^{-5}$  -  $4 \times 10^{-4}$ M. La matriz química de las muestras de pienso era una fuente adicional de varianza que afectaba a la sensibilidad y selectividad de las mediciones, ya que contenía cantidades variables de otros aminoácidos, pequeños péptidos, azúcares, otros componentes orgánicos en los extractos acuosos. Además de otros compuestos electroactivos comúnmente presente en este tipo de extracto alimentario (por ejemplo, aditivos alimentarios tales como antioxidantes), que podrían interferir con las mediciones. En este caso, el problema quimiométrico es mucho más complejo que en el caso de las muestras sintéticas, ya que aspectos adicionales como los componentes de la matriz y las interferencias desconocidos necesitan ser modelada.

Los métodos de calibración multivariante, tales como PLS pueden utilizarse para modelar la matriz química y las contribuciones interferentes. Para este propósito, las muestras patrón deben contener las mismas fuentes de variación que la muestra desconocida. Es por esta razón que parte de los extractos alimentarios se utilizaron como estándares para el establecimiento del modelo de calibración.

La estrategia experimental fue el siguiente: el conjunto de las 24 muestras acuosas de extracto alimentario disponibles para los estudios de calibración multivariante, se dividieron en dos subconjuntos, uno de calibración y otro de prueba. Se tomaron como estándares varias muestras con contenidos bajos, intermedios y altos de analito, a fin de cubrir la variabilidad de la composición de la serie. La asignación de cada extracto a cualquiera de los subconjuntos, de calibración o de predicción, se basó en su distribución en el primer y segundo componente principal. Así, 16 muestras fueron elegidas como patrones (conjunto de calibración), mientras que 8 muestras fueron consideradas como conjunto de prueba.

En este caso se utilizó el método PLS2 para una cuantificación simultánea simple de las tres analitos. El número óptimo de componentes para el modelo de calibración de nuevo se calculó mediante validación cruzada, dando un valor óptimo de cinco componentes.

Las varianzas acumuladas explicadas con un modelo de cinco factores fueron: 99,99% para el bloque X (respuestas voltamperométricas) y 98,83% para el bloque Y (concentraciones). Posteriormente, el modelo PLS2 se aplicó para predecir la concentración de las muestras utilizadas como estándares, a fin de comprobar el error en la etapa de calibración. En este caso, se obtuvieron errores de cuantificación de 3,5; 12,7; y 9,7% respectivamente para la Cys, el Trp, y la Tyr. Los errores de cuantificación en la etapa de predicción de las concentraciones de las muestras de prueba, fueron de 8,2% para la Cys, 14,5% para el Trp, y 41,9% para la Tyr. El resultado más desfavorable para el caso de la Tyr se atribuye a la falta de selectividad de su señal, que se superponen con las contribuciones de Trp y Cys.

A partir de aquí, se construyeron modelos más específicos focalizados en la predicción de cada analito, mediante PLS1. Una vez más, el número de factores que se utilizan se estimó mediante validación cruzada. En este caso, se necesitaron cinco factores para Cys y Trp, y seis para Tyr. El porcentaje de error en la cuantificación de cada analito en la etapa de calibración fue de 99,99% para el bloque X y >99% para el bloque Y, para los tres casos. En la etapa de predicción, se observó un resultado muy satisfactorio para en caso de la determinación de la Cys, error global de 6,2%. En la cuantificación de Trp y Tyr se obtuvieron unos errores de predicción de 14,3% y 22,6%, respectivamente. Estos últimos valores podrían ser causados por la aparente falta de bilinealidad de los datos voltamperométricos.

Llegados a este punto, y a fin de superar las dificultades en modelar debido a la falta de bilinealidad de la señal, se aplicó un algoritmo no lineal basado en PLS polinomiales para el tratamiento de los datos. Se utilizó un polinomio de segundo orden como relación interna entre los resultados (scores) y los pesos (loadings) de cada factor. Al igual que en el enfoque PLS1, cada aminoácido se modeló individualmente estableciendo calibraciones específicas para cada uno de ellos. De nuevo se obtuvieron unos un número óptimo de factores a utilizar, cinco para Cys y Trp y seis para Tyr. Con esto se explica más de 99% de la varianza de concentración. Los resultados mostraron una mejora general en la cuantificación de los tres compuestos con respecto a PLS lineal: un error global de 4,2% en la determinación de Cys; y de 9,6% y 15,3% en la cuantificación de Trp y Tyr, respectivamente.

#### **4.1.2.2 Análisis mediante ANNs**

Una vez modelada la señal mediante quimiometría multivariante clásica, se decidió evolucionar hacia un estudio más sofisticado y novedoso, mediante redes neuronales artificiales.

Una parte importante de una lengua electrónica es sin duda la matriz de sensores, que proporciona un conjunto de información del sistema en estudio; sin embargo en el caso del presente trabajo, es la propia técnica electroquímica la que proporciona el conjunto de

datos, el voltamperograma completo para cada experimento. A diferencia de otras técnicas, ya no se trata de encontrar potenciales redox característicos dentro de todo el espectro, sino utilizar el conjunto del barrido para interpretar el problema. Además, en el caso de una matriz compleja multicomponente, la señal generada es también compleja, ya que contiene información de los diferentes analitos pero también de posibles interferentes. Por lo tanto, el segundo aspecto a considerar en un enfoque multianálisis, es una etapa de procesamiento previo de la señal a fin de compactarla, reduciendo así su magnitud, depurando la información y facilitando (en términos de calidad y de tiempo empleado) el modelado de la señal. La elección de la técnica de procesamiento de datos para un caso particular depende de la tarea a resolver y la estructura de los datos (no linealidad, correlaciones, etc.).

Partiendo de nuevo de los datos voltamperométricos crudos, la primera dificultad a afrontar es entonces, la complejidad de la señal. Los barridos electroquímicos consistían en intensidades de corriente registrados en el intervalo de potenciales de 0,4 a 1,0V, en pasos de 0.00365V. Por lo tanto, cada muestra proporcionaba un conjunto de 164 valores, que constituían la señal para su posterior análisis multivariante.

Era, por tanto, necesario realizar un pre-tratamiento de la información, que en este caso se llevó a cabo mediante el empleo de la DWT, a fin de eliminar los componentes de ruido y comprimir los voltamperogramas mediante la selección y la extracción de información significativa. Seguidamente se utilizó una ANN para modelar el sistema a partir de la información reducida, y la obtención de las concentraciones de las especies consideradas.

Como hemos dicho, los datos de salida forman una matriz de 72 vectores patrón (24 voltamperogramas por cada aminoácido estudiado), 164 elementos de corriente por cada uno de ellos. La matriz de composición de los patrones contenía, por tanto, un total de 11.808 elementos. La dimensión de cada vector patrón de 164 valores de corriente por muestra, representa una entrada poco práctica para ser aplicada a una red neuronal. Así, la propuesta inicial de análisis consistió en la compresión de estos datos de entrada, eliminando información redundante, y tratando al mismo tiempo de eliminar el ruido,

asegurando la preservación de cualquier información significativa en cada vector. Para llevar a cabo tal fin era necesario seleccionar la función wavelet madre a emplear y el nivel de descomposición.

El porcentaje de compresión en un voltamperograma procesado mediante una WT, establece la cantidad de información conservada. Así, a mayor porcentaje de compresión, menos información se mantiene. Dado que las señales electroquímicas de barrido lineal contienen su información significativa en la región de baja frecuencia [239], se utilizaron los coeficientes de aproximación como la información comprimida (§ 1.7.4.).

Las etapas seguidas para llevar a cabo el presente estudio fueron las siguientes:

- Diseño del modelo, mediante la selección de la wavelet madre y del nivel de descomposición, y la selección de la ANN.
- Tratamiento de la información: suavizado y compresión de los datos, y modelado WT-ANN.

### **Selección de la wavelet madre y del nivel de descomposición**

La wavelet madre y el nivel de descomposición, para lograr la mejor compresión y suavizado de los voltamperogramas, se eligieron teniendo en cuenta el grado de similitud entre el voltamperograma original y el reconstruido a partir de los coeficientes de aproximación de la compresión. A fin de cuantificar esta similitud se propone un factor de comparación, que llamamos  $f_c$  que tiene en cuenta el área bajo las dos señales cuando se superponen. El factor  $f_c$  se define como la relación entre el área intersección de dos curvas, y la superficie total bajo las dos curvas. Así pues el factor  $f_c$  se puede expresar como  $f_c = (A \cap B) / (A \cup B)$ . Este factor varía de 0 a 1 en función de la similitud entre las señales, siendo 0 cuando dos señales no tienen nada en común y aumentado su valor cuanto más similares son. La figura 4.2 muestra gráficamente el significado del factor  $f_c$ .

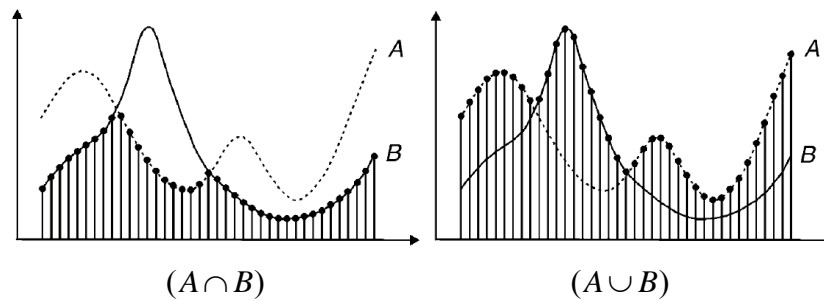


Figura 4.2. Expresión gráfica de los componentes utilizados para el cálculo del factor  $f_c$ .

### Selección de la ANN

A fin de elegir la ANN adecuada para nuestra aplicación, se consideraron varios factores:

- El número de neuronas en la capa de entrada coincidirá con el número de coeficientes de aproximación de la DWT.
- El número de neuronas en la capa de salida el número de parámetros a modelar (tres en este caso, las concentraciones de los tres aminoácidos). En este caso se consideraron dos posibles estructuras para la ANN: una red con tres neuronas en la capa de salida, uno por cada aminoácido; o bien una red por cada aminoácido, es decir, tres ANN en paralelo con una neurona cada una en la capa de salida.
- El número de neuronas y las capas ocultas para una arquitectura ANN normalmente se determina por ensayo y error. Así pues, en principio se consideró una arquitectura formada por una capa oculta y un número de neuronas igual a la media geométrica entre el número de entradas y de salidas. Después, se aumentó el número de neuronas en la capa oculta con el fin de mejorar el rendimiento del modelado. Una vez establecido el número de neuronas en esta estructura, se realizó una comprobación adicional para probar el rendimiento de una red de dos capas ocultas, en la que la suma de las neuronas en ambas capas ocultas fue igual al número total de neuronas de la estructura con una única capa oculta.

Las ANN probadas fueron del tipo feedforward de retropropagación con aprendizaje supervisado. Los algoritmos de aprendizaje probados fueron los que ya existen

preprogramados en el entorno MATLAB: gradiente conjugado, gradiente descendiente, gradiente descendiente con tasa de aprendizaje adaptativo, gradiente descendiente con momentum, gradiente descendiente con momentum y tasa de aprendizaje adaptativo, algoritmo de optimización Levenberg-Marquardt y algoritmo de regularización bayesiana.

Las matrices de datos se normalizaron en el intervalo de  $[-1,1]$  con el objeto de disminuir el coste computacional. Asimismo, los datos se dividieron en subgrupos de entrenamiento y prueba (75% del conjunto de datos se seleccionó para el entrenamiento). Se evaluó la capacidad de generalización de la red entrenada mediante el cálculo del Error Relativo Absoluto (RAE) de los valores esperados frente a los obtenidos.

El objetivo de este proceso es conseguir un compromiso entre el rendimiento de la red para modelar datos de entrenamiento y su capacidad de generalización a los datos que no se utilizan en el entrenamiento.

Para el seguimiento del error de red durante el entrenamiento se utilizó el cálculo de la Suma de Errores Cuadrados (del inglés SSE), que se define como la suma de las diferencias al cuadrado entre las salidas de la red y los correspondientes valores esperados. Los valores de convergencia se fijaron en  $SSE = 0,001$  y un valor inicial para la  $RAE = 15\%$ . Se programó la interrupción de la red cuando se completaran 200 épocas de entrenamiento o bien cuando el SSE alcanzara el valor objetivo. Para evaluar el subconjunto de prueba se utilizaría el cálculo del RAE.

La siguiente etapa consistía entonces en la interpolación del subconjunto de prueba y el cálculo de su valor RAE. Si este nuevo RAE es menor que el valor de partida, la red entrenada se guarda temporalmente, es reentrenada iterativamente hasta que el valor RAE ya no mejora más o bien si se ha consumido la semana de tiempo de cálculo prefijada.



## **Suavizado y compresión de los datos**

El objetivo de la compresión es representar la señal original con el menor número de coeficientes wavelet. Además de la compresión, la aplicación de la DWT permitió eliminar el ruido de señal, suavizándola. El número de valores obtenidos a partir de un voltamperograma comprimido dependerá de la wavelet madre y nivel de descomposición utilizado. Para realizar una compresión del voltamperograma, sólo se consideraron los coeficientes de aproximación obtenidos con DWT. Por lo tanto, la señal reconstruida se suavizará y en algunos casos podrá resultar ligeramente distorsionada. Las wavelets madre evaluadas fueron coiflets, daubechies, biorthogonal y symlets. Tal como se ha indicado anteriormente, la similitud entre las señales originales y reconstruidas se evaluó mediante el factor  $f_c$ .

Los voltamperogramas se comprimieron utilizando 165 combinaciones obtenidas a partir de 33 wavelets madre y 5 niveles de descomposición. Cada vez que la matriz de voltamperogramas se comprimió, se reconstruyó y comparó con los datos originales mediante el factor  $f_c$ . El nivel de descomposición y la wavelet madre finalmente seleccionados, fueron escogidos teniendo en cuenta la similitud entre las señales originales y reconstruidas, en un  $f_c > 0,95$ ; utilizando el menor número de coeficientes de aproximación posible.

Con el fin de conseguir un equilibrio entre el menor número posible de coeficientes de aproximación y una  $f_c$  superior a 0,95, la compresión utilizando la wavelet Daubechies de cuarto orden y un nivel de descomposición de 4. En este caso se obtuvieron 16 coeficientes de aproximación y un  $f_c$  de 0,965.

## **Modelado WT-ANN**

A fin de identificar la ANN más apropiada para el presente estudio, se consideraron diferentes arquitecturas con entrenamiento supervisado. En todos los casos se empleó

una capa de entrada con 16 neuronas, igual al número de coeficientes aproximación obtenidos después de la DWT de pre-procesamiento. Las arquitecturas evaluadas tenían 1 ó 3 neuronas de salida, y 1 ó 2 capas ocultas con un número de neuronas variable. En total se estudiaron 16 combinaciones diferentes.

Para todas estas arquitecturas ANN, se utilizaron diferentes algoritmos de entrenamiento con el fin de seleccionar el que tiene mejor capacidad de entrenamiento y de predicción. Los mejores resultados se obtuvieron para la ANN de retropropagación feedforward con regularización bayesiana.

En la arquitectura de 1 neurona en la capa de salida se entrenaron tres redes en paralelo, una por cada aminoácido. La arquitectura con los mejores está formada por dos capas ocultas sin ninguna función de transferencia lineal, 6 neuronas de la primera capa oculta, 24 en la segunda y función de transferencia lineal en la capa de salida. Los valores mínimos de RAE para estas redes eran de 6,768%; 5,901% y 8,545% para Trp, Cys y Tyr, respectivamente. Se evaluó el comportamiento de esta red mediante la comparación de los resultados obtenidos frente a los valores esperados, por análisis de regresión lineal. La tabla 4.1 contiene los valores de la pendiente y la intersección de las rectas de regresión, correspondientes, en un nivel de confianza del 95%, para el conjunto de datos de entrenamiento y de prueba; así como el valor de correlación lineal entre los valores esperados y obtenidos.

**Tabla 4.1** Parámetros de regresión lineal obtenidos para la recta de comparación ( $y=m \times x+b$ ) de las concentraciones obtenidas versus las esperadas.

	Entrenamiento			Prueba		
	<i>R</i>	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>R</i>	<i>m</i>	<i>b</i>
Trp	1,000	0,999±0,0022	$1,10 \times 10^{-8} \pm 2,6 \times 10^{-8}$	0,987	1,006±0,0860	$2,30 \times 10^{-8} \pm 11 \times 10^{-8}$
Cys	1,000	0,999±0,0018	$0,89 \times 10^{-8} \pm 3,7 \times 10^{-8}$	0,991	1,063±0,0760	$-6,40 \times 10^{-8} \pm 17 \times 10^{-8}$
Tyr	1,000	0,998±0,0060	$0,36 \times 10^{-8} \pm 12 \times 10^{-8}$	0,976	0,970±0,1200	$1,70 \times 10^{-8} \pm 27 \times 10^{-8}$

Cabe señalar que, aun cuando suponía una ventaja computacional emplear una única ANN con tres neuronas en la capa de salida, los resultados obtenidos fueron

relativamente peores que para el caso de tres ANN paralelas con una única neurona en la capa de salida.

En el Artículo 3 anexo al presente trabajo se encuentra una relación detallada de todas las combinaciones estudiadas, así como algunos resultados adicionales algunas pruebas que proporcionaron resultados menos favorables.

En este punto cabe indicar que trabajos posteriores a los publicados en el mencionado Artículo 3 anexo, ofrecían un paso adelante en el procesamiento, proponiendo una Red Neuronal Wavelet que modelaba el mismo conjunto de datos que en este capítulo se expone, con resultados remarcables [240].

## **4.2. Determinación de metales pesados**

La siguiente aplicación desarrollada consistió en la determinación simultánea de metales pesados, empleando la técnica de redisolución anódica con el propósito de alcanzar límites de detección bajos, y a partir de la señal voltamperométrica generada con un electrodo composite de grafito y epoxi.

### **4.2.1 Caracterización del sistema de medida**

El pH es uno de los aspectos más importantes a considerar en la determinación de metales mediante la técnica voltamperométrica de redisolución anódica (DPASV). Experimentos previos con sensores grafito-epoxi pusieron de manifiesto el efecto corrosivo de pHs extremos del medio en contacto prolongado con la superficie del sensor [81]. Por otro lado, experimentalmente se observó que de manera general se conseguía un incremento de la sensibilidad al disminuir el pH del medio, hasta llegar a no detectar señal para valores de pH superiores a 4. Estas observaciones pueden ser asociadas a la formación de hidróxidos metálicos insolubles a valores de pH elevados.

El uso de material de grafito-epoxi en electrodos desechables, en el que el tiempo de contacto del electrodo con la solución de trabajo es relativamente corto, abre una vía de estudio que potencialmente permitiría trabajar a valores de pH aún más bajos y por lo tanto mejorar el límite de detección.

Otro de los parámetros importantes a considerar en la utilización de la técnica DPSAV es el tiempo de pre-concentración. Así pues se estudió el efecto del tiempo de preconcentración para diferentes concentraciones de rango bajo de plomo en solución, en un rango de 2 a 30 minutos.

Como ya era previsible, de manera general y sin importar el pH del medio de trabajo, la sensibilidad aumentó al incrementar el tiempo de pre-concentración. Para niveles de concentración de ppb de Pt, se puede observar un incremento casi lineal de la intensidad de corriente del pico al incrementar el tiempo de pre-concentración. Esto implica que es determinante un control estricto del tiempo de preconcentración de la técnica, y que, a ser posible, se escogerá un valor elevado ya que se traducirá en un incremento en la sensibilidad del método.

Cabe esperar que para tiempos de preconcentración mucho más largos, la superficie del electrodo de trabajo llegue a saturarse, y un incremento aún mayor de tiempo de preconcentración, no implique un incremento en la intensidad de la corriente obtenida, lo que implicaría la pérdida de la linealidad y limitaría la sensibilidad de la respuesta. Este fenómeno multiplica la sensibilidad de la técnica DPSAV, lo que hace posible la realización de determinaciones de metales pesados en reducidas concentraciones, por ejemplo, en análisis medioambiental. El diseño de la superficie y sus dimensiones intervienen, en este sentido, en la sensibilidad del método.

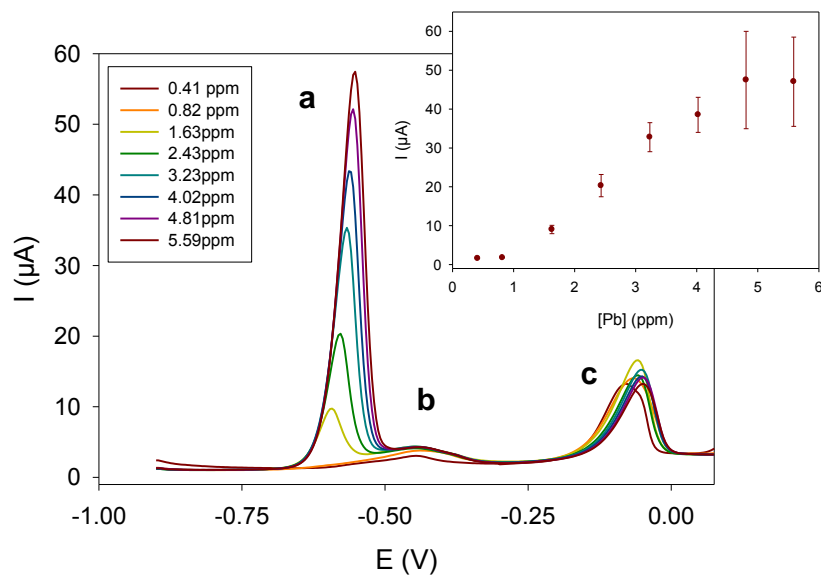
En la bibliografía encontramos que, en el caso de electrodos de superficies modificadas, utilizando la técnica DPSAV, la representación del pico de corriente de redisolución anódica versus el tiempo de preconcentración, presenta una saturación que se puede asociar también al equilibrio de recubrimiento de la superficie [56, 241, 242].

#### 4.2.2 Curvas de calibración e interpretación de la señal

A fin de evaluar la capacidad del sensor epoxi-grafito para determinar metales pesados en una muestra multianalito, se llevaron a cabo una serie de barridos electroquímicos mediante voltamperometría de stripping anódico, según las diferentes condiciones descritas en el apartado 5.3 de este capítulo.

Por un lado se registraron los voltamperogramas correspondientes a diferentes concentraciones de plomo, en medio tampón acetato pH 3,76 por un tiempo de pre-concentración de 60 segundos, y en presencia de un fondo de cobre de concentración 1.73 ppm. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado y en una matriz de cobre, interferente habitual en muestras reales ambientales.

La figura 4.3 muestra los resultados obtenidos en este procedimiento. Como puede apreciarse en el gráfico superior, la respuesta lineal para el plomo es limitada en concentraciones entre 2 y 4 ppm, lo que muestra una aplicación útil limitada en estas condiciones experimentales.

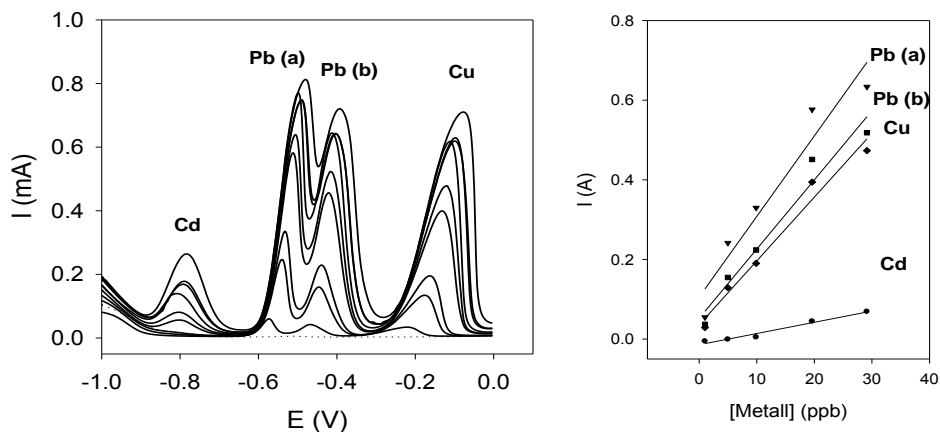


**Figura 4.3.** Determinación de plomo mediante DPASV en una matriz de cobre (1.73 ppm) en 0,1 M de tampón acetato pH 3,67. El tiempo de preconcentración fue de 60 s.

Los picos crecientes **a** y **b** corresponden al plomo y los picos **c** corresponden al cobre. La curva de calibración del plomo a partir de la intensidad de los picos **a** es la que se encuentra insertada en la figura. El empeoramiento de la repetitividad en las muestras de concentración más elevada puede asociarse a la aportación de metal residual en mediciones consecutivas, dado que el procedimiento experimental se llevó a cabo sin renovación de la superficie del sensor después de cada medida.

La calibración del sistema correspondiente a diferentes concentraciones de plomo, en medio HCl 0.1 M, para un tiempo de pre-concentración de 120 segundos, mostró una mejora significativa en la sensibilidad el límite de detección.

Por último, la figura 4.4 muestra los voltamperogramas obtenidos en la determinación de plomo, cobre y cadmio en una disolución de igual concentración por los tres metales, analizada en medio HCl 0.1 M, para un tiempo de pre-concentración de 120 segundos. Se muestran en la misma figura las curvas de calibración correspondientes a la representación de los picos de redisolución anódica versus la concentración de metal, en la zona lineal de respuesta de los tres analitos.



**Figura 4.4.** Determinación por DPASV de mezclas de plomo, cobre y cadmio en diferentes concentraciones en medio 0.1 M de HCl y tiempo de pre-concentración de 120 seg.

Como algunos autores sugieren [243], la aparición del doble pico de redisolución anódica del plomo está directamente relacionada con la deposición del plomo sobre la superficie del sensor durante la etapa de pre-concentración, que puede tener lugar de forma competitiva, de manera que el metal se deposita primeramente en puntos activos favorables de la superficie del electrodo de trabajo constituyendo una monocapa. A medida que la deposición continúa, estos puntos activos se agotan y el proceso se vuelve competitivo entre una deposición del metal en puntos activos parados o sobre aquellos donde ya existe metal depositado, formando multicapas. Los dos picos podrían ser debidos a esta causa. Además de los fenómenos de competencia, otro de los aspectos a los que podría atribuirse es a la formación de compuestos intermetálicos tales como el plomo con cadmio y cobre. El mismo fenómeno, pero menos acusado, se observó al trabajar a pH 3,76.

El incremento de la sensibilidad a este pH puede ser atribuida a la ausencia de formación de hidróxidos metálicos insolubles en medio ácido [244], aunque la liberación de hidrógeno podría ser la causa de la fuerte disminución de la sensibilidad de cadmio.

En las condiciones definidas en la figura 4.4, los límites inferiores de respuesta lineal fueron de 10 ppb para el cadmio y de 1 ppb para el plomo y el cobre. Cabe señalar que estos límites de detección son suficientemente bajos, y comparables a algunos que se encuentran en la bibliografía obtenidos por modificación de la superficie del electrodo de grafito vitrificado con mercurio, Nafion, etc. o directamente por electrodos de gota de mercurio, elemento que, como ya se ha comentado en la introducción de este trabajo, tiende a hacerse desaparecer en los laboratorios de análisis debido a sus repercusiones tóxicas para la salud y el medio ambiente [55, 56, 242, 244–265].

En este punto es importante indicar que esta metodología ha resultado eficaz para el análisis de cadmio y plomo, uno en presencia del otro, a concentraciones de traza, ya que se diferencian perfectamente los picos de oxidación de ambos metales.

Sin embargo, de igual manera que ocurría en la determinación de aminoácidos explicada en el capítulo anterior, una metodología multivariante permite la discriminación entre

metales cuyos potenciales de oxidación son próximos y provocan señales solapadas. El análisis de este tipo de muestras, lo que constituyó el último hito de este proyecto, se describe en el próximo apartado.

### 4.2.3 Análisis multivariante. Aplicación de una Red Neuronal Wavelet

La voltamperometría de redisolución anódica (ASV) es una técnica de análisis muy sensible particularmente apropiada para la detección de metales pesados, ya que muestra varias ventajas sobre otros procedimientos electroquímicos, por ejemplo, el aumento de la concentración aparente gracias a la etapa de preconcentración, que permite determinar analitos en muy baja concentración en la muestra. Sin embargo, la naturaleza de las señales (especialmente aquellos que se obtienen a partir de mezclas complejas) exige el uso de técnicas de procesamiento de datos con el fin de decodificar la información multivariante [131, 176, 208].

Como ya se ha comentado, las redes neuronales wavelet (WNN) son una nueva clase de redes que combinan la transformada wavelet (WT) con las redes neuronales artificiales (ANN) en una arquitectura de perceptrón multicapa (MLR) [132]. La arquitectura y el funcionamiento de las WNN está explicado con anterioridad en este texto (§ 1.7.5.).

En la aplicación que en este trabajo se describe, se utilizó la retropropagación del error, y se evaluó la capacidad de la red como la diferencia entre los valores esperados y obtenidos de acuerdo, calculado como el error cuadrático medio (MSE), definido por la siguiente ecuación:

$$MSE = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N \sum_{r=1}^m (y_{\text{exp}}^n(r) - y^n(r))^2 \quad (4.1)$$

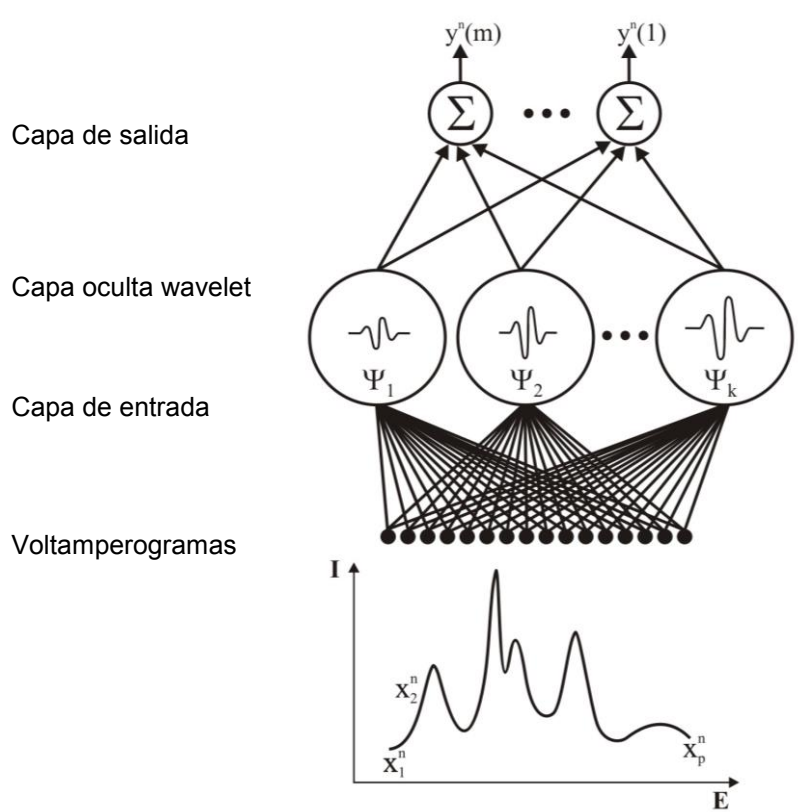
donde  $y^n(r)$  es la r-ésima salida de la red y  $y_{\text{exp}}^n(r)$  es el valor r-ésimo de la concentración en relación al vector voltamperograma de entrada  $x^n$ .  $N$  corresponde al número de vectores de entrada y  $m$  el número de salidas.



En este trabajo la función de activación de la WNN corresponde a la primera derivada de la función gaussiana definida por la ecuación 4.2. Para un análisis matemático detallado y la descripción del algoritmo puede consultarse la bibliografía [208].

$$\psi(x) = xe^{-0.5x^2} \quad (4.2)$$

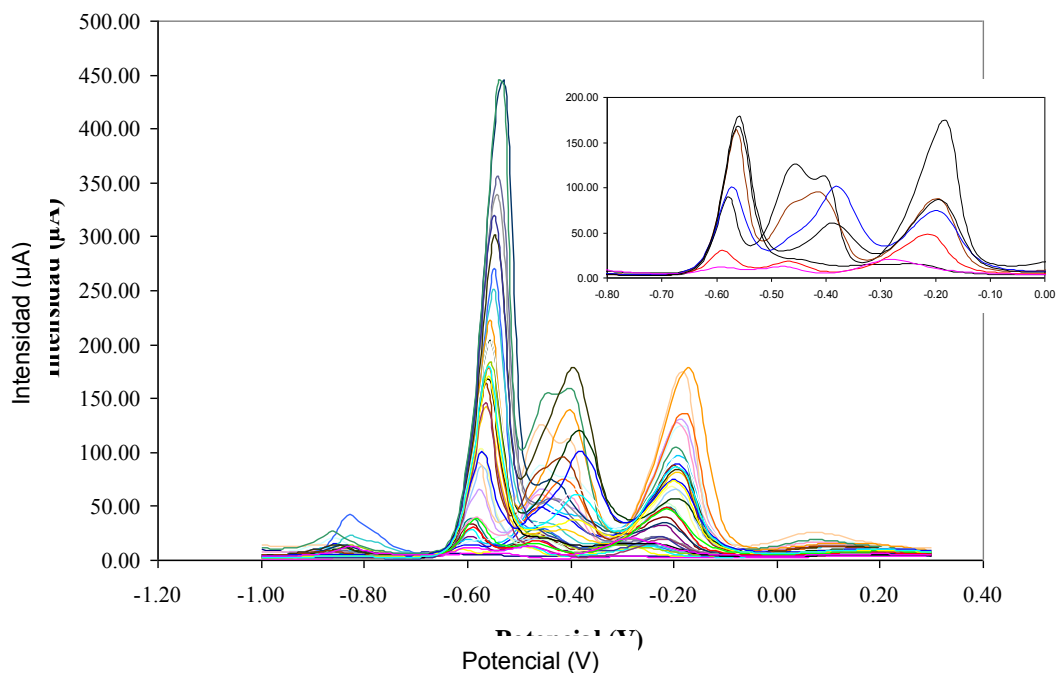
La figura 4.5 representa el funcionamiento de la WNN seleccionada. Cada voltamperograma está representado por  $x^n$ , el cual se asigna a un punto del espacio de concentraciones de cinco dimensiones, identificadas por  $y^n(m)$ .



**Figura 4.5.** Modelo general de la WNN utilizada para interpretar las respuestas ASV. La función  $\Psi_k$  corresponde a la wavelet multidimensional, donde  $k$  es el número de neuronas en la capa oculta.  $x_j^i$  indica el valor  $j$ -ésimo de corriente del  $i$ -ésimo voltamperograma, y  $y^n(m)$  la información entregada de concentración para cada elemento.

Una vez decidida la metodología de procesamiento, se procedió a la preparación de las muestras objeto de análisis definidas anteriormente (§ 3.4.2.).

La figura 4.6 muestra los voltamperogramas registrados, en los que se puede observar el fuerte solapamiento de la señal que hace imposible una extracción directa de la información contenida en la señal, y que por tanto hace necesario este procesamiento multivariable.



**Figura 4.6.** Señales voltamperométricas obtenidas para el rango de 0.4-20ppm, utilizando el electrodo de Grafito-Epoxy. El recuadro del interior es un acercamiento de la señal.

A partir de estos datos se construyó la red neuronal wavelet descrita anteriormente, a fin de establecer un modelo que permita determinar de manera simultánea la concentración del plomo, cadmio y cobre en presencia de interferentes (talio e indio). Se analizaron un total de 37 voltamperogramas además del correspondiente a la medida del blanco (electrolito soporte).

Cada pulso del barrido de potencial corresponde a un valor de intensidad medida, por tanto se dispone de un conjunto de 38 voltamperogramas con 153 intensidades de corriente cada uno. Por otro lado, cada voltamperograma está relacionado con un valor de concentración para cada una de las 5 especies metálicas presentes en la muestra. Así pues la matriz de datos de entrada tendrá una dimensión de [153,38] y la matriz de datos de salida [5,38]. Esta información representa el universo de datos que se utilizará para entrenar la red.

El conjunto de datos de entrada se separó, a su vez, en dos grupos, uno de entrenamiento y otro de prueba, de forma que los datos de prueba no incluyeran vectores de la matriz de entrenamiento. Para el entrenamiento se utilizó un 70% de la información disponible y para la prueba el 30% restante, de modo que las matrices poseen dimensiones de [153,28] para entrenamiento y de [153,10] para prueba.

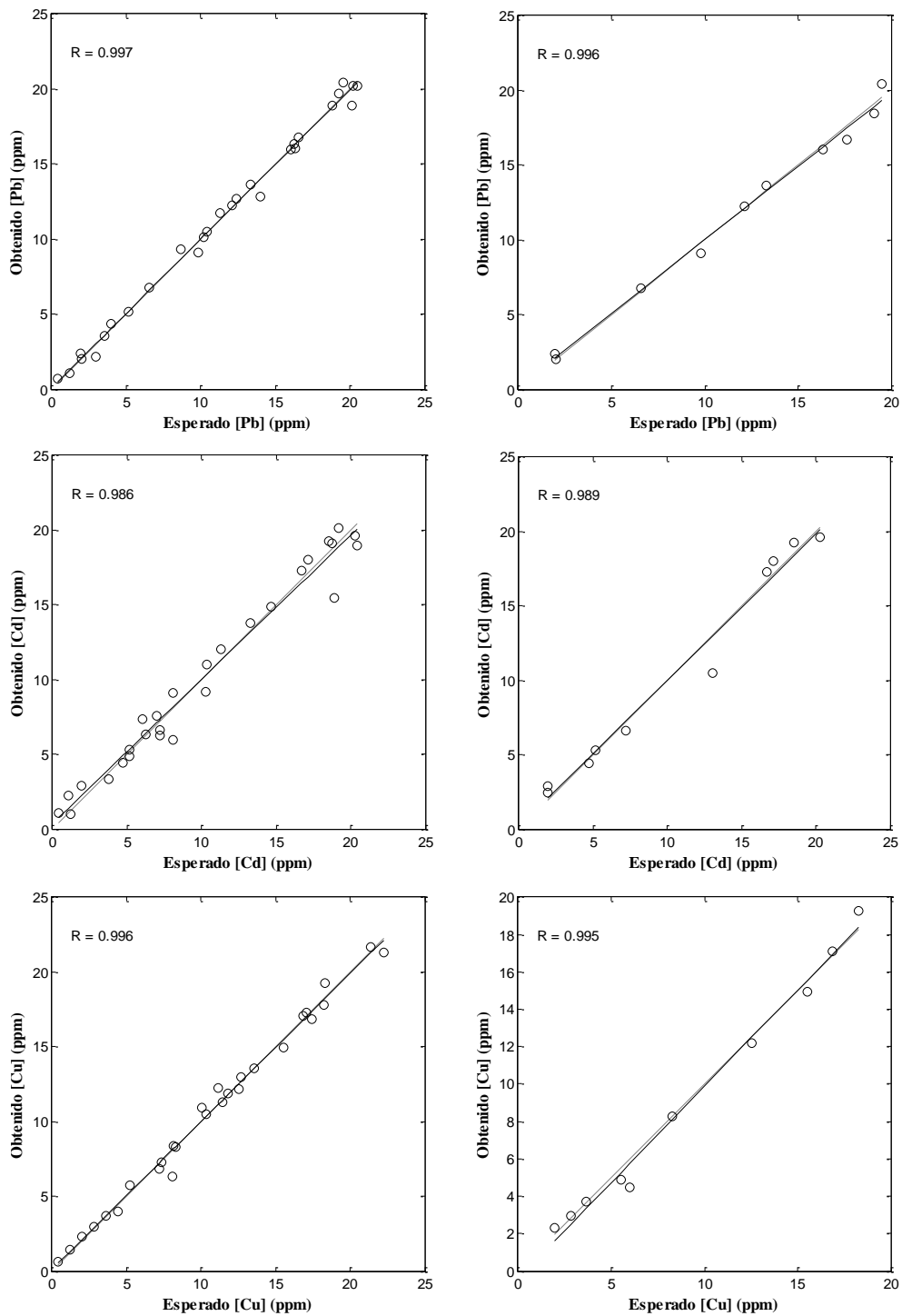
La arquitectura neuronal, así como los parámetros adoptados que la definen, se definió en base a un proceso iterativo de prueba y error, de forma que el modelo neuronal wavelet finalmente elegido tiene una dimensión de 153x4x5 neuronas, y se programó para alcanzar un error de 0.025 en un máximo de 10000 iteraciones. La tasa de aprendizaje se fijó en 0.0005 para todos los entrenamientos y en todos los casos se alcanzó el error en un número menor de iteraciones.

Para determinar el desempeño de la WNN en la cuantificación de los metales de interés (plomo, cadmio y cobre) se realizó un análisis de regresión lineal entre los valores de concentración esperados y obtenidos con por la red. Esta información se resume en la tabla 4.2., en la que se muestran también los errores calculados para el 95% del intervalo de confianza.

**Tabla 4.2.** Valores de coeficiente de correlación, pendiente e intersección para el 95% del intervalo de confianza para las especies metálicas de interés.

Metal	Entrenamiento			Prueba		
	R	m	b	R	m	b
Pb	0.997	0.994±0.030	0.073±0.391	0.980	0.980±0.069	0.179±0.928
Cd	0.986	0.960±0.065	0.345±0.775	0.986	0.986±0.069	0.134±1.511
Cu	0.996	0.989±0.038	0.115±0.462	1.029	1.029±0.088	-0.412±0.955

La figura 4.7. muestra las gráficas de regresión lineal junto con la recta de mejor ajuste de los análisis de regresión hechos para el plomo, cadmio y cobre.



**Figura 4.7.** La línea discontinua corresponde a idealidad ( $y = x$ ) y la línea continua es la regresión lineal de la comparación de los datos (se muestra en cada gráfico coeficiente de correlación R). Las gráficas de la derecha corresponden al entrenamiento, y las de la izquierda a la prueba.

De los resultados anteriores se desprende que los coeficientes de correlación tanto para la etapa de entrenamiento como para la de prueba son mayores de 0,9; lo que indica un buen desempeño de la WNN.

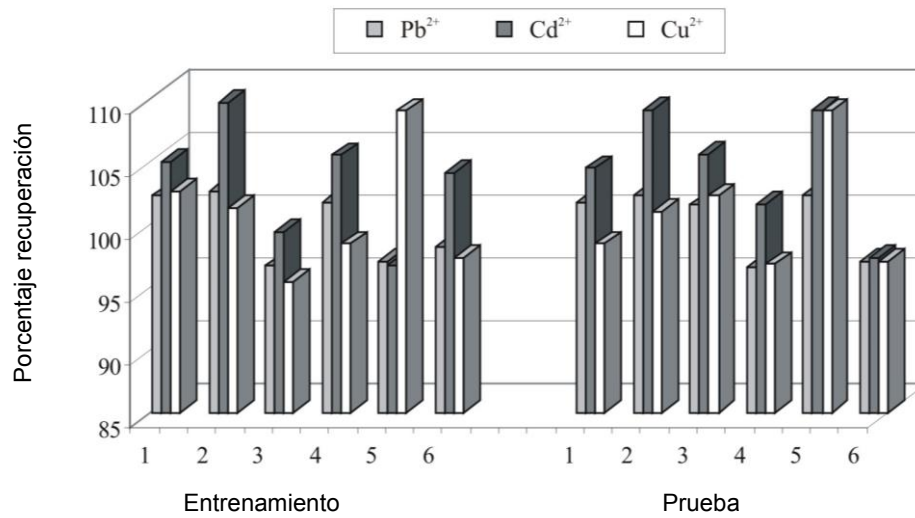
Sin embargo, a fin de confirmar el resultado de la red, y comprobar que existe repetibilidad en su comportamiento y por tanto en la cuantificación de los metales, se realizaron cinco entrenamientos adicionales, mediante una validación cruzada que consistió en extraer de manera aleatoria 10 vectores del universo de datos para la etapa de prueba, en cada repetición del proceso; mientras que el resto de los vectores se utilizaban para el entrenamiento.

La comparación entre las redes se llevó a cabo mediante el porcentaje de recuperación (PR), calculado para cada modelo WNN [176], según la siguiente ecuación:

$$PR = \frac{\sum_{i=1}^N 100 \times \left( 1 + \frac{y_i - \hat{y}_i}{\hat{y}_i} \right)}{N} \quad (4.3)$$

donde  $y_i$  es el valor  $i$ -ésimo de salida obtenido,  $\hat{y}_i$  el valor  $i$ -ésimo de salida esperado y  $N$  el número de elementos del vector de salida.

Los resultados de esta comparativa pueden observarse en la figura 4.8 para las todas las repeticiones entrenamiento-prueba realizados.



**Figura 4.8.** Gráficos de barras representando el PR para cada WNN. A la izquierda se representan las sesiones de entrenamiento y a la derecha las de prueba.

Estos resultados son considerados adecuados para establecer que la cuantificación de plomo, cadmio y cobre; y resultan ser satisfactorias utilizando el modelo de WNN propuesto. El efecto de seleccionar aleatoriamente espacios de entrenamiento y prueba, se ve reflejados en el aumento o disminución del porcentaje de recuperación. Sin importar esta aleatoriedad de selección, es importante señalar que los valores de PR más desfavorables nunca es mayor al 10% del porcentaje de recuperación ideal (que es del 100%) en las distintas sesiones de entrenamiento y prueba. En los tres casos el error de recuperación no es mayor al 5% del valor teórico, lo que valida el procedimiento propuesto.

A fin de visualizar el beneficio conseguido con la metodología propuesta, se procesaron una serie de muestras sintéticas con mezclas de los cinco metales y sus concentraciones se calcularon por interpolación directa en una calibración lineal clásica, tomando valores de corriente a potenciales característicos de cada metal (-0,57V para  $Pb^{2+}$ , -0.86V para  $Cd^{2+}$  y -0.22V para  $Cu^{2+}$ ). Para estas muestras la WNN propuesta proporciona valores lo suficientemente cerca de los esperados (siendo la media de los errores absolutos entre 4 y 11%), mientras que los rendimientos de interpolación directos dan como resultado un

error sustancialmente mayor, ya que el solapamiento de la señal no estrada y procesada debidamente en el caso de interpolación directa.

Por último, aunque el objetivo del modelo se centraba en la determinación de las especies metálicas plomo, cadmio y cobre, y no en la de los interferentes indio y talio; el talio logra ser cuantificado mediante esta red, aunque la precisión de los resultados es menor que en los anteriores. El coeficiente de correlación obtenido para  $Tl^+$  era aceptable (0,942 para el entrenamiento y 0,824 para la prueba). Los porcentajes de recuperación calculados para talio en los seis modelos WNN programados, proporcionan una media de 96,978%; lo que significa que los voltamperogramas contienen información analítica lo suficientemente capaz para predecir las concentraciones cercanas a la realidad. Esta misma situación no se produce para el indio. Aunque el indio no se cuantificó correctamente, su interferencia se corrigió correctamente por la red, permitiendo una cuantificación adecuada para los otros metales.





## Capítulo V.

---

### 5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en el desarrollo de esta tesis se exponen en dos apartados, uno para cada tipo de analito estudiado, a fin de facilitar su comprensión.

A) En el caso del estudio de los aminoácidos oxidables cabe destacar lo siguiente:

- Esta tesis presenta las posibilidades de las técnicas voltamperométricas para la determinación simultánea de mezclas de aminoácidos oxidables.
- La evaluación general de los electrodos y las técnicas voltamperométricas indican que el método óptimo para el análisis de amino ácidos oxidables consiste en la utilización de la técnica voltamperometría diferencial de impulsos, y como electrodo de trabajo un electrodo de hilo de platino comercial.
- Este trabajo demuestra la idoneidad de los métodos de calibración multivariante para el análisis de los datos obtenidos de la voltamperometría diferencial de impulsos.

- El primer objetivo del problema asociado al procesamiento de la señal voltamperométrica mediante quimiometría clásica, permitió obtener resultados razonablemente satisfactorios. Así pues, cabe señalar que:
  - a) A pesar de la falta de selectividad de las señales voltamperométricas, el estudio preliminar de mezclas sintéticas mediante quimiometría clásica sugirió la posibilidad de determinar la cisteína, triptófano y tirosina con errores de cuantificación razonables. La capacidad de predicción fue especialmente satisfactoria para la cisteína.
  - b) En una situación más compleja, se aplicó el método para el análisis de aminoácidos oxidables en muestras de alimento. En este caso, de entre los algoritmos matemáticos habitualmente utilizados, el PLS no lineal con un polinomio de segundo grado, es el que proporciona los mejores resultados. Los tres analitos se lograron cuantificar. La precisión alcanzada para la cisteína y el triptófano fue especialmente satisfactoria.
- En cuanto al procesamiento de los voltamperogramas mediante las redes neuronales desarrolladas, se concluye que:
  - a) El acoplamiento de DWT y ANN supone una buena opción para el modelado de señales de los sensores amperométricos, haciendo posible el desarrollo y aplicación de una lengua electrónica voltamperométrica para el procesamiento de señales resultantes del análisis de muestras complejas que contienen los aminoácidos objeto de estudio.
  - b) El procesamiento DWT de los voltamperogramas ha permitido la reducción de la cantidad de información necesaria para representar a su contenido, siendo el caso estudiado de considerable dificultad, ya que la señal corresponde a la combinación solapada de tres compuestos, además del ruido y la oxidación de los medios que contienen.

- c) Para estimar el grado de representación de los datos originales, se ha propuesto un factor de comparación  $f_c$ , que calcula la similitud entre la señal reconstruida y la original, ofreciendo mejores resultados que el cálculo del coeficiente de correlación.
- d) Aunque los tiempos de cálculo involucrados en el entrenamiento son grandes, tentativas más simples, tales como el modelado directo de voltamperogramas submuestreados con ANNs no proporcionaron modelos aceptables.
- e) El estudio aquí presentado constituye una clara simplificación de los procedimientos analíticos empleados por lo general, en cuanto a la cuantificación por separado de aminoácidos mediante técnicas clásicas como la cromatografía líquida con derivatización pre-columna o post-columna, y detección espectroscópica de los correspondientes derivados (por ejemplo, espectrofotometría UV-vis o fluorescencia). Mientras que los sensores por sí solos no pueden resolver el problema, la aplicación de una red neuronal acoplada a un pretratamiento de la señal mediante DWT, supone un procedimiento sencillo y ágil, que puede satisfacer la demanda de determinación rápida de aminoácidos en campos tales como la alimentación, la bioquímica, farmacéutica y el análisis clínico.

B) En el caso del estudio de los metales pesados cabe destacar lo siguiente:

- En cuanto a la caracterización de sensores voltamperométricos basados en composites y su aplicación a la determinación de metales pesados, cabe señalar que:

- a) Este trabajo demuestra la idoneidad de la utilización del electrodo composite grafito-epoxi como electrodo de DPASV para la determinación de metales pesados en presencia de oxígeno.
- b) Tiempos de pre-concentración elevados proporcionan un incremento de la altura del pico de redisolución anódica, sin saturación apreciable de la superficie, aportando la posibilidad de mejorar la sensibilidad y los límites de detección, en caso necesario.
- c) Los resultados obtenidos en cuanto a sensibilidad, límite inferior de respuesta lineal e interferencias, muestran una respuesta para el electrodo grafito-epoxi similar a la de otros electrodos descritos en la bibliografía. Al comparar los resultados obtenidos en la caracterización de la superficie del electrodo por microscopía electrónica con los encontrados en la bibliografía para el caso de electrodos grafito-epoxi de película de mercurio, confirman que los electrodos grafito-epoxi introducidos en este trabajo se comportan como un conjunto complejo de microelectrodos con una superficie rugosa.
- d) La eliminación del uso de mercurio y el reducido tiempo del procedimiento de experimentación, son las grandes ventajas que ofrece el material composite propuesto, en comparación al carbono vitrificado y los electrodos modificados, aunque la reproducibilidad de la medida no es del todo satisfactoria en el momento de finalizar este trabajo de experimentación.
- e) Los electrodos de grafito-epoxi son más económicos y de más fácil preparación en el laboratorio que los electrodos modificados descritos en la bibliografía. La posible utilización de los materiales grafito-epoxi en tecnologías serigráficas abre la puerta a la producción masiva de sensores de un solo uso para el análisis de metales pesados con técnicas de redisolución.

- En cuanto al procesamiento de los voltamperogramas mediante las redes neuronales desarrolladas, para este caso se concluye lo siguiente:
  - a) La combinación de la técnica voltamperométrica de redisolución anódica con la red neuronal wavelet, propuesta en este trabajo, permite obtener resultados satisfactorios para la cuantificación de los iones  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , incluso en presencia de oxígeno como interferente en el intervalo de potencial estudiado.
  - b) La metodología utilizada fue capaz de aproximar semi-cuantitativamente el ión  $Tl^{+}$  interferente también. Sin embargo, ningún modelado fue capaz de interpretar la señal correspondiente al interferente  $In^{3+}$ , aunque su presencia fue debidamente compensada, incluso a nivel de concentración de 20 ppm.
  - c) Los experimentos proporcionaron unos resultados adecuados, tanto en las etapas de entrenamiento como de prueba, obteniéndose en todos los casos coeficientes de correlación mayores que 0.986, en los gráficos de comparación de las concentraciones obtenidas frente a las esperadas.
  - d) Al comparar los resultados obtenidos con la metodología propuesta y los obtenidos por interpolación directa en una simple calibración lineal, el gran potencial de la herramienta WNN queda demostrado. Los errores significativos de interpolación directa son causados por el fuerte efecto de superposición de la señal, que no permite extraer directamente la contribución de cada analito en la mezcla.
  - e) La exclusión del preprocesamiento de datos, por ejemplo la compactación, para la interpretación de señales voltamperométricas con fines de cuantificación de especies mediante el empleo de WNN, es una enorme

ventaja que permite conservar la información original de las señales y de esta forma construir modelos de calibración más adheridos al modelo real en estudio.

- f) Con los resultados obtenidos se puede concluir que, mediante el uso de un modelo WNN, se consigue la cuantificación de los metales de interés (plomo, cadmio y cobre) a niveles de entre 2 y 20 ppm en presencia de talio y el indio como interferencias, con errores promedio menores al 5%.
  
- g) El uso de electrodos a base de carbono aporta la sustitución de materiales tóxicos capaces de obtener resultados sensibles del orden de ppm, además de lo económico de los materiales que lo conforman. Un beneficio adicional del procedimiento es la no regeneración física del electrodo de trabajo antes de cada nuevo experimento. Así pues, la metodología propuesta es muy adecuada para los propósitos de monitorización ambiental, dadas la sencillez y robustez que muestra este tipo de sensor, y los resultados que ofrece.

## Capítulo VI.

---

### 6. Estudios posteriores y tendencias a futuro

Llegados a este punto, es oportuno concluir que posteriormente a la última publicación aportada como resultado de esta tesis, de 2009, se continuaron los experimentos en la línea aquí propuesta, enfocados al área alimentaria.

Así, los resultados obtenidos en estos trabajos continuados, dieron como resultado la una serie de publicaciones en revistas científicas indexadas [143, 226, 227, 229].

Esta área del conocimiento, el procesamiento de señales complejas haciendo uso de la tecnología cada vez con mayor potencial de trabajo, en los últimos años está abriendo un amplio abanico de posibilidades de aplicación, desde el ámbito alimentario hasta el médico y clínico, que permitirá llevar a cabo análisis de rutina exhaustivos en tiempos muy razonables, sin la necesidad de realizar grandes inversiones en equipos. Lo que era una visión futurista hace unos años, comienza a ser una realidad que seguro se implementará a gran escala en muchos sectores de nuestra sociedad.





## Capítulo VII.

---

### 7. Bibliografía

- [1] G. Chen, J. Cheng, J. Ye, Application of a novel micro-injector in the determination of indole derivatives in the rat pineal gland by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 370, 930-934 (2001).
- [2] E. Heftmann, *Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, Part B: Applications*, Chromatography. 6<sup>th</sup> ed.; Elsevier: Amsterdam, 2004.
- [3] E. Heftmann, *Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, Part A: Fundamentals and techniques*, Chromatography. 6<sup>th</sup> ed.; Elsevier: Amsterdam, 2004.
- [4] R. Khan, R. Onodera, M. Amin, N. Mohammed, Aromatic amino acid biosynthesis and production of related compounds from p-hydroxyphenylpyruvic acid by rumen bacteria, protozoa and their mixture, *Amino Acids*, 22, 167–177 (2002).
- [5] D. R. Baker, *Capillary electrophoresis*, Wiley: New York, 1995.
- [6] W. J. M. Underberg, J. C. M. Waterval, Derivatization trends in capillary electrophoresis: An update, *Electrophoresis*, 23, 3922–3933 (2002).
- [7] R. M. Callejón, A. M. Troncoso, M. L. Morales, Determination of amino acids in grape-derived products: A review, *Talanta*, 81, 1143–1152 (2010).
- [8] A. P. Clarke, P. Jandik, R. D. Rocklin, Y. Liu, N. Avdalovic, An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography, *Anal. Chem.*, 71, 2774–2781 (1999).
- [9] H. Yu, Y. S. Ding, S. F. Mou, P. Jandik, J. Cheng, Simultaneous determination of amino acids and carbohydrates by anion-exchange chromatography with integrated

- pulsed amperometric detection, *J Chromatogr A.*, 966, 89–97 (2002).
- [10] Y. V. Tcherkas, L. A. Kartsova, I. N. Krasnova, Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A*, 913, 303–308 (2001).
- [11] J. Wang, M. P. Chtrathi, B. Tian, Micromachined separation chips with a precolumn reactor and end-column electrochemical detector, *Anal. Chem.*, 72, 5774–5778 (2000).
- [12] N. S. Lawrence, E. L. Beckett, J. Davis, R. G. Compton, Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds, *Anal. Biochem.*, 303, 1–16 (2002).
- [13] L. Wang, C. Ma, X. Zhang, Y. Ren, Y. Yu, Determination of tyrosine traces by adsorption voltammetry of its copper (II) complex, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351, 689–691 (1995).
- [14] D. R. Shankaran, S. S. Narayanan, Studies on copper hexacyanoferrate modified electrode and its application for the determination of cysteine, *Bull. Electrochem.*, 14, p. 267-270 (1998).
- [15] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, E. Fábregas, S. Alegret, Cyclic voltammetric simultaneous determination of oxidizable amino acids using multivariate calibration methods, *Anal. Chim. Acta*, 405, 153–160 (2000).
- [16] H. Li, T. Li, E. Wang, Electrocatalytic oxidation and flow detection of cysteine at an aquocobalamin adsorbed glassy carbon electrode, *Talanta*, 42, 885–890 (1995).
- [17] A. R. Fiorucci, E. T. G. Cavalheiro, The use of carbon paste electrode in the direct voltammetric determination of tryptophan in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28, 909–915 (2002).
- [18] A. Merkoçi, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 21, 717–725 (2002).
- [19] E. Siebert, P. Fabry, Electrochemical sensors, in: *The CRC Handbook of Solid State Electrochemistry*; P.J. Gellings, H.J.M. Bouwmeester (eds.), CRC Press. Boca Rat., 1997.
- [20] S. Solé, A. Merkoçi, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing III. Beads, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 20, 102–110 (2001).
- [21] Y. Fan, K. J. Huang, D. J. Niu, C. P. Yang, Q. S. Jing, TiO<sub>2</sub>-graphene nanocomposite for electrochemical sensing of adenine and guanine, *Electrochim. Acta*, 56, 4685–4690 (2011).
- [22] H. Yin, Y. Zhou, Q. Ma, S. Ai, P. Ju, L. Zhu, L. Lu, Electrochemical oxidation behavior of guanine and adenine on graphene-Nafion composite film modified glassy carbon electrode and the simultaneous determination, *Process Biochem.*, 45, 1707–1712 (2010).
- [23] S. Ge, M. Yan, J. Lu, M. Zhang, F. Yu, J. Yu, X. Song, S. Yu, Electrochemical biosensor based on graphene oxide-Au nanoclusters composites for l-cysteine

- analysis, *Biosens. Bioelectron.*, 31, 49–54 (2012).
- [24] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, Multivariate data analysis in electroanalytical chemistry, *Electroanalysis*, 14, 1533–1542 (2002).
- [25] V. Pravdová, M. Pravda, G. G. Guilbault, Role of chemometrics for electrochemical sensors, *Anal. Lett.*, 35, 2389–2419 (2002).
- [26] M. S. Díaz-Cruz, J. Mendieta, M. Esteban, Combined use of differential pulse polarography and multivariate curve resolution: As applied to the study of metal mixed complexes of the metallothionein related hexapeptide, *Electroanalysis*, 14, 50–56 (2002).
- [27] M. C. Antunes, J. E. Simao, A. C. Duarte, Resolution of voltammetric peaks using chemometric multivariate calibration methods, *Electroanalysis*, 13, 1041–1045 (2001).
- [28] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, Optimisation of a neural network model for calibration of voltametric data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 61, 35–49 (2002).
- [29] A. A. Ensafi, T. Khayamian, M. Atabati, Simultaneous voltammetric determination of molybdenum and copper by adsorption cathodic differential pulse stripping method using a principal component artificial neural network, *Talanta*, 57, 785–793 (2002).
- [30] N. García-Villar, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, Potentiometric sensor array for the determination of lysine in feed samples using multivariate calibration methods, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 371, 1001–1008 (2001).
- [31] A. Guiberteau, T. Galeano, N. Mora, F. Salinas, J. M. Ortíz, J. C. Viré, Resolution by polarographic techniques of the ternary mixture of captan, captafol and folpet by using PLS calibration and artificial neuronal networks, *Comput. Chem.*, 25, 459–473 (2001).
- [32] P. L. López de Alba, L. López Martínez, L. M. de León Rodríguez, Simultaneous determination of synthetic dyes tartrazine, allura red and sunset yellow by differential pulse polarography and partial least squares. A multivariate calibration method, *Electroanalysis*, 14, 197–205 (2002).
- [33] C. Reguera, M. C. Ortíz, M. J. Arcos, Differential pulse voltammetric simultaneous determination of four anti-inflammatory drugs by using soft modelling, *Electroanalysis*, 14, 1699–1706 (2002).
- [34] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, E. Fàbregas, S. Alegret, Determination of tryptophan in feed samples by cyclic voltammetry and multivariate calibration methods, *Analyst*, 124, 733–737 (1999).
- [35] J. Saurina, E. López-Aviles, A. Le Moal, S. Hernández-Cassou, Determination of calcium and total hardness in natural waters using a potentiometric sensor array, *Anal. Chim. Acta*, 464, 89–98 (2002).
- [36] Y. Ni, L. Wang, S. Kokot, Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration, *Anal. Chim. Acta*, 439, 159–168 (2001).

- [37] O. Domínguez, M. J. Arcos, Simultaneous determination of chromium(VI) and chromium(III) at trace levels by adsorptive stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, 470, 241–252 (2002).
- [38] A. Herrero, M. C. Ortíz, Modelling the background current with partial least squares regression and transference of the calibration models in the simultaneous determination of Tl and Pb by stripping voltammetry, *Talanta*, 46, 129–138 (1998).
- [39] A. M. Aguilera, M. Escabias, M. J. Valderrama, M. C. Aguilera-Morillo, Functional analysis of chemometric data, *Open J. Stat.*, 3, 334–343 (2013).
- [40] C. R. Teixeira Tarley, G. Silveira, W. N. Lopes dos Santos, G. Domingues Matos, E. Galvão, P. da Silva, M. Almeida Bezerra, M. Miró, S. L. Costa Ferreira, Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology, *Microchemical Journal*, 92, 58–67 (2009).
- [41] S. Lee, S. Bong, J. Ha, M. Kwak, S. K. Park, Y. Piao, Electrochemical deposition of bismuth on activated graphene-nafion composite for anodic stripping voltammetric determination of trace heavy metals, *Sensors Actuators, B Chem.*, 215, 62–69 (2015).
- [42] V. Sosa, C. Barceló, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples, *Anal. Chim. Acta*, 855, 34–40 (2015).
- [43] D. Yang, L. Wang, Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, Voltammetric determination of Lead (II) and Cadmium (II) using a bismuth film electrode modified with mesoporous silica nanoparticles, *Electrochim. Acta*, 132, 223–229 (2014).
- [44] M. Maczuga, A. Economou, A. Bobrowski, M. I. Prodromidis, Novel screen-printed antimony and tin voltammetric sensors for anodic stripping detection of Pb(II) and Cd(II), *Electrochim. Acta*, 114, 758–765 (2013).
- [45] V. Rehacek, I. Hotovy, M. Vojs, Bismuth Film Voltammetric sensor on pyrolyzed photoresist/alumina support for determination of heavy metals, *Electroanalysis*, 26, 898–903 (2014).
- [46] E. Svobodová, L. Baldrianová, S. B. Hočevár, I. Švancara, Electrochemical stripping analysis of selected heavy metals at antimony trioxide-modified carbon paste electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7, 197–210 (2012).
- [47] J. Wang, Stripping analysis at bismuth electrodes: A review, *Electroanalysis*, 17, 1341–1346 (2005).
- [48] E. Svobodova-Tesarova, L. Baldrianova, M. Stoces, I. Svancara, K. Vytras, S. B. Hocevar, B. Ogorevc, Antimony powder-modified carbon paste electrodes for electrochemical stripping determination of trace heavy metals, *Electrochim. Acta*, 56, 6673–6677 (2011).
- [49] N. Serrano, A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Signal splitting in the stripping analysis of heavy metals using bismuth film electrodes: Influence of concentration range and deposition parameters, *Electrochim. Acta*, 53, 6616–6622

- (2008).
- [50] Z. Zou, A. Jang, E. MacKnight, P. M. Wu, J. Do, P. L. Bishop, C. H. Ahn, Environmentally friendly disposable sensors with microfabricated on-chip planar bismuth electrode for in situ heavy metal ions measurement, *Sensors Actuators, B Chem.*, 134, 18–24 (2008).
- [51] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, C. E. Efstathiou, Lithographically fabricated disposable bismuth-film electrodes for the trace determination of Pb(II) and Cd(II) by anodic stripping voltammetry, *Electrochim. Acta*, 53, 5294–5299 (2008).
- [52] G. H. Hwang, W. K. Han, J. S. Park, S. G. Kang, Determination of trace metals by anodic stripping voltammetry using a bismuth-modified carbon nanotube electrode, *Talanta*, 76, 301–308 (2008).
- [53] H. Xu, L. Zeng, D. Huang, Y. Xian, L. Jin, A Nafion-coated bismuth film electrode for the determination of heavy metals in vegetable using differential pulse anodic stripping voltammetry: An alternative to mercury-based electrodes, *Food Chem.*, 109, 834–839 (2008).
- [54] E. Tesařová, K. Vytřas, Potentiometric stripping analysis at antimony film electrodes, *Electroanalysis*, 21, 1075–1080 (2009).
- [55] Z. Hu, C. J. Seliskar, W. R. Heineman, PAN-incorporated Nafion-modified spectroscopic graphite electrodes for voltammetric stripping determination of lead, *Anal. Chim. Acta*, 369, 93–101 (1998).
- [56] T. H. Degefa, B. S. Chandravanshi, H. Alemu, Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of Lead(II) with N-p-chlorophenylcinnamo-hydroxamic acid modified carbon paste electrode, *Electroanalysis*, 11, 1305–1311 (1999).
- [57] M. A. el Mhammedi, M. Achak, A. Chtaini, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>-modified carbon-paste electrode for the determination of trace lead(II) by square-wave voltammetry, *J. Hazard. Mater.*, 161, 55–61 (2009).
- [58] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron*, 16, 121–131 (2001).
- [59] R. P. Buck, E. Lindner, Tracing the history of selective ion sensors, *Anal. Chem.*, 73, 88A–97A (2001).
- [60] M. de la Guardia, “Biochemical sensors: The state of the art, *Microchimica Acta*, 120, 243–255 (1995).
- [61] E. A. H. Hall, *Amperometric Biosensors*, Biosensors, Open Univ. Press: Buckingham, 1990.
- [62] M. Santandreu i Vilajosana, Tesis Doctoral, *Univ. Autònoma Barcelona*, 1998.
- [63] M. Jurkiewicz, Tesis Doctoral, *Univ. Autònoma Barcelona*, 1998.
- [64] W. Lei, W. Si, Y. Xu, Z. Gu, and Q. Hao, Conducting polymer composites with graphene for use in chemical sensors and biosensors, *Microchimica Acta*, 181, 707–722 (2014).

- [65] Y. Liu, X. Dong, P. Chen, Biological and chemical sensors based on graphene materials, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2283-2307 (2012).
- [66] Y. Lu, B. R. Goldsmith, N. J. Kybert, A. T. C. Johnson, DNA-decorated graphene chemical sensors, *Appl. Phys. Lett.*, 97, 083107 (2010).
- [67] D. R. Kauffman, A. Star, Graphene versus carbon nanotubes for chemical sensor and fuel cell applications, *Analyst*, 135, 2790–2797 (2010).
- [68] E. C. Nallon, V. P. Schnee, C. Bright, M. P. Polcha, and Q. Li, Chemical discrimination with an unmodified graphene chemical sensor, *ACS Sensors*, 1, 26–31 (2016).
- [69] L. Zhu, L. Luo, Z. Wang, DNA electrochemical biosensor based on thionine-graphene nanocomposite, *Biosens. Bioelectron.*, 35, 507–511 (2012).
- [70] E. Llobet, Gas sensors using carbon nanomaterials: A review, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 179, 32–45 (2013).
- [71] J. E. Pearson, A. Gill, P. Vadgama, Analytical aspects of biosensors, *Ann. Clin. Biochem.*, 37, 119–145 (2000).
- [72] M. P. Marco, S. Gee, B. D. Hammock, Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors, *Trends Anal. Chem.*, 14, 341–350 (1995).
- [73] M. Pospíšilová, G. Kuncová, and J. Trögl, Fiber-optic chemical sensors and fiber-optic bio-sensors, *Sensors*, 15, 25208–25259 (2015).
- [74] W. Lukosz, Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 6, 215–225 (1991).
- [75] L. B. Liu, M. A. Saltman, Immunosensor technology: Historical perspective and future outlook, *Laboratory Medicine*, 27, 109–115 (1996).
- [76] A. Mujahid, P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert, Chemical sensors based on molecularly imprinted sol-gel materials, *Materials*, 3, 2196–2217 (2010).
- [77] L. E. Kreno, K. Leong, O. K. Farha, M. Allendorf, R. P. Van Duyne, J. T. Hupp, Metal-organic framework materials as chemical sensors, *Chem. Rev.*, 112, 1105–1125 (2012).
- [78] E. Comini, C. Baratto, I. Concina, G. Faglia, M. Falasconi, M. Ferroni, V. Galstyan, E. Gobbi, A. Ponzoni, A. Vomiero, D. Zappa, V. Sberveglieri, G. Sberveglieri, Metal oxide nanoscience and nanotechnology for chemical sensors, *Sensors Actuators, B Chem.*, 179, 3–20 (2013).
- [79] F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 15, 296–304 (1996).
- [80] D. E. Tallman, S. L. Petersen, Composite electrodes for electroanalysis: Principles and applications, *Electroanalysis*, 2, 499–510 (1990).
- [81] F. Céspedes Mulero, Tesis doctoral, *Univ. Autònoma Barcelona*, 1993.

- [82] R. N. Adams, Carbon Paste Electrodes, *Anal. Chem.*, 30, 1576–1576 (1958).
- [83] M. A. Gilmartin, J. P. Hart, Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes. A review, *Analyst*, 120, 1029–1045 (1995).
- [84] M. Jurkiewicz, S. Solé, J. Almirall, M. García, S. Alegret, E. Martínez-Fàbregas, Validation of an automatic urea analyser used in the continuous monitoring of hemodialysis parameters, *Analyst*, 121, 959–963 (1996).
- [85] S. Alegret, Rigid carbon - Polymer biocomposites for electrochemical sensing - A review, *Analyst*, 121, 1751–1758 (1996).
- [86] K. B. Oldham, Edge effects in semiinfinite diffusion, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 122, 1–17 (1981).
- [87] C. H. A. Esteves, B. A. Iglesias, R. W. C. Li, T. Ogawa, K. Araki, J. Gruber, New composite porphyrin-conductive polymer gas sensors for application in electronic noses, *Sensors Actuators, B Chem.*, 193, 136–141 (2014).
- [88] W. Hu, X. Niu, R. Zhao, Q. Pei, Elastomeric transparent capacitive sensors based on an interpenetrating composite of silver nanowires and polyurethane, *Appl. Phys. Lett.*, 102, 083303 (2013).
- [89] S. J. Leigh, R. J. Bradley, C. P. Purcell, D. R. Billson, D. A. Hutchins, A simple, low-cost conductive composite material for 3D printing of electronic sensors, *PLoS One*, 7(11), (2012).
- [90] G. Rajan, M. Ramakrishnan, P. Lesiak, Y. Semenova, T. Wolinski, A. Boczkowska, G. Farrell, Composite materials with embedded photonic crystal fiber interferometric sensors, *Sensors Actuators, A Phys.*, 182, 57–67 (2012).
- [91] P.-G. Su, L.-N. Huang, Humidity sensors based on TiO<sub>2</sub> nanoparticles/polypyrrole composite thin films, *Sensors Actuators B Chem.*, 123, 501–507 (2007).
- [92] J. Wang, M. Musameh, Carbon nanotube/Teflon composite electrochemical sensors and biosensors, *Anal. Chem.*, 75, 2075–2079 (2003).
- [93] X. Yang, L. Li, F. Yan, Polypyrrole/silver composite nanotubes for gas sensors, *Sensors Actuators, B Chem.*, 145, 495–500 (2010).
- [94] G. R. Ruschau, R. E. Newnham, J. Runt, B. E. Smith, 0–3 ceramic/polymer composite chemical sensors, *Sensors and Actuators*, 20, 269–275 (1989).
- [95] S. Shrivastava, N. Jadon, R. Jain, Next-generation polymer nanocomposite-based electrochemical sensors and biosensors: A review, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 55–67 (2016).
- [96] P. K. Kalambate, A. K. Srivastava, Simultaneous voltammetric determination of paracetamol, cetirizine and phenylephrine using a multiwalled carbon nanotube-platinum nanoparticles nanocomposite modified carbon paste electrode, *Sensors Actuators, B Chem.*, 233, 237–248 (2016).
- [97] P. K. Kalambate, C. R. Rawool, A. K. Srivastava, Voltammetric determination of pyrazinamide at graphene-zinc oxide nanocomposite modified carbon paste electrode employing differential pulse voltammetry, *Sensors Actuators, B Chem.*,



- 237, 196–205 (2016).
- [98] M. Brun, J. F. Chateaux, A. L. Deman, P. Pittet, R. Ferrigno, Nanocomposite carbon-PDMS material for chip-based electrochemical detection, *Electroanalysis*, 23, 321–324 (2011).
- [99] K. E. Creasy, B. R. Shaw, Polishable modified carbon fiber composite electrodes containing copolymers of vinylferrocene or vinylpyridine in a cross-linked polystyrene matrix, *Anal. Chem.*, 61, 1460–1465 (1989).
- [100] C.-L. Wang, K. E. Creasy, B. R. Shaw, Ring-modified carbon fiber microelectrodes and multi-microelectrode devices, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 300, 365–375 (1991).
- [101] B. R. Shaw, K. E. Creasy, Polishable modified electrodes made from cross-linked electroactive composites containing particulate carbon, *Anal. Chem.*, 60, 1241–1244 (1988).
- [102] M. Briones, E. Casero, L. Vázquez, F. Pariente, E. Lorenzo, M. D. Petit-Domínguez, Diamond nanoparticles as a way to improve electron transfer in sol-gel l-lactate biosensing platforms, *Analytica Chimica Acta*, 908, 141-149 (2016).
- [103] A. W. Bott, Mass Transport, *Curr. Sep.*, 14, 104–109 (1996).
- [104] M. Álvarez-Icaza, U. Bilitewski, Mass production of biosensors, *Anal. Chem.*, 65, 525A–533A (1993).
- [105] J. Albery, *Electrode Kinetics*, Oxford Univ. Press: Oxford, 1975.
- [106] M. I. Pividori, Tesis doctoral, *Univ. Autònoma Barcelona*, 2002.
- [107] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction, *Biosens. Bioelectron.*, 15, 273–282 (2000).
- [108] N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Antimony- based electrodes for analytical determinations, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 77, 203–213 (2016).
- [109] A. W. Bott, Electrochemical techniques for the characterization of redox polymers,” *Curr. Sep.*, 19, 71–75 (2001).
- [110] P. Pingarrón, J.M. Sánchez, *Química Electroanalítica. Fundamentos y Aplicaciones*, Ed. Síntesis: Madrid, 2003.
- [111] J. Wang, *Analytical Electrochemistry 2d Ed*, Wiley VCH: New York, 2001.
- [112] J. W. Gardner, P. N. Bartlett, A brief history of electronic noses, *Sensors Actuators B*, 18, 210–211 (1994).
- [113] K. Persaud, G. Dodd, Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose, *Nature*, 299, 352–355 (1982).
- [114] Y. Vlasov, A. Legin, Non-selective chemical sensors in analytical chemistry: from ‘electronic nose’ to ‘electronic tongue’, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 361, 255–260 (1998).
- [115] Y. G. Vlasov, A. V. Legin, A. M. Rudnitskaya, A. D’Amico, C. Di Natale, ‘Electronic

- tongue' - new analytical tool for liquid analysis on the basis of non-specific sensors and methods of pattern recognition, *Sensors Actuators, B Chem.*, 65, 235–236 (2000).
- [116] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'Amico, Nonspecific sensor arrays ('electronic tongue') for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 77, 1965–1983 (2005).
- [117] A. R. Newman, Electronic noses, *Anal. Chem.*, 63, 585A–588A (1991).
- [118] J. W. Gardner., P. N. Bartlett, Electronic Noses. Principles and Applications, *Meas. Sci. Technol.*, 11, 1087–1087 (2000).
- [119] L. F. Váldez, J. M. Gutiérrez, Chocolate Classification by an Electronic Nose with Pressure Controlled Generated Stimulation, *Sensors*, 16, 1745-1757 (2016).
- [120] K. Toko, Electronic tongue, *Biosens. Bioelectron.*, 13, 701–709 (1998).
- [121] K. Toko, Taste sensor with global selectivity, *Materials Science and Engineering C*, 4, 69–82 (1996).
- [122] S. Buratti, D. Ballabio, S. Benedetti, M. S. Cosio, Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models, *Food Chem.*, 100, 211–218 (2007).
- [123] C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, A. D'Amico, A. Legin, L. Lvova, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, Electronic nose and electronic tongue integration for improved classification of clinical and food samples, *Sensors Actuators B Chem.*, 64, 15–21 (2000).
- [124] J. C. Seiter, M. D. DeGrandpre, Redundant chemical sensors for calibration-impossible applications, *Talanta*, 54, 99–106 (2001).
- [125] N. Mastrogiannis, B. Boutsinas, I. Giannikos, A method for improving the accuracy of data mining classification algorithms, *Comput. Oper. Res.*, 36, 2829–2839 (2009).
- [126] P. K. Hopke, The evolution of chemometrics, *Anal. Chim. Acta*, 500, 365–377 (2003).
- [127] R. M. de Carvalho, C. Mello, L. T. Kubota, Simultaneous determination of phenol isomers in binary mixtures by differential pulse voltammetry using carbon fibre electrode and neural network with pruning as a multivariate calibration tool, *Anal. Chim. Acta.*, 420, 109–121 (2000).
- [128] M. Cortina, A. Duran, S. Alegret, M. del Valle, A sequential injection electronic tongue employing the transient response from potentiometric sensors for anion multidetermination, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385, 1186–1194 (2006).
- [129] J. Simons, M. Bos, W. E. van der Linden, Data processing for amperometric signals, *Analyst*, 120, 1009–1012 (1995).
- [130] P. J. Gemperline, Rugged spectroscopic calibration for process control, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 39, 29–40 (1997).

- [131] L. Moreno Barón, R. Cartas, A. Merkoçi, S. Alegret, J. M. Gutiérrez, L. Leija, P. R. Hernández, R. Muñoz, M. del Valle, Data compression for a voltammetric electronic tongue modelled with artificial neural networks, *Anal. Lett.*, 38, 2189–2206 (2005).
- [132] Y. Meyer, *Wavelets: Algorithms and Applications*, Soc. Ind. Appl. Math. Philadelphia, PA: SIAM Press, 1993.
- [133] H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality, An Introduction*, Wiley: Chichester, 2000.
- [134] J. Garson, *Connectionism*, In: Zalta EN, Stanford Encycl. Philos., 2007.
- [135] M. Hassoun, *Fundamentals of artificial neural networks*, The MIT Press: Cambridge, 1995.
- [136] R. Beale, T. Jackson, *Neural computing, an introduction*, IOP Publ. Ltd., Bristol, 1992.
- [137] T. L. Fine, *Feedforward neural network methodology*, Springer Verlag, New York, 1999.
- [138] A. Mimendia, J. M. Gutiérrez, L. Leija, P. R. Hernández, L. Favari, R. Muñoz, M. del Valle, A review of the use of the potentiometric electronic tongue in the monitoring of environmental systems, *Environ. Model. Softw.*, 25, 1023–1030 (2010).
- [139] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis, *Talanta*, 66, 1303–1309 (2005).
- [140] A. Gutiérrez, D. Calvo, F. Céspedes, M. del Valle, Automatic sequential injection analysis electronic tongue with integrated reference electrode for the determination of ascorbic acid, uric acid and paracetamol, *Microchim. Acta*, 157, 1–6 (2007).
- [141] X. Cetó, M. Gutiérrez-Capitán, D. Calvo, M. del Valle, Beer classification by means of a potentiometric electronic tongue, *Food Chem.*, 141, 2533–2540 (2013).
- [142] X. Cetó, F. Céspedes, M. del Valle, BioElectronic Tongue for the quantification of total polyphenol content in wine, *Talanta*, 99, 544–551 (2012).
- [143] J. M. Gutiérrez, L. Moreno-Barón, X. Cetó, A. Mimendia, M. del Valle, *Data fusion in electronic tongue for qualitative analysis of beers*, in Proceedings of the 2012 4th World Congress on Nature and Biologically Inspired Computing, NaBIC 2012, 59–65, 2012.
- [144] J. Gallardo, S. Alegret, M. A. de Román, R. Muñoz, P. R. Hernández, L. Leija, M. del Valle, Determination of ammonium ion employing an electronic tongue based on potentiometric sensors, *Anal. Lett.*, 36, 2893–2908 (2003).
- [145] A. Gutiérrez, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle, Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1668–1673 (2005).
- [146] X. Cetó, J. M. Gutiérrez, M. Gutiérrez, F. Céspedes, J. Capdevila, S. Mínguez, C. Jiménez-Jorquera, M. el Valle, Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue, *Anal. Chim. Acta*, 732, 172–179 (2012).

- [147] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, M. A. Alonso-Lomillo, F. J. Muñoz-Pascual, M. del Valle, EIS multianalyte sensing with an automated SIA system-An electronic tongue employing the impedimetric signal, *Talanta*, 72, 774–779 (2007).
- [148] F. Despagne, D. L. Massart, Neural networks in multivariate calibration, *Analyst*, 123, 157R–178R (1998).
- [149] M. Abbasi Tarighat, Orthogonal projection approach and continuous wavelet transform-feed forward neural networks for simultaneous spectrophotometric determination of some heavy metals in diet samples, *Food Chem.*, 192, 548–556 (2016).
- [150] M. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle, “Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples,” *Biosens. Bioelectron.*, 22, 2171–2178 (2007).
- [151] D. Wilson, J. M. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle, Simultaneous determination of Zn(II), Cu(II), Cd(II) and Pb(II) in soil samples employing an array of potentiometric sensors and an Artificial Neural Network model, *Electroanalysis*, 24, 2249–2256 (2012).
- [152] X. Cetó, J. Capdevila, S. Mínguez, M. del Valle, “Voltammetric BioElectronic Tongue for the analysis of phenolic compounds in rosé cava wines,” *Food Res. Int.*, 55, 455–461 (2014).
- [153] T. H. Abraham, (Physio)logical circuits: The intellectual origins of the Mcculloch-Pitts neural networks, *Journal of the History of the Behavioral Sciences*, 38, 3–25 (2002).
- [154] M. T. Hagan, H. B. Demuth, and M. H. Beale, *Neural network design*, Bost. Massachusetts PWS, 2, 734, 1996.
- [155] M. A. Arbib, *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*, The MIT Press, 2003.
- [156] I. Aleksander, H. Morton, *An introduction to neural computing*, Chapman Hall, 1990.
- [157] C. M. Bishop, *Neural Networks for Pattern Recognition*, Oxford University Press, 1995.
- [158] J. Hertz, A. Krogh, R. G. Palmer, *Introduction to the Theory of Neural Computation*, Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc. Boston, MA, USA, 1991.
- [159] A. K. Deisingh, D. C. Stone, M. Thompson, Applications of electronic noses and tongues in food analysis, *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 587–604 (2004).
- [160] J. A. Freeman, D. M. Skapura, *Neural networks: algorithms, applications, and programming techniques*, Addison-Wesley Publishing Company, 1991.
- [161] S. Haykin, *Neural networks, a comprehensive foundation*, Prentice Hall, Up. Saddle River, 1999.
- [162] S. S. Iyengar, E. C. Cho, V. V. Phoha, *Foundations of wavelet neural networks and applications*, Chapman Hall/CRC, Boca Raton, FL, 2002.

- [163] D. O. Hebb, In: Anderson A., *Neurocomputing, foundations of research*, MIT Press. Cambridge, MA, 1949.
- [164] L. Fausett, *Fundamentals of Neural Networks. Architectures, algorithms and applications*, Pearson Educ., 2006.
- [165] V. J. Zupan, J. Gasteiger., *Neural networks for chemists. An introduction*, VCH Verlagsgesellschaft, 1993.
- [166] C. M. Bishop, *Pattern Recognition and Machine Learning*, Springer, 2006.
- [167] R. Rojas, *Neural networks: a systematic introduction*, Springer, 1996.
- [168] C. D. Doan and S.-Y. Liong, Generalization for Multilayer Neural Network Bayesian Regularization or Early Stopping, *Network*, 119260, 1–8 (2004).
- [169] A. G. Vitushkin, G. M. Khenkin, Linear Superposition of Functions, *Russ. Math. Surv.*, 22, 77–125 (1967).
- [170] P. S. Addison, *The Illustrated Wavelet Transform Handbook*, Inst. Physics, Bristol UK, 2002.
- [171] C. K. Chui, *An introduction to Wavelets*, Acad. Press. San Diego, CA, 1992.
- [172] C. Blatter, *Wavelets: A primer*, AK Peters Ltd, Natick MA, 1998.
- [173] G. Bachman, L. Narici, E. Beckenstein, *Fourier and Wavelet Analysis*, Springer, 2000.
- [174] S. Mallat, *A Wavelet Tour of Signal Processing*, 3rd Ed., Academic Press Elsevier Inc. 2009.
- [175] G. Kaiser, L. H. Hudgins, A Friendly Guide to Wavelets, *Phys. Today*, 48, 57–58 (1995).
- [176] A. Gutiérrez, F. Céspedes, R. Cartas, S. Alegret, M. del Valle, J. M. Gutiérrez, R. Muñoz, Multivariate calibration model from overlapping voltammetric signals employing wavelet neural networks, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 83, 169–179 (2006).
- [177] R. M. Rao, A. S. Bopardikar, *Wavelet Transforms. Introduction to Theory and Applications*, Addison-Wesley, 1998.
- [178] M. Misiti, Y. Misiti, G. Oppenheim, J.-M. Poggi *Wavelets and Their Applications*, ISTE, 2007.
- [179] B. Walczak, *Wavelets in Chemistry*, Elsevier, 2000.
- [180] T. K. Sarkar, C. Su, A Tutorial on Wavelets from an Electrical Engineering Perspective, Part 2: The Continuous Case, *IEEE Antennas Propag. Mag.*, 40, 36–49 (1998).
- [181] L. Debnath, *Wavelet Transforms and Their Applications*, Birkhäuser Bost., 2002.
- [182] S. G. Mallat, A Theory for Multiresolution Signal Decomposition: The Wavelet Representation, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 11, 674–693 (1989).
- [183] G. Jacques, J. L. Frymiare, J. Kounios, C. Clark, R. Polikar, Multiresolution wavelet

- analysis and ensemble of classifiers for early diagnosis of Alzheimer's disease, *Proc. IEEE Int. Conf. Acoust. Speech, Signal Proc.*, 5, 389, 2005.
- [184] X. G. Shao, A. K. Leung, F. T. Chau, "Wavelet: A new trend in chemistry," *Acc. Chem. Res.*, 36, 276–283 (2003).
- [185] A. N. Akansu, Wavelets and filter banks, *IEEE Circuits Devices Mag.*, 10, 14–18 (1994).
- [186] Q. Zhang, A. Benveniste, Wavelet Networks, *IEEE Trans. Neural. Netw.*, 3, 889–898 (1992).
- [187] J. M. Gutiérrez Salgado, Tesis doctoral, *Cent. Investig. y Estud. Av. del Inst. Politécnico Nac. (CINVESTAV, México)*, 2008.
- [188] K. Hornik, M. Stinchcombe, H. White, Multilayer feedforward networks are universal approximators, *Neural. Netw.*, 2, 359–366 (1989).
- [189] F. Scarselli, A. Chung Tsoi, Universal approximation using feedforward neural networks: A survey of some existing methods, and some new results, *Neural Networks*, 11, 15–37 (1998).
- [190] M. Shoaib, A. Y. Shamseldin, B. W. Melville, M. M. Khan, A comparison between wavelet based static and dynamic neural network approaches for runoff prediction, *J. Hydrol.*, 535, 211–225 (2016).
- [191] J. Adamowski, H. F. Chan, A wavelet neural network conjunction model for groundwater level forecasting, *J. Hydrol.*, 407, 28–40 (2011).
- [192] F. Winqvist, R. Bjorklund, C. Krantz-Rülcker, I. Lundström, K. Östergren, T. Skoglund, An electronic tongue in the dairy industry, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 111–112, 299–304 (2005).
- [193] M. Shoaib, A. Y. Shamseldin, B. W. Melville, Comparative study of different wavelet based neural network models for rainfall-runoff modeling, *J. Hydrol.*, 515, 47–58 (2014).
- [194] A. V. Legin, Y. G. Vlasov, A. M. Rudnitskaya, E. A. Bychkov, Cross-sensitivity of chalcogenide glass sensors in solutions of heavy metal ions, *Sensors Actuators B Chem.*, 34, 456–461 (1996).
- [195] C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winqvist, and I. Lundström, "Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: A review," in *Analytica Chimica Acta*, 2001, vol. 426, no. 2, pp. 217–226.
- [196] C. Di Natale, A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, A. Legin, Y. Vlasov, A. Rudnitskaya, B. Selezenev, Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue, *Sensors Actuators B Chem.*, 44, 423–428 (1997).
- [197] J. Zhao, B. Chen, J. Shen, Multidimensional non-orthogonal wavelet-sigmoid basis function neural network for dynamic process fault diagnosis, *Computers and Chemical Engineering*, 23, 83–92 (1998).
- [198] M. Gutiérrez, J. M. Gutiérrez, S. Alegret, L. Leija, P. R. Hernández, L. Favari, R. Muñoz, M. del Valle, Remote environmental monitoring employing a potentiometric

- electronic tongue, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 88, 103–117 (2008).
- [199] B. Doucoure, K. Agbossou, A. Cardenas, Time series prediction using artificial wavelet neural network and multi-resolution analysis: Application to wind speed data, *Renew. Energy*, 92, 202–211 (2016).
- [200] X. Zhang, J. Qi, R. Zhang, M. Liu, Z. Hu, H. Xue, B. Fan, Prediction of programmed-temperature retention values of naphthas by wavelet neural networks, *Comput. Chem.*, 25, 125–133 (2001).
- [201] H. Zhong, J. Zhang, M. Gao, J. Zheng, G. Li, L. Chen, The discrete wavelet neural network and its application in oscillographic chronopotentiometric determination, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 59, 67–74 (2001).
- [202] Q.-X. Guo, L. Liu, W.-S. Cai, Y. Jiang, Y.-C. Liu, Driving force prediction for inclusion complexation of  $\alpha$ -cyclodextrin with benzene derivates by a wavelet neural network, *Chem. Phys. Lett.*, 290, 514–518 (1998).
- [203] R. Tabaraki, T. Khayamian, A. A. Ensafi, Wavelet neural network modeling in QSPR for prediction of solubility of 25 anthraquinone dyes at different temperatures and pressures in supercritical carbon dioxide, *J. Mol. Graph. Model.*, 25, 46–54 (2006).
- [204] Z. Garkani-Nejad, H. Rashidi-Nodeh, Comparison of conventional artificial neural network and wavelet neural network in modeling the half-wave potential of aldehydes and ketones, *Electrochim. Acta*, 55, 2597–2605 (2010).
- [205] R. M. Balabin, R. Z. Safieva, E. I. Lomakina, Wavelet neural network (WNN) approach for calibration model building based on gasoline near infrared (NIR) spectra, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 93, 58–62 (2008).
- [206] K. Zarei, M. Atabati, Principal component-Wavelet neural network as a multivariate calibration method for simultaneous determination of iron, nickel, and cobalt, *Anal. Lett.*, 39, 2085–2094 (2006).
- [207] A. A. Ensafi, T. Khayamian, R. Tabaraki, Simultaneous kinetic determination of thiocyanate and sulphide using eigenvalue ranking and correlation ranking in principal-component wavelet neural network, *Talanta*, 71, 2021–2028 (2007).
- [208] J. M. Gutiérrez, A. Gutiérrez, F. Céspedes, M. del Valle, R. Muñoz, Wavelet neural networks to resolve the overlapping signal in the voltammetric determination of phenolic compounds, *Talanta*, 76, 373–381 (2008).
- [209] K. Zarei, M. Atabati, M. Ebrahimi, Quantitative structure-property relationship study of the solvent polarity using wavelet neural networks, *Anal. Sci.*, 23, 937–942 (2007).
- [210] T. Khayamian, M. Esteki, Prediction of solubility for polycyclic aromatic hydrocarbons in supercritical carbon dioxide using wavelet neural networks in quantitative structure property relationship, *J. Supercrit. Fluids*, 32, 73–78 (2004).
- [211] M. M. Bello, M. M. Nourouzi, L. C. Abdullah, T. S. Choong, Y. S. Koay, S. Keshani, POME is treated for removal of color from biologically treated POME in fixed bed column: Applying wavelet neural network (WNN), *J. Hazard. Mater.*, 262, 106–113

- (2013).
- [212] A. Shirmardi, M. Shamsipur, M. Akhond, J. Monjezi, Electronic tongue for simultaneous determination of cyanide, thiocyanate and iodide, *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, 88, 27–33 (2016).
  - [213] G. G. Walter, Y. Miao, Wavelet neural networks for function learning, *IEEE Trans. Signal Process.*, 43, 1485–1497 (1995).
  - [214] M. Cannon, J.-J. E. Slotine, Space-frequency localized basis function networks for nonlinear system estimation and control, *NEUROCOMPUTING Neurocomputing Neurocomputing*, 9, 293–342 (1995).
  - [215] Juan Manuel Gutiérrez, Roberto Muñoz, Manel del Valle, *Wavelet neural networks - Innovative Processing Strategy for Classification and Quantification Models*, Manel del Valle, Roberto Muñoz, Juan Manuel Gutiérrez Salgado (Eds.), Nov. Sci. Publ. Inc., vol. Chapter 10, 2012.
  - [216] M. Holmberg, M. Eriksson, C. Krantz-Rülcker, T. Artursson, F. Winqvist, A. Lloyd-Spetz, I. Lundström, 2nd workshop of the Second Network on Artificial Olfactory Sensing (NOSE II), *Sensors and Actuators, B: Chem.*, 101, 213–223 (2004).
  - [217] J. Gallardo, S. Alegert, M. del Valle, A flow-injection electronic tongue based on potentiometric sensors for the determination of nitrate in the presence of chloride, *Sensors Actuators, B Chem.*, 101, 72–80 (2004).
  - [218] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions, *Sensors Actuators B Chem.*, 44, 532–537 (1997).
  - [219] L. Lvova, E. Martinelli, E. Mazzone, A. Pede, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico, Electronic tongue based on an array of metallic potentiometric sensors, *Talanta*, 70, 833–839 (2006).
  - [220] M. Cortina, A. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle, Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part 2. Potentiometric e-tongue for the determination of alkaline ions, *Talanta*, 66, 1197–1206 (2005).
  - [221] A. Gutiérrez, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle, Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part 1. Voltammetric e-tongue for the determination of oxidizable compounds, *Talanta*, 66, 1187–1196 (2005).
  - [222] G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, A. Ahluwalia, A composite sensor array impedentiometric electronic tongue. Part I. Characterization, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 2618–2623 (2007).
  - [223] G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, R. Leardi, A. Ahluwalia, A composite sensor array impedentiometric electronic tongue. Part II. Discrimination of basic tastes, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 2624–2628 (2007).
  - [224] G. Sehra, M. Cole, J. W. Gardner, Miniature taste sensing system based on dual SH-SAW sensor device: An electronic tongue, *Sensors and Actuators, B: Chem.*, 103, 233–239 (2004).



- [225] J. J. Lavigne, S. Savoy, M. B. Clevenger, J. E. Ritchie, B. McDoniel, S.-J. Yoo, E. V. Anslyn, J. T. McDevitt, J. B. Shear, D. Niekirk, Simultaneous Analysis of Multiple Analytes by a Sensor Array in Solution. Toward the Development of an 'Electronic Tongue', *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 6429–6430 (1998).
- [226] J. M. Gutiérrez, L. Moreno-Barón, M. I. Pividori, S. Alegret, M. del Valle, A voltammetric electronic tongue made of modified epoxy-graphite electrodes for the qualitative analysis of wine, *Microchim. Acta*, 169, 261–268 (2010).
- [227] X. Cetó, J. M. Gutiérrez, L. Moreno-Barón, S. Alegret, M. del Valle, Voltammetric electronic tongue in the analysis of cava wines, *Electroanalysis*, 23, 72–78 (2011).
- [228] X. Cetó, J. M. Gutiérrez, A. Mimendia, F. Céspedes, M. del Valle, Voltammetric Electronic Tongue for qualitative analysis of beers, *Electroanalysis*, 25, 1635–1644 (2013).
- [229] 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*, 14, 17770–17785 (2014).
- [230] Z. Wei, J. Wang, Tracing floral and geographical origins of honeys by potentiometric and voltammetric electronic tongue, *Comput. Electron. Agric.*, 108, 112–122 (2014).
- [231] A. Kutyła-Olesiuk, M. Nowacka, M. Wesoły, P. Ciosek, Evaluation of organoleptic and texture properties of dried apples by hybrid electronic tongue, *Sensors Actuators, B Chem.*, 187, 234–240 (2013).
- [232] H. Chan, a Butler, D. M. Falck, M. S. Freund, Artificial neural network processing of stripping analysis responses for identifying and quantifying heavy metals in the presence of intermetallic compound formation, *Anal. Chem.*, 69, 2373–2378 (1997).
- [233] K. Z. Brainina, A. M. Bond, Characterization of thick-layer graphite disposable voltammetric electrodes, *Anal. Chem.*, 67, 2586–2591 (1995).
- [234] M. Santandreu, F. Céspedes, S. Alegret, E. Martínez-Fàbregas, Amperometric immunosensors based on rigid conducting immunocomposites, *Anal. Chem.*, 69, 2080–2085 (1997).
- [235] S. Alegret, E. Fàbregas, F. Céspedes, A. Merkoçi, S. Solé, M. Albareda, M. I. Pividori, The strategy of renewing biosensor surface: past, present and future. A review, *Química Anal.*, 18, 23–29 (1999).
- [236] F. Céspedes, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing II. Rigid carbon-polymer biocomposites, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 19, 276–285 (2000).
- [237] S. Ramírez-García, F. Céspedes, S. Alegret, Development of conducting composite materials for electrochemical sensing in organic media, *Electroanalysis*, 13, 529–535 (2001).
- [238] S. Ramírez-García, S. Alegret, F. Céspedes, R. J. Forster, Carbon composite electrodes: surface and electrochemical properties., *Analyst*, 127, 1512–1519 (2002).

- [239] H. Fang, H.-Y. Chen, Wavelet analyses of electroanalytical chemistry responses and an adaptive wavelet filter, *Anal. Chim. Acta*, 346, 319–325 (1997).
- [240] R. Cartas, L. Moreno-Barón, A. Merkoçi, S. Alegret, M. del Valle, J. M. Gutiérrez, L. Leija, P. R. Hernández, R. Muñoz, Multivariate calibration model for a voltammetric electronic tongue based on a multiple output Wavelet Neural Network, *Stud. Comput. Intell.*, 188, 137–167 (2009).
- [241] H.-H. Frey, C. J. McNeil, R. W. Keay, J. V Bannister, Characterization of a Copper Detecting Amperometric Electrode, *Electroanalysis*, 10, 480–485 (1998).
- [242] A. Merkoçi, M. Vasjari, E. Fàbregas, S. Alegret, Determination of Pb and Cu by anodic stripping voltammetry using glassy carbon electrodes modified with mercury or mercury-nafion films, *Mikrochim. Acta*, 135, 29–33 (2000).
- [243] K. C. Honeychurch, J. P. Hart, D. C. Cowell, Voltammetric behavior and trace determination of lead at a mercury-free screen-printed carbon electrode, *Electroanalysis*, 12, 171–177 (2000).
- [244] R. R. Dalangin, H. Gunasingham, Mercury(II) acetate-Nafion modified electrode for anodic stripping voltammetry of lead and copper with flow-injection analysis, *Anal. Chim. Acta*, 291, 81–87 (1994).
- [245] S. Daniele, C. Bragato, M. A. Baldo, An approach to the calibrationless determination of copper and lead by anodic stripping voltammetry at thin mercury film microelectrodes. Application to well water and rain, *Anal. Chim. Acta*, 346, 145–156 (1997).
- [246] A. M. Bond, P. J. Mahon, J. Schiewe, V. Vicente-Beckett, An inexpensive and renewable pencil: Electrode for use in field-based stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, 345, 67–74 (1997).
- [247] Y.-H. Hahn, J.-Y. Yoo, Anodic stripping voltammetric determinations of zinc, cadmium, lead and copper in freshwater and sediment, *J. Korean. Chem. Soc.*, 41, 180–185 (1997).
- [248] J. Wang, L. D. Hutchins-Kumar, Cellulose acetate coated mercury film electrodes for anodic stripping voltammetry, *Anal. Chem.*, 58, 402–407 (1986).
- [249] H. Ge, H. Zhao, G. G. Wallace, Development of a polymer dispersed-mercury modified electrode, *Anal. Chim. Acta*, 238, 345–350 (1990).
- [250] I. Palchetti, C. Upjohn, A. P. F. Turner, M. Mascini, Disposable screen-printed electrodes (SPE) mercury-free for lead detection, *Anal. Lett.*, 33, 1231–1246 (2000).
- [251] K. Z. Brainina, A. V. Ivanova, N. A. Malakhova, Disposable thick film modified graphite electrodes for stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, 349, 85–91 (1997).
- [252] G. S. Reeder, W. R. Heineman, Electrochemical characterization of a microfabricated thick-film carbon sensor for trace determination of lead, *Sensors Actuators B Chem.*, 52, 58–64 (1998).
- [253] S. Nomura, K. Nozaki, S. Okazaki, Fundamental studies on fast scan stripping

- voltammetry with a microelectrode, *Electroanalysis*, 3, 617–624 (1991).
- [254] W. Wasiak, W. Ciszewska, A. Ciszewski, Hair analysis. Part 1: Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of lead, cadmium, zinc and copper in human hair samples of persons in permanent contact with a polluted workplace environment, *Anal. Chim. Acta*, 335, 201–207 (1996).
- [255] O. Bagel, G. Lager, H. H. Girault, D. Brack, U. Loyall, H. Schäfer, Mercury free determination of lead by differential pulse anodic stripping voltammetry onto silver-plated rotograved carbon electrodes, *Electroanalysis*, 13, 100–103 (2001).
- [256] K. Seo, S. Kim, J. Park, Modified composite electrode containing HgO as built-in mercury precursor for anodic stripping analysis of trace metals, *Anal. Chem.*, 70, 2936–2940 (1998).
- [257] N. F. Zakharchuk, S. Y. Saraeva, N. S. Borisova, Kh. Z. Brainina, Modified thick-film graphite electrodes: morphology and stripping voltammetry, *Electroanalysis*, 11, 614–622 (1999).
- [258] A. S. Baranski, Rapid anodic stripping analysis with ultramicroelectrodes, *Anal. Chem.*, 59, 662–666 (1987).
- [259] C. M. A. Brett, D. A. Fungaro, Poly(ester sulphonic acid) coated mercury thin film electrodes: Characterization and application in batch injection analysis stripping voltammetry of heavy metal ions, *Talanta*, 50, 1223–1231 (2000).
- [260] O. Bagel, E. L'Hostis, G. Lager, M. D. Osborne, B. J. Seddon, H. H. Girault, D. Brack, U. Loyall, H. Schäfer, Rotograved carbon electrodes for amperometric cadmium and lead determination, *J. Electroanal. Chem.*, 469, 189–195 (1999).
- [261] J.-Y. Choi, K. Seo, S.-R. Cho, J.-R. Oh, S.-H. Kahng, J. Park, Screen-printed anodic stripping voltammetric sensor containing HgO for heavy metal analysis, *Anal. Chim. Acta*, 443, 241–247 (2001).
- [262] P. R. M. Silva, M. A. El Khakani, M. Chaker, A. Dufresne, F. Courchesne, Simultaneous determination of Cd, Pb, and Cu metal trace concentrations in water certified samples and soil extracts by means of Hg-electroplated-Ir microelectrode array based sensors, *Sensors and Actuators, B: Chem.*, 76, 250–257 (2001).
- [263] J. F. van Staden, M. C. Matoetoe, Simultaneous determination of copper, lead, cadmium and zinc using differential pulse anodic stripping voltammetry in a flow system, *Anal. Chim. Acta*, 411, 201–207 (2000).
- [264] P. J. Barbeira, N. R. Stradiotto, Simultaneous determination of trace amounts of zinc, lead and copper in rum by anodic stripping voltammetry., *Talanta*, 44, 185–188 (1997).
- [265] J. C. Vidal Ibáñez, M. M. Fernández Lorente, J. R. Castillo Suárez, Uso de electrodos modificados de Nafion para la valoración voltamétrica y especificación de plomo en la sangre humana, *Química Analítica*, 17, 95–103 (1998).

## Capítulo VIII.

---

### 8. Anexos

- Artículo 1.** L. Moreno-Baron, A. Merkoçi, S. Alegret, Graphite-epoxy composite as an alternative material to design mercury free working electrodes for stripping voltammetry, *Electrochimica Acta* 48 (2003) 2599-2605.
- Artículo 2.** L. Moreno, A. Merkoçi, S. Alegret, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, Analysis of amino acids in complex samples by using voltammetry and multivariate calibration methods, *Analytica Chimica Acta* 507 (2004) 247–253.
- Artículo 3.** L. Moreno-Barón, R. Cartas, A. Merkoçi, S. Alegret, M. del Valle, L. Leija, P.R. Hernández, R. Muñoz, Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic tongue, *Sensors and Actuators B* 113 (2006) 487–499.
- Artículo 4.** J. M. Gutiérrez, L. Moreno-Barón, F. Céspedes, R. Muñoz, M. del Valle, Resolution of heavy metal mixtures from highly overlapped ASV voltammograms employing a wavelet neural network, *Electroanalysis* 21 (2009) 445–451.





PERGAMON

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Electrochimica Acta 48 (2003) 2599–2605

ELECTROCHIMICA  
*Acta*

[www.elsevier.com/locate/electacta](http://www.elsevier.com/locate/electacta)

# Graphite-epoxy composite as an alternative material to design mercury free working electrodes for stripping voltammetry

L. Moreno-Baron, A. Merkoçi\*, S. Alegret

*Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

Received 8 January 2003; received in revised form 7 March 2003; accepted 7 April 2003

## Abstract

The use of graphite-epoxy composite electrodes (GECE) as an alternative to mercury or modified electrodes for stripping voltammetry is presented. The effect of preconcentration time on the peak current was studied. It is shown, unlike traditional mercury electrodes, that the accumulation of lead using GECE does not yield a saturation current even at high preconcentration times of 30 min. A preconcentration time of 1 min was chosen as a compromise between analysis time and sensitivity. The peak current was increased by decreasing pH, the pH range 1–2 being the most sensitive. Concentrations as low as 1 ppb for lead and copper and 10 ppb for cadmium in standard solutions have been detected. Both analytical results and SEM characterisation confirm the behaviour of GECE as a complex microelectrode array at a rough surface.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Mercury-free electrode; Graphite-epoxy composite electrode; Anodic stripping voltammetry; Lead; Copper; Cadmium

## 1. Introduction

The performance of the stripping voltammetry is strongly affected by the working electrode material. An ideal working electrode should possess low ohmic resistance, chemical and electrochemical inertness over a broad range of potentials, high hydrogen and oxygen overvoltage resulting in a wide potential window, low residual current, ease of reproduction of the electrode surface, maximum versatility, low cost and no toxicity.

To date a range of materials have been used as working electrodes for detection of heavy metals, the most popular being mercury based electrodes. The usefulness of mercury electrodes for the determination of metal ions is due to their ability to form amalgams, allowing for preconcentration of the metal ions prior to their determination by voltammetric stripping methods. Another advantage of using mercury in working electrodes is associated with the high overpotential of hydrogen evolution on such electrodes [1]. The most

reported electrodes used for stripping voltammetry, have been: dropping mercury electrode (DME), hanging mercury drop electrode (HMDE) and mercury film electrode (MFE). MFE consists of a mercury film grown onto graphite-epoxy [2], carbon fibre [3], carbon fibre [3] ultramicrodisc [4], glassy carbon [5] or even pencil graphite [6].

The use of HMDE [7], the most popular choice, and MFE has allowed a sub-ppb determination of lead. However, these techniques require tedious experimental precautions regarding the stability and recovery of mercury drop after each experiment or careful manipulation of mercury solutions for film deposition.

It is the potential dangers that are associated with mercury which have led to the development of various electrodes where the manipulation of large quantities of the toxic mercury solution may be avoided. Diethyl-dithiocarbamate complex of mercury [8] or mercury mixed with nafion [9,10], or poly(estersulphonic acid) [11] have been used to modify carbon electrodes. A mercury film is created in-situ by reduction of mercury ions available in the modification layer. Even composite electrodes containing HgO [12], as a built-in mercury precursor which allows a mercury film formation, has been reported to avoid the use of mercury solution.

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-581-2118; fax: +34-93-581-2379.

E-mail address: [amerkoci@gsb.uab.es](mailto:amerkoci@gsb.uab.es) (A. Merkoçi).

In recent years, a growing interest in the use of mercury free electrodes has occurred.

A mercury-free voltammetric sensor for a hand-held instrument, for detection of copper, based on chemical accumulation of the trace metal onto the surface of glassy carbon electrode modified with tetraphenylporphyrin has been reported [13]. Similar efforts for mercury-free electrodes have resulted in the use of interesting modifiers such as PAN/Nafion [14] or *N-p*-chlorophenylcinnamohydroxamic acid [15]. Disposable screen-printed electrodes for lead determination based on carbon inks mixed with dithizone, Nafion or ionophore have been developed [16].

Unmodified electrodes like bare carbon, gold, or iridium have been used as possible alternative to mercury have been used also [17–20]. Bismuth-coated carbon electrodes represent another important alternative for anodic stripping voltammetry of heavy metals determination [21,22]. Gold electrodes from recordable CDs [23] have been another material studied for its possible use in stripping voltammetry. Lastly, a silver-plated rotograved carbon electrodes was also reported [24].

At the beginning of the 1990s, Wang [25] reported amperometric sensors based on rigid carbon-polymer composites [26]. The use of the rigid carbon-polymer materials has been an area of continuous research in our laboratories [27–31]. These new materials combined the good conducting properties of graphite with their ease of modification and of processing of plastics (epoxy, methacrylate, Teflon, etc.). They show attractive electrochemical, physical, mechanical and economical features compared to the classic conductors (gold, platinum, graphite, etc.).

This paper aim to report, for the first time, the use of graphite-epoxy composite electrodes (GECE) without surface modification for the differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) of lead and other heavy metals with analytical interest. The use of these types of electrodes is a simpler alternative to the use of mercury or other modified electrodes for analysis of trace levels of heavy metals.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared from analytical reagent grade chemicals. The lead, copper and cadmium stock solutions were prepared by dissolving the corresponding nitrates in buffer solution. Acetate buffer (0.1 M, pH 3.76) or HCl 0.1 M were used as supporting electrolytes. All water used for the preparation of solutions was doubly distilled.

### 2.2. Electrode fabrication

The GECE electrodes were prepared using graphite powder with a particle size of 50 mm (BDH, UK) and Epotek H77 (epoxy resin) and hardener (both from Epoxy Technology, USA). Graphite powder and epoxy resin, mixed with hardener, were hand-mixed in a ratio of 1:4 (w/w) as described in a previous work [32]. The resulting paste was placed into a PVC cylindrical sleeve body (6 mm i.d.), which has an inner electrical copper contact, to a depth of 3 mm. The conducting composite material glued to the copper contact was cured at 40 °C during a week. Before each use, the surface of the electrode was wet with doubly distilled water and then thoroughly smoothed, first with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion).

### 2.3. Instrumentation

A platinum auxiliary electrode (model 52-67 1, Crison, Spain) and double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as external reference solution and the GECE as working electrode were used. For surface characterisation comparison studies a glassy carbon electrode of 3 mm i.d. (BAS Bioanalytical System, USA, Model MF 2012) was used. DPASV experiments were performed using an Autolab PGSTAT 20 System (Eco-chemie, The Netherlands). A Scanning Electron Microscope (Hitachi S-570, Japan) was used to observe the working electrode surfaces.

### 2.4. Electrochemical procedures

According to literature on the determination of heavy metals the following experimental procedures (A and B) were carried out.

#### 2.4.1. Experimental procedure A

The DPASV proceeded in two steps. The first one was the accumulation step. In this step, the three electrodes—GECE as working electrode, the Ag/AgCl reference electrode and the platinum auxiliary electrode—were immersed in a stirred 25 ml of 0.1 M sodium acetate solution (pH 3.76). An accumulation potential ( $E_{acc}$ ) of  $-0.9$  V (vs. Ag/AgCl) was applied for a fixed interval time ( $\tau_{acc}$ ) ranging from 1–30 min. No conditioning step was applied. The second step was the stripping step. In this step the potential was changed within the range of  $-0.9$  to  $0.7$  V, using a potential step of  $0.00366$  V. Modulation time was  $0.07$  s and interval time of applied pulses was  $0.3$  s. During the stripping step the current is recorded in quiescent solution. To obtain a calibration curve a known quantity of heavy metal solution was added and the above accumulation and stripping procedures were applied, without the removal of the

electrodes. All experiments were carried out without removal of oxygen.

#### 2.4.2. Experimental procedure B

The general procedure was the same as experimental A, but with some modifications. In this case: an 0.1 M HCl was used as electrolyte medium. A conditioning potential of 1 V during 30 s was applied to clean the electrode from the previous deposited metals; after that the accumulation was performed at  $E_{acc}$ :  $-1.4$  V; Step potential: 0.0024 V; Modulation amplitude: 0.05 V; Modulation time: 0.05 s; Interval time: 0.2 s.

### 3. Results and discussion

The efficiency of GECE for determination of heavy metals using DPASV was characterised using similar studies of other electrodes which use this technique. These experiments include surface characterisation, pH effect, accumulation time, calibration curves and reproducibility.

#### 3.1. Surface characterisation

The surface of graphite-epoxy as well that of glassy carbon electrodes, for comparison purposes, was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). Fig. 1 shows these surfaces. As observed in these images, the surface of GECE, Fig. 1A appears to have clusters of material gathered in random areas. This is due to the graphite particles (average size  $< 50$  nm) randomly distributed and randomly oriented in the epoxy resin. The graphite-epoxy electrode surface appears to be relatively rough.

A SEM image of the glassy carbon electrode, for purposes of comparison, is also shown (Fig. 1B). This surface (in this image the PVC tube edge of the glassy carbon electrode is in the upper left hand corner) compared to the graphite-epoxy one is characterised by a smooth surface and the absence of any clusters.

The presence of clusters in the graphite epoxy electrode surface results in an increase in its active surface area compared to that of the glassy carbon electrode. The relatively high surface area, is one of the main characteristics of GECE.

The SEM images of GECE was similar with those shown in the case when a graphite-epoxy electrode was studied in stripping voltammetry with a mercury film [33]. GECE formed by graphite particles, randomly distributed and randomly oriented in the epoxy resin, can be seen as a macroelectrode formed by a great number of carbon microdisc or fibre microelectrodes. These microelectrodes are separated by an insulator and connected in parallel. The signal produced is the sum of the individual currents generated by each microelectrode. The end product is a sensor with a signal as strong as that of a macroelectrode but showing the signal-to-noise ratio of a microelectrode. This microelectrode array behaviour has been associated with the advantages of using GECEs for different biosensor designed in our laboratories [34].

#### 3.2. Effect of pH

One of the important factors that affects the DPASV of heavy metals is the pH of the medium. In our laboratories, it has been observed that the GECE, in contact for a long time with extreme pH values (higher than 10 or lower than 2), begins to deteriorate. Results of this pH study show a decrease in peak current (results

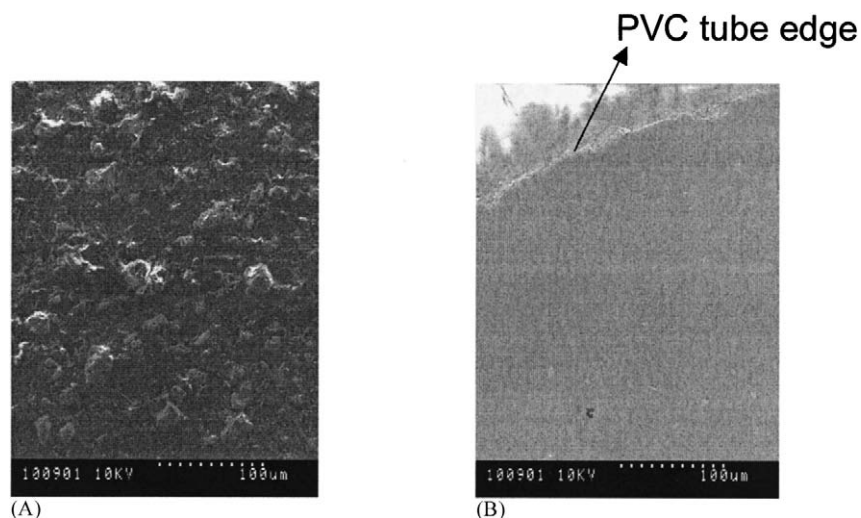


Fig. 1. SEM of the surface of the graphite epoxy electrode (A) and the glassy carbon electrode (B). Both electrode surfaces have been polished in the same way as explained in the text. The same accelerated voltage (10 kV) and resolution (100 nm) were used.



not presented here) as the pH increases, with no stripping peaks observed for a pH higher than 4. A pH of 3.76 (experimental procedure A) was chosen to prevent the composite corrosion.

The potential use of graphite-epoxy material for disposable working electrodes (screen printed electrodes), where the contact time of electrode with the working solution is relatively shorter, would permit work at even lower pH values and consequently improve detection limit. Since the working electrode surface can easily be renewed by a simple polishing, DPASV in 0.1 M HCl (experimental conditions B) was also considered as a working medium (experimental procedure B).

### 3.3. Accumulation time ( $\tau_{acc}$ )

To show the suitability of GECE as a working electrode in DPASV, the effect of  $\tau_{acc}$  on the DPASV sensitivity was studied. Calibration curves for lead,  $\tau_{acc}$  ranging from 2 to 30 min, in pH 3.76 medium are presented in Fig. 2a. The sensitivity, as expected, is increased when the  $\tau_{acc}$  is increased. For accumulation times lower than 5 min the lead signal does not grow with increasing concentration of lead showing poorer detection limits of lead in these conditions.

The effect of  $\tau_{acc}$  on the height of stripping peak was also studied for a 100 ppb lead solution in 0.1 M HCl. An almost linear increase of peak current with increasing  $\tau_{acc}$  can be seen (Fig. 2b). For both media it can be deduced that for an accurate and sensitive DPASV analysis it is essential that  $\tau_{acc}$  must be accurately controlled and preferably high.

As observed in Fig. 2 (a and b), for the  $\tau_{acc}$  range studied, the curves no presented saturation suggesting the possibility of using longer  $\tau_{acc}$  to enhance the sensitivity for determination of lead. In the case of surface modified (nafion or *N-p*-chlorophenylcinnamohydroxamic acid) electrodes, using DPASV mode, the plot of peak current ( $I_{strip}$ ) against  $\tau_{acc}$  was found to exhibit a saturation which could be associated with the surface coverage equilibrium [35]. The accumulation of Pb(II) without saturation at the GECE surface shows a clear advantage when compared with other modified electrodes involved in heavy metal determination. To reduce the experimental timescale a  $\tau_{acc}$  between 60 and 120 s were used for future experiments.

### 3.4. Calibration curves

Voltammograms for different lead concentrations (Fig. 3), in acetate buffer pH 3.76 and in the presence of 1.73 ppm copper (as the most reported lead accompanying element in real samples) were obtained for  $\tau_{acc}$  of 60 s. The increasing peaks a and b correspond to the lead and peaks c to copper. Corresponding lead calibration curve is presented in the inset figure. Each

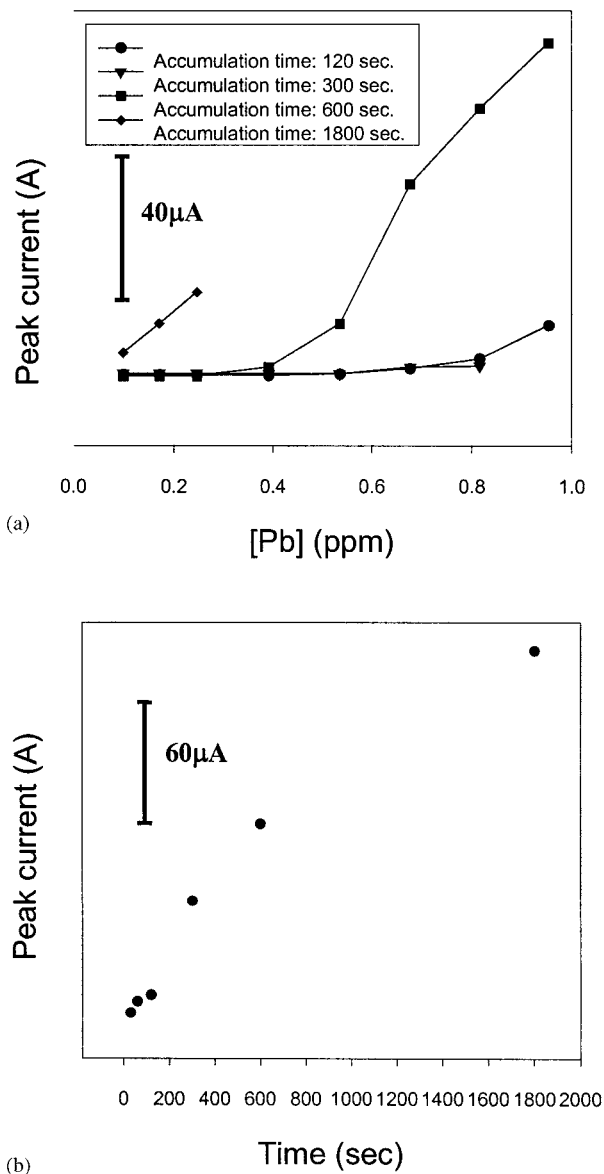


Fig. 2. Effect of accumulation time ( $\tau_{acc}$ ) on the lead peak variation using DPASV for a) 0.1 M acetate buffer pH 3.7, (experimental conditions A) and b) 100 ppb Pb in 0.1 M HCl (Experimental conditions B).

point in the calibration curve corresponds to the mean of three parallel measurements performed consecutively in the same cell without polishing the electrode. From the inset Fig. 3, can be seen that the linear response for lead is limited in concentrations between 2 and 4 ppm showing a limited useful application for this experimental conditions.

Fig. 4 shows the voltammograms (Fig. 4a) for a mixtures containing lead, copper and cadmium in a 0.1 M HCl. The corresponding calibration curves (Fig. 4b), stripping peak current vs. metal concentration, for the linear zone of response are also presented. Both the

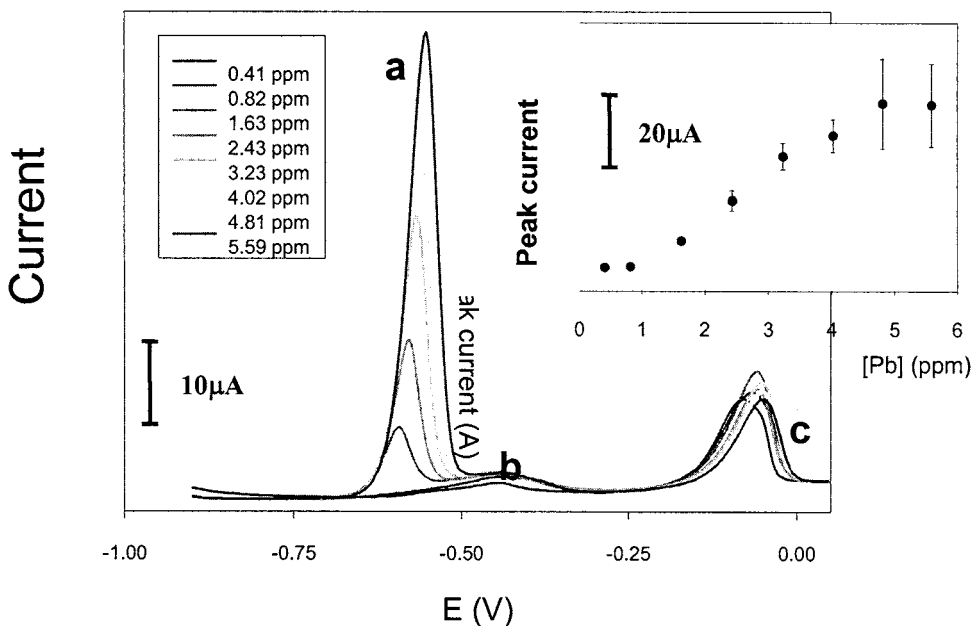


Fig. 3. DPASV of lead in a copper matrix (1.73 ppm) in 0.1 M acetate buffer pH 3.7, (experimental conditions A). The accumulation time was 60 s.

sensitivity, detection limit and linear range for lead were improved significantly for this more acidic solution.

This enhanced sensitivity (compared to the one shown in Fig. 3, pH 3.7) as explained in the case of higher pH experiments, can be attributed to the suppression of hydroxide formation in highly acidic media [36] although the hydrogen liberation should have caused the sharp decrease of the cadmium sensitivity. In Fig. 4a two peaks associated with Pb are observed, Pb(a) and Pb(b), as a result two calibration curves are constructed (see Fig. 4b). The same phenomena, but less visible, was observed in pH 3.7 (see Fig. 3, b peaks). The appearance of these two peaks for lead stripping, according to some authors [37], is related to lead deposition occurring in a competitive manner. The metal deposits onto favourable

active electrode sites as a monolayer. And, as the deposition proceeds, these sites are depleted and the process becomes competitive between metal deposition on unoccupied bare electrode sites or on already deposited metal. Formation of intermetallic compounds such as lead with cadmium or copper must also be considered as well as the competition phenomena.

At Fig. 4b are represented the calibration curves obtained for metal concentrations until 30 ppb. The higher concentrations did not fit the rectilinear dependence. From Fig. 4b it can be seen that the sensitivity (change of peak current per each unit of metal concentration change) for lead, both a and b forms, is higher than copper with cadmium being the lowest. For the same concentration the peak height associated with

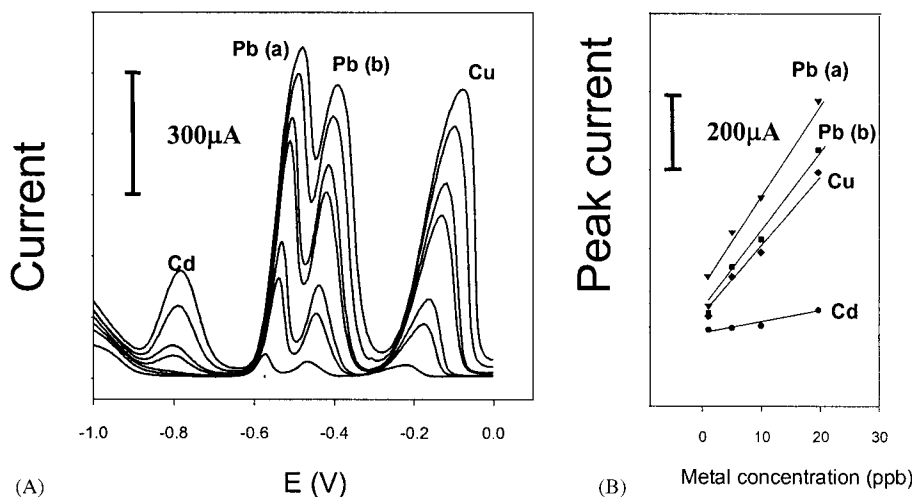


Fig. 4. DPASV of mixtures containing different concentrations of Pb, Cu and Cd in 0.1 M HCl (Experimental conditions B). The accumulation time was 120 s. The DPASV of the 0.1 M HCl only is represented by the dotted line.

lead and copper is 5–10 times greater respectively than that of cadmium. The lower detection limits (evaluated as the concentration corresponding to  $3\sigma$  of the DPASV blank signal) were 10 ppb for Cd and 1 ppb for both lead and copper. These detection levels, found for  $\tau_{acc}$  of 120 s, are comparable to some of the reported electrodes. From the results obtained it can be said that the heavy metal uptake of the GECE is comparable with that of electrode modified with mercury or mixed with other modifiers such as PPy [38], nafion, CPCHA etc. Cadmium and lead peaks are separated well suggesting that these heavy metals can be analysed in the presence of each other without causing interference. As observed in Fig. 4a, the copper peak does not mask the peak associated with lead while a copper interference causing a 60% decrease of lead signal was reported when the working electrodes were prepared by screen-printing of dithizone containing graphite ink.

The repeatability of measurements using GECE was studied also. It was observed (results not shown) that the unpolished GECEs give similar reproducible peaks compared to polished ones, the relative standard deviations (RSD) of the peak signal 21% ( $n=4$ ) and 24% ( $n=4$ ) respectively for a 100 ppb lead solution. The RSD values for GECE are relatively higher compared with those reported in other works where mercury film or modified glassy carbon electrodes have been used.

Severe  $H_2$  evolution could not be avoided at the high negative potential. The poor reproducibility must be associated with this phenomenon. The relatively high RSD of peak currents, can also be associated with the fact that the GECE were not preactivated prior to measuring. We have observed that the graphite-epoxy based electrodes, applied in biosensor design, needed to be activated before amperometric measurement. The homogeneity of the prepared composite [39] have to be considered also as it would affect the reproducibility of electrode surface after each polishing step. An improved reproducibility would be expected for an improved bulk-homogenised composite. The improvement of RSD of DPASV based on graphite-epoxy composite is still an object of further research in our laboratories.

#### 4. Conclusions

Determination of heavy metals by DPASV and using an unmodified GECE as working electrode has been demonstrated.

Larger  $\tau_{acc}$  provide an increase of peak height without saturation thus a better sensitivity and an improved LD. A compromise between sensitivity, LD, analysis time and pH of the medium have been agreed.

The results obtained, regarding the sensitivity, lower limit of linear response and interferences, have shown a

response of graphite-epoxy electrode similar to other reported electrodes.

These results and SEM characterisation when compared with data reported for GECE modified with a mercury film, confirm that our GECE behaves as a complex microelectrode array with a rough surface.

Although the reproducibility of measurement is not yet satisfactory, being in an early stage of development, possibly the greatest advantage to be offered by the proposed composite material is the avoidance of harmful mercury or other time consuming procedures to modify glassy carbon or other electrodes.

Graphite epoxy electrodes are cheaper and more easily prepared in the laboratory. The possible use of graphite-epoxy material by screen printing technology opens the door for mass production of disposable sensors for heavy metal analysis using stripping techniques. The research of new composite materials for their application in stripping techniques seems to be an attractive and very promising field for research in the future.

#### Acknowledgements

This work was financially supported from CICYT (Madrid) (Project BIO2000-0681-C02-01) and grant (SAB2002-0029) given to A. Merkoçi from Secretaria de Estado de Educación y Universidades (MECD, Madrid).

#### References

- [1] Z. Galus, in: P.T. Kissinger, W. Heineman (Eds.), *Laboratory Techniques in Electroanalytical Techniques*, 2nd ed, Marcel Dekker, New York, 1996.
- [2] Kh.Z. Brainina, A.M. Bond, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2586.
- [3] A.S. Baranski, *Anal. Chem.* 59 (1987) 662.
- [4] S. Nomura, K. Nozaki, S. Okazaki, *Electroanalysis* 3 (1991) 617.
- [5] Y. Hahn, J.-Y. Yoo, *J. Korean Chem. Soc.* 41 (1997) 180.
- [6] A.M. Bond, P.J. Mahon, J. Schiewe, V. Vicente-Beckett, *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 67.
- [7] P.J.S. Barbeira, N.R. Stradiotto, *Talanta* 44 (1997) 185.
- [8] Kh.Z. Brainina, A.V. Ivanova, N.A. Malakhova, *Anal. Chim. Acta* 349 (1997) 85.
- [9] R.R. Dalangin, H. Gunasingham, *Anal. Chim. Acta* 291 (1994) 81.
- [10] A. Merkoçi, M. Vasjari, E. Fàbregas, S. Alegret, *Microchim. Acta* 135 (2000) 29.
- [11] C.M.A. Brett, D.A. Fungaro, *Talanta* 50 (2000) 1223.
- [12] K. Seo, S. Kim, J. Park, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2936.
- [13] H.H. Frey, C.J. McNeil, R.W. Keay, J.V. Bannister, *Electroanalysis* 10 (1998) 480.
- [14] Zh. Hu, C.J. Seliskar, W.R. Heineman, *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 93.
- [15] T.H. Degefa, B.S. Chandravanshi, H. Alemu, *Electroanalysis* 11 (1999) 1305.
- [16] I. Palchetti, C. Upjohn, A.P.F. Turner, M. Mascini, *Anal. Lett.* 33 (2000) 1231.

- [17] J. Wang, *Stripping Analysis*, VCH Publishers, Deerfield Beach, 1985.
- [18] E.P. Achterberg, C. Braungardt, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 381.
- [19] J. Wang, B. Tian, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1529.
- [20] M.A. Nolan, S.P. Kounaves, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3567.
- [21] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3218.
- [22] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Electroanalysis* 13 (2001) 13.
- [23] L. Angnes, E.M. Richter, M.A. Augelli, G.H. Kume, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5503.
- [24] P.R.M. Silva, El Khakami, M. Chaker, A. Dufrense, F. Courchesne, *Sensors Actuators B* 76 (2001) 250.
- [25] J. Wang, K. Varughese, *Anal. Chem.* 62 (1990) 318.
- [26] D.E. Tallman, S.L. Peterson, *Electroanalysis* 2 (1990) 499.
- [27] F. Céspedes, E. Fàbregas, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 296.
- [28] F. Céspedes, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 276.
- [29] S. Alegret, *Analyst* 121 (1996) 1751.
- [30] S. Alegret, S. Fàbregas, F. Céspedes, M. Merkoçi, S. Solé, N. Albareda, M.I. Pividori, *Quím. Anal.* 18 (1999) 23.
- [31] J. Saurina, S. Hernández-Casou, E. Fàbregas, S. Alegret, *Analyst* 124 (1999) 733.
- [32] M. Santandreu, F. Céspedes, S. Alegret, E. Martínez-Fàbregas, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2080.
- [33] Kh.Z. Brainina, A.M. Bond, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2586.
- [34] S. Ramirez-Garcia, S. Alegret, F. Céspedes, R.J. Forster, *Analyst* 127 (2002) 1512.
- [35] T.H. Degefa, B.S. Chandravanshi, H. Alemu, *Electroanalysis* 11 (1999) 1305.
- [36] R.R. Dalangin, H. Gunasingham, *Anal. Chim. Acta* 291 (1994) 81.
- [37] K.C. Honeychurch, J.P. Hart, D.C. Cowell, *Electroanalysis* 12 (2000) 171.
- [38] H. Ge, H. Zhao, G.G. Wallace, *Anal. Chim. Acta* 238 (1990) 345.
- [39] S. Rámirez-García, F. Céspedes, S. Alegret, *Electroanalysis* 13 (2001) 529.

# Analysis of amino acids in complex samples by using voltammetry and multivariate calibration methods

Laura Moreno<sup>a</sup>, Arben Merkoçi<sup>a</sup>, Salvador Alegret<sup>a</sup>,  
Santiago Hernández-Cassou<sup>b</sup>, Javier Saurina<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, Barcelona-08028, Spain*

Received 23 May 2003; received in revised form 28 October 2003; accepted 12 November 2003

## Abstract

A voltammetric method is proposed for the simultaneous determination of tryptophan, cysteine, and tyrosine using multivariate calibration techniques. Various electrodes and voltammetric techniques were explored to ascertain the optimum measurement strategy. Among them, differential pulse voltammetry (DPV) with a Pt electrode was selected as analytical technique since it provided a suitable compromise between sensitivity and reproducibility while allowing the oxidation peaks of the three compounds to be reasonably discriminated. The sensitivity of DPV with Pt electrode for Trp standards was  $8.4 \times 10^{-2} \text{ A l mol}^{-1}$ , the repeatability 3.7% and the detection limit below  $10^{-7} \text{ M}$ . The lack of full selectivity of the voltammetric data was overcome using multivariate calibration methods on the basis of the differences in the voltammetric waves of each compound. The accuracy of predictions was evaluated preliminarily from the analysis of three-component synthetic mixtures. Subsequently, this method was applied to the analysis of oxidizable amino acids in feed samples. Results obtained were in good concordance with those given by the standard method using an amino acid analyzer.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Oxidizable amino acids; Differential pulse voltammetry; Multivariate calibration; Partial least square regression

## 1. Introduction

The analysis of amino acids is commonly based on liquid chromatography [1,2] and capillary electrophoresis [3,4] with pre- or post-column labeling and spectroscopic detection of the corresponding derivatives. However, the electrochemical detection in combination with separation techniques (HPLC–ED) [5–8] cannot be overlooked as additional advantages may be gained. In this case, a highly sensitive and direct detection of analytes can be accomplished without needing any derivatization. Nowadays, simpler and faster procedures are needed to satisfy the great demand of amino acid determinations in fields such as food processing, biochemistry, pharmaceuticals, and clinical analysis. Voltammetric methods may be an interesting alternative to separation techniques for the analysis of oxidizable amino

acids on the basis of the inherent electroactivity of thiol or aromatic groups [9–14]. For these applications, traditional electrode materials such as carbon, platinum and gold are commonly used, although significant improvements can be achieved by using modified electrodes [15–17]. For instance, the development of new copper-metal alloy electrodes opens up the possibility of a sensitive detection of a wider variety of amino acids since their electrocatalytic activity [18,19].

The main disadvantage of voltammetric detection is its rather complex response in comparison with spectroscopy. For this reason, extracting qualitative and quantitative information from electrochemical data may result in a difficult task. However, the data analysis can be facilitated greatly by using chemometric techniques which permit the relevant information to be recovered [20,21].

The study of electroanalytical data by means of chemometrics is a new research trend which has attracted the interest of analytical chemists. Although the possibilities of this combination have been little explored to date because of the data complexity, in some cases multivariate techniques

\* Corresponding author. Tel.: +34-934-034-445;

fax: +34-934-021-233.

E-mail address: [xavi@apolo.qui.ub.es](mailto:xavi@apolo.qui.ub.es) (J. Saurina).

have proved their efficiencies in modeling such types of data [20,21]. The chemometric applications are mainly devoted to multivariate resolution of species involved in a given process [22,23] and quantification by using multivariate calibration [12,24–35]. Most of the quantitative applications described in the literature lie in linear PLS modeling of data generated by anodic stripping voltammetry [25,26], adsorptive stripping voltammetry [27], differential pulse polarography (or voltammetry) [28–30], and differential pulse stripping voltammetry [31]. However, the application of non-linear methods such as polynomial PLS and artificial neural networks (ANN) is gaining popularity in the field of electroanalysis [32–35].

An electroanalytical method for determining cysteine (Cys), tryptophan (Trp) and tyrosine (Tyr) is developed in this paper. These analytes are of great importance in the biochemical, pharmaceutical and dietetic fields as they are precursor molecules of hormones, neurotransmitters and other relevant biomolecules [36]. Various electrodes and voltammetric techniques have been explored in order to ascertain the best strategy for developing the most suitable analytical method. Differential pulse voltammetry (DPV) with a Pt working electrode was selected to carry out the measurements. Despite the lack of full selectivity, the resolution and quantification of mixtures of oxidizable amino acids are based on the differences of voltammograms. Some additional difficulties have been found in the application of multivariate calibration methods because of the strong signal overlapping and the lack of bilinearity and additivity of data. The prediction abilities of various multivariate calibration methods such as PLS and non-linear PLS have been evaluated for synthetic mixtures and feed samples.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and solutions

All reagents were of analytical grade. Solutions were prepared using Millipore water. Amino acids and other chemicals for the preparation of electrolyte solutions were supplied by Merck. The support electrolyte solution consisted of 0.1 M potassium chloride and 0.1 M potassium monohydrogenphosphate solution. The pH of this solution was adjusted to 7.5 with a 37% (w/w) hydrochloric acid solution. Synthetic mixtures for a preliminary evaluation of the voltammetric method were prepared from 0.1 M stock solutions of each amino acid.

### 2.2. Samples

Three series of ternary synthetic solutions were prepared for Cys, Trp, and Tyr analysis. For each analyte six concentration levels were considered as follows:  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $2.5 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ , and  $3.5 \times 10^{-4}$  M for

Cys and Tyr;  $2 \times 10^{-5}$ ,  $6 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1.4 \times 10^{-4}$ ,  $1.7 \times 10^{-4}$ , and  $2.1 \times 10^{-4}$  M for Trp. Each interference was studied at two levels:  $1 \times 10^{-4}$  and  $2.5 \times 10^{-4}$  M for Cys and Tyr;  $6 \times 10^{-5}$  and  $1.4 \times 10^{-4}$  M for Trp. As a result, each analyte series was composed of 24 mixture solutions.

Feed samples were kindly provided by Cooperativa Agropecuaria de Guissona, Lleida, Spain. Amino acid contents were quantified with the standard method based on cation exchange liquid chromatography with post-column derivatization with ninhydrin. The quantification of amino acids in the feed samples was required for the establishment of calibration models and the evaluation of prediction errors.

### 2.3. Sample treatment

Free (non-proteic) oxidizable amino acids present in feed samples were recovered according to a leaching procedure as follows: 5 g of feed sample were treated with 50 ml of 0.1 M HCl solution for 30 min in a conical flask with magnetic stirring. The resulting extract solution was subsequently filtered through a nylon membrane of 0.45  $\mu\text{m}$  of pore size and refrigerated.

### 2.4. Apparatus and measurement procedure

A PGSTAT 20 Autolab potentiostat from Eco Chemie was used for the voltammetric measurements. Pt, graphite-methacrylate polymer and polypyrrol surface-modified working electrodes were evaluated. The procedures for the preparation of polymer and surface-modified electrodes are described in [34,37]. A double-junction reference electrode Ag/AgCl Orion 90-02-00, with the external chamber filled with a 0.1 M KCl solution, and a platinum auxiliary electrode were used. For DPV measurements the potential range was from 0.4 to 1.0 V, the potential step of 0.00365 V, the modulation amplitude 0.025 V, the modulation time 0.07 s and the interval time of pulses 0.3 s. No preconditioning step was used. The resulting voltammograms registered per each sample consisted of 164 faradaic current values which constituted the multivariate data for further analysis.

For the series of synthetic samples, a volume of 250  $\mu\text{l}$  of each amino acid mixture solution was added to 25 ml of the support electrolyte solution. In the case of feed extract series, 5 ml extract sample solution were added to 10 ml of phosphate electrolyte solution. A magnetic stirrer was used to homogenize the solution prior measurements.

### 2.5. Chemometric software

MATLAB (Version 6.0, R12) on Windows was used for calculations. Multivariate calibration methods used in this paper were partial least square regression (PLS1 and PLS2) and polynomial PLS which were available from the PLS\_Toolbox [38]. A detailed description of these methods is given elsewhere [39].



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Selecting the measurement procedure

First experimental studies were addressed at finding the optimum combination of working electrode (here, Pt, graphite–methacrylate composite, or polypyrrol surface-modified composite electrodes) and the electrochemical technique (cyclic voltammetry (CV) or DPV). For this purpose, some analytical characteristics such as reproducibility, sensitivity, and selectivity were evaluated preliminarily.

The selectivity of the response is a fundamental property of the analytical method in order to avoid interferences. In this study, voltammetric signals were recorded for a  $10^{-4}$  M standard solution of each analyte with CV and DPV techniques using each working electrode. In all cases, the three amino acids were oxidized in the same range of potentials from 0.4 to 1.0 V (with the only exception of Cys measurements using the composite electrode which gave no signal). Results showed that voltammograms were highly overlapped and mutual interferences among electroactive components were found. This poor selectivity was overcome chemometrically as described in Sections 3.2 and 3.3.

In the absence of full selectivity, correlation values can be used as a good criterion to measure the degree of dissimilarity of the voltammetric shapes or the capability of discriminating the analytes. The graphite–methacrylate composite electrode produced highly similar signals for all amino acids with correlation values higher than 0.95 for both DPV and CV techniques. In contrast, a reasonable discrimination among all compounds was obtained with DPV using a Pt electrode as depicted in Fig. 1 (correlation values were as follows:  $r_{\text{Trp}/\text{Cys}} = 0.78$ ,  $r_{\text{Trp}/\text{Tyr}} = 0.75$ , and  $r_{\text{Cys}/\text{Tyr}} = 0.97$ ). Finally, differences in the voltammetric waves for CV using the polypyrrol surface-modified electrode were also noticeable ( $r_{\text{Trp}/\text{Cys}} = 0.69$ ,  $r_{\text{Trp}/\text{Tyr}} = 0.92$ , and  $r_{\text{Cys}/\text{Tyr}} = 0.79$ ).

The sensitivity of measurements was estimated from the current intensity of the voltammetric peak of pure standards of each analyte at a concentration level of  $10^{-4}$  M. The most sensitive responses were obtained with polypyrrol and Pt electrodes (values in the order of magnitude of  $0.1\text{--}1 \text{ A l mol}^{-1}$ ) while the sensitivity decreased about a 10- or 100-fold factor for the graphite–methacrylate composite.

The evaluation of reproducibility was crucial for the selection of the optimum method to carry out the electroanalytical determination of oxidizable amino acids. The relatively poor surface reproducibility of graphite composite and, especially, of polypyrrol modified electrodes greatly limited their use. For the composite electrode, RSD for six consecutive measurements ranged from 5 to 15% depending on the amino acid and for the surface modified device RSD values ranged from 15 to 30%. Neither surface regeneration nor polishing procedures contributed to improvement of the precision. Conversely, the repeatability of DPV data obtained with the Pt electrode improved significantly, with relative

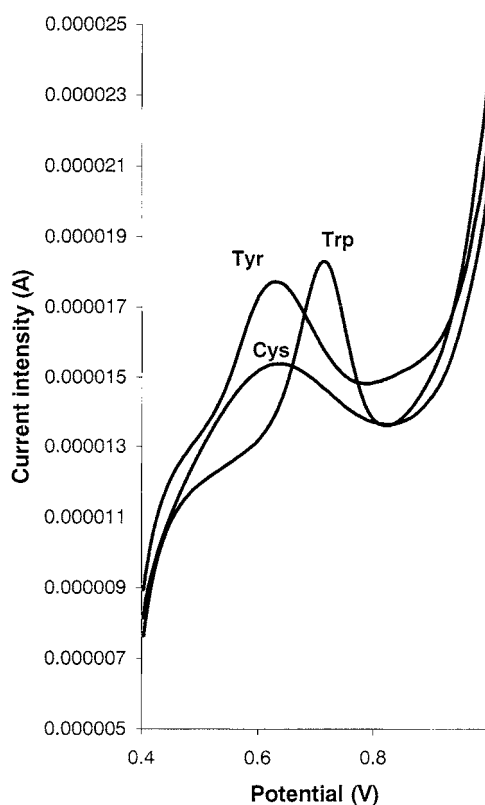


Fig. 1. Differential pulse voltammograms of Trp, Cys, and Tyr obtained with a Pt electrode. Conditions: potential range, 0.4–1.0 V; potential step, 0.00365 V; modulation amplitude, 0.025 V; modulation time, 0.07 s; pulse interval, 0.3 s; analyte concentration,  $10^{-4}$  M; pH, 7.5 (phosphate buffer).

standard deviations of 3.7, 2.7, and 3.2% for Trp, Cys, and Tyr, respectively.

According to these preliminary studies of selectivity, sensitivity, and reproducibility, the polypyrrol surface modified electrodes might be promising devices although more experimental efforts are required to improve the generation of the surface and the reproducibility of measurements, specially for its use in routine analysis. In conclusion, DPV with a Pt electrode was the most suitable technique for the amino acid analysis. Thus, this technique was characterized more deeply by evaluating other parameters such as linearity, bilinearity, and additivity.

The linearity of voltammetric responses was checked at characteristic potentials corresponding to the peak maxima of the oxidation waves of each analyte (0.71 and 0.82 V for Trp, 0.54 and 0.65 V for Cys and 0.61 and 0.84 V for Tyr). Results summarized in Table 1 proved the linear relationship between current intensity and analyte concentration in the ranges indicated, with correlation coefficient better than 0.99.

The variation of the shape of differential pulse voltammograms as a function of the amino acid concentration were also investigated. Fig. 2 shows the full voltammograms registered in the range of 0.4–1.0 V for a series of Trp standard solution with concentrations ranging from  $10^{-6}$

Table 1  
Study of linearity of DPV responses with a Pt electrode for Cys, Tyr, and Trp

Analyte	Potential (V)	Linear range (M)	Sensitivity (A mol <sup>-1</sup> )	Correlation coefficient, <i>r</i>
Cys	0.54	$5 \times 10^{-7}$ – $4 \times 10^{-6}$	0.349	0.997
Cys	0.65	$9 \times 10^{-7}$ – $4 \times 10^{-6}$	0.287	0.999
Tyr	0.61	$8 \times 10^{-7}$ – $4 \times 10^{-6}$	0.038	0.997
Tyr	0.84	$8 \times 10^{-7}$ – $4 \times 10^{-6}$	0.071	0.997
Trp	0.71	$7 \times 10^{-7}$ – $6 \times 10^{-6}$	0.225	0.996
Trp	0.82	$7 \times 10^{-7}$ – $6 \times 10^{-6}$	0.311	0.996

to  $10^{-3}$  M. For Trp solutions with concentrations below  $8 \times 10^{-6}$  M all voltammograms had the same shape, giving bilinear data. Slight variations in shape were detected in the range  $10^{-5}$ – $7 \times 10^{-5}$  M while more noticeable changes were found for concentration between  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  M generating strongly non-bilinear data. This behavior was analogous for the other amino acids. As a possible explanation, the loss of bilinearity and the variation of voltammetric shapes may be due to dynamic effects (decrease in the amount of analyte on the electrode surface). For analytical purposes, variations in the signal shapes made it more difficult to establish quantitative models, so that, the analyte determina-

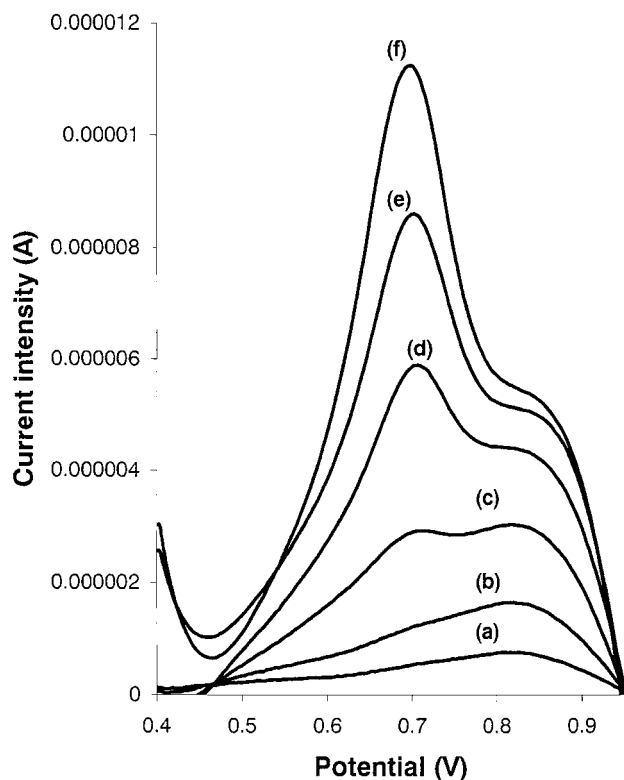


Fig. 2. Influence of the Trp concentration on the shape of differential pulse voltammograms obtained with a Pt electrode. Conditions: potential range, 0.4–1.0 V; potential step, 0.00365 V; modulation amplitude, 0.025 V; modulation time, 0.07 s; pulse interval, 0.3 s; analyte concentration,  $10^{-4}$  M; pH, 7.5 (phosphate buffer); voltammogram corrected by background subtraction. Concentrations (in molarity): (a),  $2 \times 10^{-6}$ ; (b),  $8 \times 10^{-6}$ ; (c),  $2 \times 10^{-5}$ ; (d),  $4 \times 10^{-5}$ ; (e),  $10^{-4}$ ; (f),  $10^{-3}$ .

tion was expected to be more difficult outside the bilinear range.

The additivity of the DPV responses with the Pt electrode was investigated from the study of various two- and three-component mixtures of amino acids. The experimental response for each mixture was compared with that estimated from the signals of pure standards mathematically reproduced from the summa of the responses of each component of the mixture. Numerically, the lack of fit was calculated as a relative overall error expressed as a percentage. The concordance between experimental and reproduced data was rather deficient with reproduction errors around 20–40% for the two- and three-component amino acid mixtures. This lack of additivity of some voltammetric signals has also been pointed out elsewhere [12] and could be attributed to the competence of analytes for the active oxidation sites of the electrode surface. This phenomenon, which may be negligible at low concentrations, is especially noticeable when analytes exceed  $10^{-4}$  M levels. As a result, the quantification of a given analyte becomes much more difficult as its sensitivity depends on the concentration of the other electroactive components of the sample.

### 3.2. Analysis of synthetic samples

This study was focused on evaluating the performance of PLS algorithms to model the quantitative information contained in the DPV data obtained with the Pt electrode. Note that, the possibility of quantifying Cys, Tyr, and Trp in complex mixtures lies in the particular features of the voltammetric response of each analyte (see Fig. 1). PLS1 was chosen for an exploratory study of possibilities of multivariate calibration to quantify the amino acids in the mixture solutions.

The estimation of the number of factors to be used for the construction of calibration models was based on leave-one-out cross validation by working on the calibration set. Five components were chosen for modeling Cys and Trp, and six for Tyr. Note that the optimum number of factors was higher than the number of chemical components present in the sample. Hence, apart from these three electroactive components, additional sources of variance were expected. Among them, factors associated with background contributions, variations in the shapes of voltammograms as a function of analyte concentrations, interactions among components and poor additivity of responses should be mentioned. The corresponding deviations were moderate in the range  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  M while highly critical at concentrations higher than  $10^{-3}$  M. The establishment of efficient multivariate models when dealing with concentration-dependent deviations in the linearity of response was obviously more complex.

Results of the determination of Cys, Trp, and Tyr in the synthetic samples using PLS1 are depicted in Fig. 3. A reasonable concordance between the actual and estimated concentrations was found for the three analytes. The analytes were quantified in each samples using the remaining 23 syn-



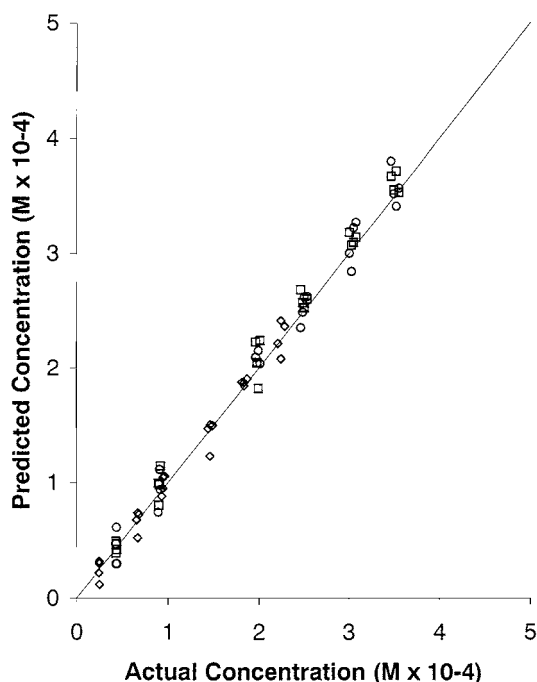


Fig. 3. Results of the quantification of Cys, Trp, and Tyr in the synthetic mixtures with PLS1 using a leave-one-out cross validation approach. Comparison between actual and calculated concentration. Conditions: Cys, five factors; Trp, five factors; Tyr, six factors. Assignment: Cys, squares; Trp, rhombus; Tyr, circles.

thetic mixtures as standards. The overall prediction errors were 6.2, 6.3, and 15.2% for Cys, Trp, and Tyr, respectively. As a conclusion, the voltammetric-chemometric approach was appropriate for the quantification of oxidizable amino acids in the synthetic series.

### 3.3. Analysis of feed extracts

Once the DPV technique was tested in synthetic samples, the next step was the analysis of free oxidizable amino acids present in the feed extracts. The amounts of oxidizable amino acids in the feed samples ranged from 0.002 to 0.03% (w/w), as quantified by liquid chromatography following the standard procedure. For measurements, 5 ml of feed extract solution were added to 10 ml of support electrolyte solution. Thus, the resulting concentration of analytes in the measurement vessel was in the range  $4 \times 10^{-5}$ – $4 \times 10^{-4}$  M. The chemical matrix of feed samples was an additional source of variance affecting the sensitivity and selectivity of measurements. Variable amounts of other amino acids, small peptides, sugars, other organic components and salts were present in the aqueous extracts. Furthermore, other electroactive compounds commonly present in these feed extracts (e.g., food additives such as antioxidants) could interfere with measurements. Note that the chemometric problem is much more complex in this case in comparison with the synthetic series as matrix components and unknown interferences need to be modeled.

Multivariate calibration methods such as PLS can be used to model implicitly the chemical matrix and interfering contributions. For this purpose, the standards should contain the same sources of variation as the unknown samples. Therefore, feed extracts of similar composition to the unknown samples were used as standards for the establishment of the calibration model. The experimental strategy to deal with the construction of multivariate models was as follows: the 24 aqueous extracts, which were available for the multivariate calibration studies, were divided into the calibration and test subsets. Various samples with low, intermediate, and high analyte contents were taken as standards to cover the variability of the composition of the series. The assignment of each extract to either calibration or prediction subsets was based on their distribution on the first and second principal components. Finally, 16 samples were chosen as standards (calibration set) while eight samples were considered as unknown (test set).

PLS2 was used for a straightforward simultaneous quantification of the three analytes. The optimum number of factors for the calibration model was estimated by leave-one-out cross validation. The plot of the corresponding PRESS function suggested that five factors were suitable for the establishment of a reasonable model while avoiding overfitting. The cumulative variances explained with a five-factor model were 99.99 for the X-block (voltammetric responses) and 98.83% for the Y-block (concentrations). Subsequently, the PLS2 model was applied to predict the concentration of those samples used as standards as a way of checking the error in the calibration step. In this case, overall quantification errors of 3.5, 12.7, and 9.7% were obtained for Cys, Trp, and Tyr, respectively. When predicting concentrations of the test samples the quantification errors were 8.2% for Cys, 14.5% for Trp, and 41.9% for Tyr. The poorer quantification of Tyr was attributed to the lack of selectivity of its signal which overlapped with both Cys and Trp contributions.

More specific models focused on predicting each analyte were built with PLS1. As above, the number of factors to be used was estimated by cross validation. In this case, five factors were needed for Cys and Trp, and six for Tyr. The percentage of error in the quantification of each analyte in both calibration (standard set) and prediction (test set) steps are given in Table 2. The determination of Cys in the sample

Table 2  
Evaluation of the calibration models built with PLS 1 for the determination of Cys, Tyr, and Trp in the feed samples

Analyte	NF	Calibration step			Prediction step
		X-block variance explained (%)	Y-block variance explained (%)	Standard set: overall prediction error (%)	Test set: overall prediction error (%)
Cys	Five	99.99	99.89	2.2	6.2
Tyr	Five	99.99	99.95	2.3	22.6
Trp	Six	99.99	99.67	5.7	14.3

Table 3

Evaluation of the calibration models built with non-linear PLS with a second degree polynomial for the determination of Cys, Tyr, and Trp in the feed samples

Analyte	NF	Calibration step			Prediction step
		X-block variance explained (%)	Y-block variance explained (%)	Standard set: overall prediction error (%)	Test set: overall prediction error (%)
Cys	Five	99.99	99.55	3.3	4.2
Tyr	Four	99.99	99.37	1.8	15.3
Trp	Five	99.99	99.76	6.5	9.6

extract was greatly successful with an overall error of 6.2%. The quantification of Trp and Tyr was accomplished with prediction errors of 14.3 and 22.6%.

The apparent lack of bilinearity of voltammetric data may be considered with linear PLS algorithms (e.g. PLS1 and PLS2) by including additional factors in the models. However, the superior performance of non-linear methods for analyzing such data has been pointed out in other papers [12,34,35]. Here, a non-linear algorithm based on polynomial PLS was applied to the treatment of these voltammetric data. A second-order polynomial was used as inner relationship between scores and loadings of each factor. As in the PLS1 approach, each amino acid was modeled individually so that specific calibrations were established for each analyte. The optimum numbers of factors to be used were five for Cys and Trp and six for Tyr. This explained more than 99% of the concentration variance. The results summarized in Table 3 showed a general improvement in the quantification of the three compounds with respect to linear PLS. In more detail, Fig. 4 depicts the scatter plot of the percentage of Cys, Trp, and Tyr in the feed samples found with the standard method (amino acid analyzer) and those values predicted chemometrically. For Cys, a good concordance between both chromatographic and chemometric results was observed with an overall prediction error of 3.3 (calibration set) and 4.2% (unknown samples, i.e., test set). Results corresponding to the quantification of Trp were also highly satisfactory while slightly poorer accuracy was found for Tyr. In summary, the method consisting of DPV combined with multivariate calibration using polynomial PLS results in an excellent approach of a rapid quantification of oxidizable amino acids in feed samples. Hence, this method may be a suitable choice for determining a small number of analytes in large sets of samples while providing a good compromise between accuracy and speed in the analysis. A typical sample analysis took less than 5 min in contrast to the longer analysis times (ranging from 30 to 120 min) required in the HPLC methods with optical or electrochemical detection. The feasibility and robustness of the calibration models suggest the possibility of implementing this method in routine analysis for the control during the elaboration of feed samples.

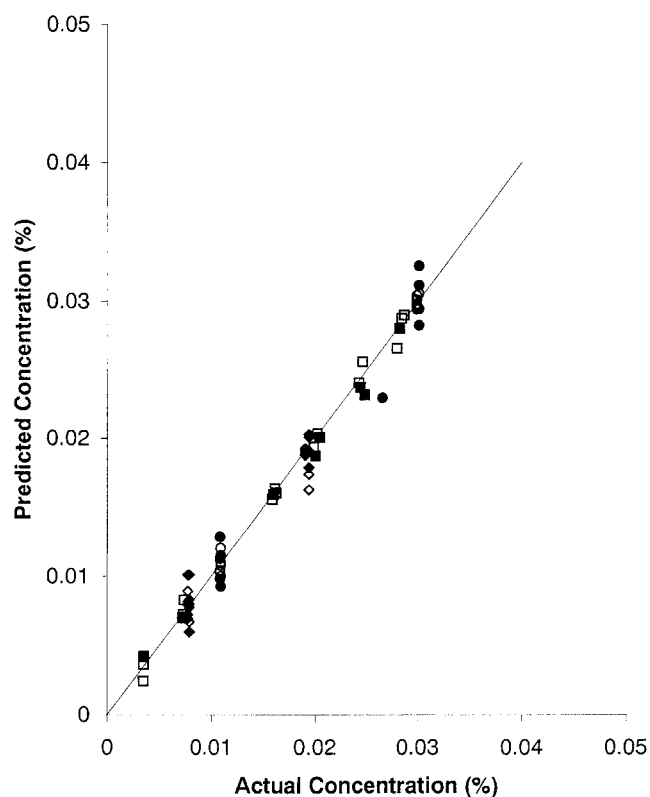


Fig. 4. Comparison of the percentage of Cys, Trp, and Tyr in the feed samples found by using the standard method and the results from a non-linear PLS model with a second degree polynomial and five factors. Assignment: Cys, squares; Trp, rhombus; Tyr, circles. Empty symbols, calibration samples; solid symbols, test samples.

#### 4. Conclusions

This paper proves the suitability of multivariate calibration methods for the analysis of data obtained from differential pulse voltammetry. Despite the lack of selectivity of voltammetric signals, the preliminary study of synthetic mixtures suggested the possibility of determining cysteine, tryptophan and tyrosine with reasonable quantification errors. Prediction was especially satisfactory for Cys. In a more complex situation, the method was applied to the analysis of oxidizable amino acids in feed samples. In this case, from among the mathematical algorithms, non-linear PLS with a second-degree polynomial provided the best results. The three analytes were quantified successfully. The accuracy attained for Cys and Trp was specially satisfactory.

#### References

- [1] E. Heftmann, *Chromatography, Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods, Part B: Applications*, fifth edition, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [2] R.I. Khan, R. Onodera, M.R. Amin, N. Mohammed, *Amino Acids* 22 (2002) 167.
- [3] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, Wiley, New York, 1995.
- [4] W.J.M. Underberg, J.C.M. Waterval, *Electrophoresis* 23 (2002) 3922.

- [5] A.P. Clarke, P. Jandik, R.D. Rocklin, Y. Liu, N. Avdalovic, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2774.
- [6] H. Yu, Y.-S. Ding, S.-F. Mou, P. Jandik, J. Cheng, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 89.
- [7] Y.V. Tcherkas, L.A. Kartsova, I.N. Krasnova, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 303.
- [8] J. Wang, M. Chtrathi, B. Tian, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5774.
- [9] N.S. Lawrence, E.L. Beckett, J. Davis, G. Compton, *Anal. Biochem.* 303 (2002) 1.
- [10] L.Z. Wang, C.S. Ma, X.L. Zhang, Y.B. Ren, Y. Yu, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 689.
- [11] D.R. Shankaran, S.S. Narayanan, *Bull. Electrochem.* 14 (1998) 267.
- [12] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, E. Fabregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 153.
- [13] H. Li, T. Li, E. Wang, *Talanta* 42 (1995) 885.
- [14] A.R. Fiurocci, E.T.G. Cavalheiro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 909.
- [15] A. Merkoci, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 717.
- [16] S. Sole, A. Merkoci, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 102.
- [17] P. Fabry, E. Siebert, *Electrochemical sensors*, in: P.J. Gellings, H.J.M. Bouwmeester (Eds.), *The CRC Handbook of Solid State Electrochemistry*, CRC press, Boca Raton, 1997.
- [18] S.I. Mho, D.C. Johnson, *J. Electroanal. Chem.* 495 (2001) 152.
- [19] I.H. Yeo, D.C. Johnson, *J. Electroanal. Chem.* 495 (2001) 110.
- [20] V. Pravdova, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Anal. Lett.* 35 (2002) 2389.
- [21] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, *Electroanalysis* 14 (2002) 1533.
- [22] M.C. Antunes, J.E. Simão, A.C. Duarte, M. Esteban, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 291.
- [23] M.S. Díaz-Cruz, J. Mendieta, M. Esteban, *Electroanalysis* 14 (2002) 50.
- [24] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, E. Fabregas, S. Alegret, *Analyst* 124 (1999) 733.
- [25] M.C. Antunes, J.E. Simao, R.C. Duarte, *Electroanalysis* 13 (2001) 1041.
- [26] A. Herrero, M.C. Ortiz, *Talanta* 46 (1998) 129.
- [27] O. Domínguez, M.J. Arcos, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 241.
- [28] P.L. Lopez de Alba, L. Lopez Martinez, L.M. de Leon Rodriguez, *Electroanalysis* 14 (2002) 197.
- [29] C. Reguera, M.C. Ortiz, M.J. Arcos, *Electroanalysis* 14 (2002) 1699.
- [30] A. Guiberteau, T. Galeano, N. Mora, F. Salinas, J.M. Ortiz, *J.C. Vire, Comp. Chem.* 25 (2001) 459.
- [31] Y.N. Ni, L. Wang, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 159.
- [32] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 61 (2002) 35.
- [33] A.A. Ensafi, T. Khayamian, M. Atabati, *Talanta* 57 (2002) 785.
- [34] J. Saurina, E. López-Avilés, A. Le Moal, S. Hernández-Cassou, *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) 89.
- [35] N. García-Villar, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 1001.
- [36] G. Chen, J.S. Cheng, J.N. Ye, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 930.
- [37] R.S. Hutchins, L.G. Bachas, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1654.
- [38] B. Wise, N.B. Gallager, *PLS\_Toolbox for use with MATLAB (Version 2.0)*, Eigenvector Research Inc., Mason, WA, 1992.
- [39] H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality, An Introduction*, Wiley, Chichester, 2000.

# Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic tongue

L. Moreno-Barón<sup>a</sup>, R. Cartas<sup>a</sup>, A. Merkoçi<sup>a</sup>, S. Alegret<sup>a</sup>,  
M. del Valle<sup>a,\*</sup>, L. Leija<sup>b</sup>, P.R. Hernandez<sup>b</sup>, R. Muñoz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalunya, Spain*

<sup>b</sup> *Sección Bioelectrónica, Departamento de Ingeniería Eléctrica, CINVESTAV, Ciudad de México, México*

Received 1 November 2004; received in revised form 9 March 2005; accepted 14 March 2005

Available online 22 April 2005

## Abstract

This work describes a voltammetric electronic tongue, in which the quantitative information contained in voltammograms obtained from amperometric sensors is firstly extracted employing the discrete wavelet transform (DWT) and then processed employing artificial neural networks (ANNs). The analytical case studied is the direct determination of the oxidizable aminoacids tryptophan, cysteine and tyrosine, and its application in the direct measurement of these amino acids in animal feed samples. A conventional voltammetry cell with a Pt working electrode is the experimental set-up and differential pulse voltammetry the selected technique. Due to the complexity of the obtained signals, the DWT pre-treatment was needed in order to eliminate noise components and compress voltammograms by selecting and extracting significant information. The ANN was subsequently used to model the system departing from the reduced information, and obtaining the concentrations of the considered species. Best results were obtained when using two hidden layers in a backpropagation neural network trained with the Bayesian regularization algorithm.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Voltammetric electronic tongue; Wavelet transform; Artificial neural networks; Oxidizable amino acids

## 1. Introduction

The lack of selectivity is a key point which in practice limits many applications of sensors and biosensors currently being developed. While the main progress line has been to further improve the selectivity of existing sensors or to add masking steps or convert species to more tolerant forms, a trend from last years is to extract multivariable information and to apply chemometric methods to deal with the response model. This has been successfully applied in the case of voltammetric sensors, by processing the entire voltammogram [1], or, in the case of optical sensors [2], by processing the entire absorption, reflection or fluorescence spectra. In the case of potentiometric sensors, a different scheme with the same underlying idea has been applied, which is the use

of an electrode array intended to correct the insufficient selectivity, instead of one discrete, more ideal sensor. In all cases, the underlying concept is a multisensor system based on the coupling of multichannel information generated from non-specific sensors and pattern recognition tools [3,4].

This concept has coined the specific terms electronic nose and electronic tongue, denoting sensors for gases or sensors for liquid media, respectively. The electronic nose [5], firstly conceived and applied, has gained recognition in fields like food, aroma or medical diagnosis. The electronic tongue [6] has special interest in the quantification of multiple analytes. A correlation between their output and human sensory assessments made by taste panels opens up interesting approaches for the food industry. The electronic tongue may be the underlying concept in new analytical systems for quantitative and qualitative analysis of complex samples.

An important part of an electronic tongue is obviously the sensor array. Or, in the case of the application presented in

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 5811017; fax: +34 93 5812379.

E-mail address: [manel.delvalle@uab.es](mailto:manel.delvalle@uab.es) (M. del Valle).

this study, it would be the electrochemical technique itself, which provides a complete voltammogram for each experiment [7]. In a multicomponent environment, the sensor array produces complex signals (patterns), which contain information about different compounds plus other features. Hence, the second part in multisensor approaches is the signal processing stage. In this sense, different approaches, like principal component analysis, partial least squares and artificial neural networks have been used [8–10]. The choice of the data processing technique for a particular case depends on the task to be solved and the structure of the data (nonlinearity, correlations, etc.). Neural networks are an interesting processing alternative, because they try to reproduce the logical operations performed by an animal brain. They accomplish this feature by the use of an entity, known as artificial neuron, which processes the obtained signals as animal neurons do, in a biomimetic approach [11]. From here, a new group of bioinspired instrumental techniques has arisen with the use of multiple sensor signals and artificial neural networks (ANNs). This trend is of main concern, consisting in an artificial duplicate of the learning process and the response ability of the human nervous system, trying to replicate the function of our senses and our brain.

Electronic tongues use different multivariate tools for subsequent prediction of several analytes in overlapped, and cross-response signals. They have proved to be new and represent interesting alternatives. The reliable performance of electronic tongues in recognition tasks (classification, identification or discrimination) has been demonstrated along the last few years. Potentiometric sensor arrays still are the most widely used type of electronic tongue systems [12–15]. Because of their novelty, such systems still need to gain confidence as quality control tools in the food industry, medicine or environmental fields.

An appropriate sensor system will be the first requirement in order to attempt this approach. Additionally, the systems responses must cover the different chemical species and the dynamic range of concentrations expected. These are considered the departure point to build the model needed to create an intelligent system. In this way, the set-up will be able to predict responses of samples not processed initially, as well as to classify them as the human brain does. When ANNs are used, the process includes a transformation of  $n$ -dimensional vectors that represent the signals, into an  $m$ -dimensional vector. This vector contains the main features of the sample. The networks have the capability to learn from a set of representative samples of the actual problem to be modelled.

In some cases the departure information is too complex to be handled by the modelling tools, for example, when a complete spectra or voltammogram with ANNs needs to be processed. The signal is so complex that the network performance is not satisfactory. This is, a network architecture with hundreds of input neurons, as required by a conventional voltammogram, quickly becomes unpractical [16]. Therefore, it is required to perform some pre-processing of the incoming system information [17,18]. This has been tra-

ditionally accomplished by the use of principal component analysis, or by the use of a subset of coefficients obtained from a Fourier transformation [16,19–23]. Whatever technique is used, it must bring two objectives: to reduce the complexity of the input signal and to preserve the amount of relevant information. In order to perform this task, the wavelet transformation was applied in the present work to solve the problem, operating as a tool to extract the significant information from the voltammetric signals [24,25].

Wavelet transform (WT), a tool of applied mathematics, is a high performance signal processing technique developed from the Fourier transform (FT) during the late 1980s [26–28]. This technique is used for signal decomposition onto a set of basis functions. These functions are obtained by dilations and translations of a unique function called mother wavelet [29]. Dilation, also known as scaling, compresses or stretches the mother wavelet and translation shifts it along the time (or  $x$ ) axis. Thus, WT decomposes the signal in labelled and located contributions for one scale and one position parameter. Every contribution represents the information of frequency bands contained in a specific segment of the analysed signals. An additional advantage of this approach is the facility to remove the noise present in signals. Alternatively, the WT can be used for data compression if only the most significant decomposition coefficients are kept for further treatment.

In the last decade, numerous applications of the WT have been proposed for chemical analysis, including denoising and smoothing, data compression, baseline correction, resolution of overlapping signals, electroanalytical chemistry and chromatography [30]. Shao and Sun applied the WT to the resolution of overlapping chromatograms, and studied the ability of different wavelet base functions at different noise levels [31]. Coelho et al. presented a work addressed to optimize a methodology to maximize the wavelet compression ability of ICP-AES data for the multicomponent determination of Mn, Mo, Cr, Ni and Fe in steel samples [32]. Depczynski et al. demonstrated the use of the wavelet coefficient regression in combination with a genetic algorithm for spectral calibration [33].

Frequently, a degree of overlapping among different components is present if different species undergo oxidation or reduction at similar potentials, when using voltammetry. WT has resulted efficient in this situation, since it offers the advantage of performing data number reduction, feature extraction and noise reduction at the same time. The overlapping in voltammograms from mixtures of metals were satisfactorily resolved qualitatively and quantitatively [34]. Interesting contributions in this field have been made by the group of Winquist in Sweden [7,35–37], who used an array of different metallic working electrodes, in what they term voltammetric electronic tongue. Their work uses a specific polarization strategy, in which a series of potential pulses of decreasing or increasing amplitude are applied to each metallic electrode and current transients are collected. In this sense, Holmin et al. used electrodes made of platinum metals and



copper, glassy carbon, and silver showing promising capabilities for classification when applied in multianalyte samples, like washing formulations [37]. Recently, Cocchi et al. described a close approach to the work presented here, in which WT is used for feature selection prior to quantitative calibration using ANNs. Compressed voltammetric signals of  $Pb^{2+}/Tl^{+}$  mixtures were processed with WT and modelled with ANNs [38,39].

In this work, we apply the principles of the voltammetric electronic tongue to solve a mixture of three components by direct voltammetric analysis. The overlapped voltammetric signal was obtained from the differential pulse voltammetric response of the three oxidizable amino acids tryptophan, cysteine and tyrosine. The signal is first compressed and then its features are extracted employing WT. For this purpose, the base function and the compression level have been studied in order to reconstruct the original signal. Next, the compressed information is employed to construct a calibration model employing ANNs. The final application developed is the direct measurement of these amino acids in animal feed samples. With this approach, a successful combination of chemometric techniques for the use of complex signals in voltammetric electronic tongues is demonstrated.

## 2. Theory of the wavelet transform (WT)

Wavelet transform (WT) was developed for the analysis of non-stationary signals. By WT, a function  $f(t)$  can be represented by a family of functions called wavelets, generated by translating and dilating a single base function called mother wavelet. Dilation, also known as scaling, compresses or stretches the mother wavelet and limits its bandwidth in the frequency domain, while translation shifts the wavelet and specifies its position along time axis. Technically, we can say that scale parameter is related with the spectral content of function  $f(t)$  at a definite position (translation parameter). The family of wavelet functions is related with the mother wavelet by:

$$\Psi_{s,\tau}(t) = \frac{1}{\sqrt{s}} \Psi\left(\frac{t-\tau}{s}\right) \quad (1)$$

In Eq. (1),  $s$  is the scaling factor,  $\Psi$  the mother wavelet,  $\tau$  the translation parameter, and  $s^{-1/2}$  a factor used to ensure that all the wavelets at every scale have the same energy of the mother wavelet. Continuous wavelet transform (CWT) of a function  $f(t)$  is defined as (\* indicates complex conjugate):

$$W(s, \tau) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \Psi_{s,\tau}^*(t) dt \quad (2)$$

The CWT, as described in Eq. (2), cannot be used in practice. In Eq. (2) translation and scale parameters are continuous variables, which mean that a function  $f(t)$  might be decomposed in an infinite number of wavelet functions. To over-

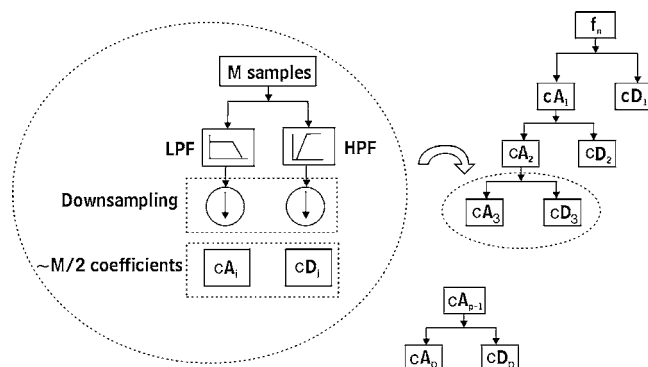


Fig. 1. Mallat's pyramidal algorithm used to implement the DWT. Approximation and detail vectors are indicated by  $cA$  and  $cD$  respectively; subindices denote decomposition level.

come this problem, discrete wavelet transform (DWT) has been introduced. In DWT translation and dilation parameters take discrete values instead of continuous. DWT can be expressed as Eq. (3) from modifying Eq. (1) to:

$$\Psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{s_0^j}} \Psi\left(\frac{t - k\tau_0 s_0^j}{s_0^j}\right) \quad (3)$$

In Eq. (3),  $j$  and  $k$  are integers,  $s_0$  the dilation factor and  $\tau_0$  the translation factor. By doing  $s_0$  and  $\tau_0$  equal to 2 and 1, respectively, we will have dyadic scales and positions permitting the implementation of efficient algorithms for the processing of discrete signals.

$$\Psi_{j,k}(t) = 2^{(-j/2)} \Psi(2^{-j}t - k) \quad (4)$$

The DWT is implemented using Mallat's pyramidal algorithm [40], as sketched in Fig. 1. This signal processing technique operates over a single discrete signal of length  $M$  by decomposing it into orthogonal sub-spaces of length ca.  $M/2$ . Decomposition is made by applying two digital filters, which involves low-pass (LPF) and high-pass (HPF) versions and downsampling. The result of such decomposition is a series of approximation coefficients  $cA_j$  and detail coefficients  $cD_j$ . The  $cA_j$  set and  $cD_j$  set retain the low-frequency and high-frequency content of the signal, respectively. Moreover, this decomposition can be iteratively applied to approximation components to get components of lower resolution and obtain what is known as multiresolution analysis.

For each decomposition level ' $j$ ' a faithful reconstruction of the original signal is possible using the inverse discrete wavelet transform (IDWT) and the set of approximation coefficients obtained at level ' $j$ ' altogether with all sets of detail coefficients from level ' $j$ ' until level 1. Depending on the main goal pursued (noise suppression, data compression, singularities detection, etc.) a set of wavelet components is chosen as the result. In this work, DWT is applied to voltammograms for their compression and extraction of their main features in order to facilitate the training of an ANN used as calibration model.

### 3. Experimental

#### 3.1. Reagents and solutions

All chemicals for electrolyte and the stock amino acid solutions tryptophan (Trp), cysteine (Cys) and tyrosine (Tyr) were purchased to Merck. The buffer electrolyte solution consisted of 0.1 M potassium chloride + 0.1 M phosphate solution (pH was adjusted to 7.5). Synthetic mixtures for a preliminary evaluation of the voltammetric method were prepared from 0.1 M stock solutions of each amino acid.

#### 3.2. Samples

Three series of synthetic solutions were prepared for Trp, Cys and Tyr analysis. For each analyte, six concentration levels were considered as follows: 5.0, 10, 20, 25, 30 and 35  $\mu\text{M}$  for Cys and Tyr; 2.0, 6.0, 10, 14, 17 and 21 mM for Trp. Interferences were studied at two levels: 10 and 25  $\mu\text{M}$  for Trp and Cys; 5.0 and 34  $\mu\text{M}$  for Tyr. As a result, each analyte series was composed by 24 mixture solutions, and the set of voltammograms processed 72.

Animal feed samples were kindly provided by Cooperativa Agropecuaria de Guissona, Lleida, Spain. Free (non-proteic) oxidizable amino acids present in feed samples were collected following a leaching procedure as follows: 5 g of feed sample were treated with 50 ml of 0.1 M HCl solution for 30 min in a conical flask with magnetic stirring. The resulting extract solution was subsequently filtered through a nylon membrane of 0.45  $\mu\text{m}$  of pore size and refrigerated. Free amino acids are added to animal feeds as nutritional fortifiers.

#### 3.3. Apparatus and measurement procedure

A PGSTAT 20 Autolab potentiostat with a Pt working electrode (Crison, Barcelona) was used for differential pulse voltammetric measurements. The cell was completed by a second Pt counterelectrode (Crison, Barcelona) together with a Ag/AgCl reference electrode (Crison, Barcelona). The resulting voltammetric data consisted of current intensities registered in the range of potentials from 0.4 to 1.0 V in steps of 0.00365 V. Hence, 164 data points per sample were registered which constituted the multivariate signal for further analysis. Each voltammogram was recorded by using the differential pulse voltammetric technique. The modulation amplitude was 0.025 V, the modulation time 70 ms and the pulse interval 300 ms. No preconditioning was performed.

For the series of prepared samples, microvolumes of each amino acid stock solution were added to 25 mL of the buffer electrolyte solution, constituted by 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0.1 M KCl + 5 mL of animal feed extract, to match real application samples. Hence, the samples considered were hydrolysed animal feed in 0.1 M HCl medium, with added quantities of Trp, Cys and Tyr amino acids.

#### 3.4. Software

WT as well as ANN modelling were implemented employing Matlab 6.1 (MathWorks, Natick, MA) with the aid of its Neural Network (version 4.0) and Wavelet (version 2.0) toolboxes.

### 4. Results and discussion

In the proposed coupling of WT with ANNs for the modelling of complex multivariate electrochemical signals, the smoothing and compression of the data is performed prior to the building of the calibration model. The data that represent the universe of information to be compressed, prior to their processing employing ANNs, were obtained from the set of voltammograms of different prepared amino acid samples. Fig. 2 shows the nature of the experimental voltammograms recorded, observing a high degree of overlapping. The three oxidizable amino acids were the targets to be quantified. Thus, the departure data formed a matrix with 72 pattern vectors, 164 current elements each, plus a target matrix with 72 triplets of concentrations (of the three amino acids considered Trp, Cys and Tyr). The matrix forming the patterns contained therefore a total of 11,808 elements. The dimension of each pattern vector of 164 current values per sample, represent an impractical input to be applied to ANNs. In this way, after compression, the reduced voltammograms were the patterns fed to the ANN. The proposed choice is then the compression of these input data, trying simultaneously to smooth and denoise this signal, along with the preservation of any significant information on each vector.

#### 4.1. Selection of the mother Wavelet and level of decomposition

The compression percentage in a WT processed voltammogram establishes the amount of information preserved: the greater percentage, the less information is kept. Since linear sweep electrochemical signals contain their significant information at the low frequency scale (frequency) region [41], hence the approximation coefficients  $c_A$  were used as the compressed information.

The mother wavelet and decomposition level, for best compression and smoothing of our voltammograms, were chosen taking into account the degree of similarity between the original voltammogram and the one reconstructed from approximation coefficients after compression. To quantify the similarity we propose a comparison factor named  $f_c$  that considers the area under both signals when superimposed. The discrimination capability is compared to the conventional correlation coefficient  $R$ .

The  $f_c$  is defined as the ratio of the area intersected by both curves to the total area under both curves. From the set theory, with  $A$  and  $B$  as the areas under each curve the  $f_c$  can

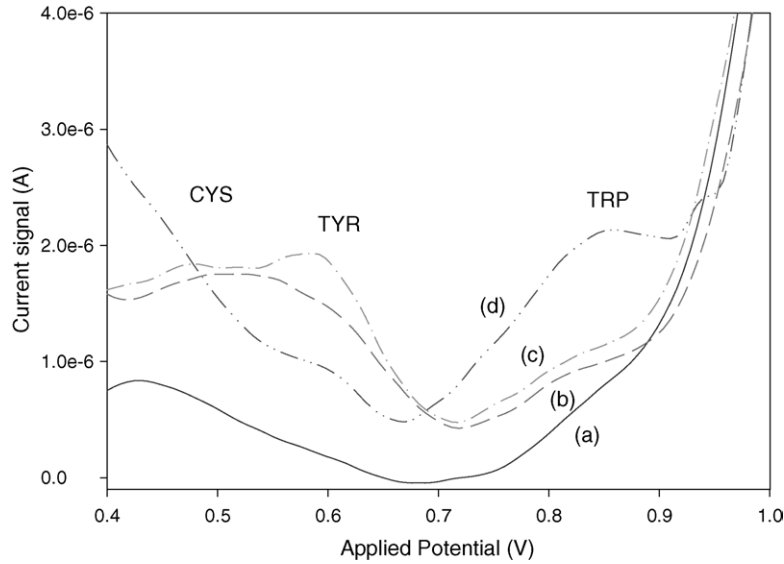


Fig. 2. Example of the overlapped-signal voltammograms obtained with the oxidizable amino acids. Concentrations on the four curves are (tryptophan, cysteine, tyrosine): (a) 2.1, 5.0, 5.0  $\mu\text{M}$ ; (b) 2.1, 36, 5.0  $\mu\text{M}$ ; (c) 2.1, 5.0, 34  $\mu\text{M}$ ; (d) 21, 5.0, 5.0  $\mu\text{M}$ . Oxidation zones for the three amino acids can be assigned on the voltammogram, as indicated in the figure.

be expressed as  $f_c = (A \cap B)/(A \cup B)$ . This factor ranges from 0 to 1 depending on similarity; it values 0 when two signals have nothing in common and increases its value as similarity does. In this sense,  $f_c$  computes similarity in a way related to a correlation coefficient  $R$ .

Fig. 3 shows graphically the terms used to calculate  $f_c$ . The shadowed area on the left part of the figure represents the area intersected by both curves, while the shadowed area on the right represents the total area covered by both curves.

Considering discrete signals of length  $M$ , the  $f_c$  factor is expressed by:

$$f_c = \frac{A \cap B}{A \cup B} = \frac{\sum_{i=1}^M (\max\langle a_i, b_i \rangle - |a_i - b_i|)}{\sum_{i=1}^M (\min\langle a_i, b_i \rangle + |a_i - b_i|)} \quad (5)$$

where  $a_i$  is the  $i$ th data point of the original voltammogram,  $b_i$  the  $i$ th data point of the reconstructed signal from approximation coefficients.

#### 4.2. Selection of the ANN

To choose the adequate ANN for our application, several factors were considered:

- The number of neurons in the input layer is equal to the number of approximation coefficients retained after application of DWT.
- The number of neurons in output layer depends on the number of species to be predicted (the three aminoacids Trp, Cys and Tyr). Under this context, we considered two cases in ANN structure: (i) one network with three neurons in its output layer, one per aminoacid, (ii) one network per aminoacid, we mean, three parallel ANNs with one output neuron each.
- The number of neurons and layers in ANN architecture is normally determined by trial and error. We first considered one hidden layer with a number of neurons equal to the geometric mean of inputs and outputs. Afterwards, the number of neurons in the hidden layer was increased in order to improve the modelling performance. Once the number of neurons in this structure was set, an additional check was made to test the performance of a two-hidden layer network. In such case, the sum of neurons in both hidden layers was made equal to the number of neurons in the one hidden layer structure.
- ANNs tested were feedforward backpropagation networks with supervised learning. Learning algorithms tested were

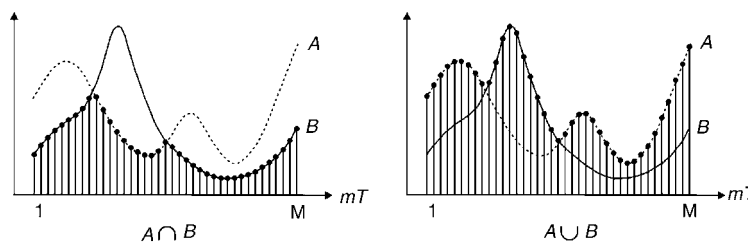


Fig. 3. Scheme of surface elements involved in the calculation of  $f_c$ .



those already preprogrammed in the MATLAB environment: conjugate gradient, descent gradient, descent gradient with adaptive learning rate, descent gradient with momentum, descent gradient with momentum and adaptive learning rate, Levenberg–Marquardt optimization algorithm and Bayesian regularization algorithm.

Matrices of approximation coefficients and targets were normalized to the range  $[-1,1]$ , and, split into training and test subsets (75% of data set taken for training). The generalization capability of the trained network was computed for the test subset through the relative absolute error (RAE), corresponding to estimated versus expected target values:

$$\text{RAE} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{V_t(i) - V_e(i)}{V_t(i)} \right| \times 100 \quad (6)$$

where  $V_t$  is the true value,  $V_e$  the estimated value and  $N$  the number of points in the test subset. RAE values greater than 10% made us consider its network as with low generalization ability.

Fig. 4 shows the flow chart used to implement the ANN. The goal in this process is to get a balance between network performance to model training data and its generalization capability to data not used in training process. For tracking the network error during training we used the sum of squared errors (SSE), defined as the sum of squared differences between the outputs of the network and corresponding expected values. For testing evaluation we used the RAE. Goal values for convergence were set at  $\text{SSE} = 0.001$  and initial value for  $\text{RAE} = 15\%$ . The process stopped when 200 training epochs were completed or when SSE achieved the initial goal. The next stage is then the interpolation of the test subset and the calculation of its RAE value. If this new RAE is smaller than the starting value, then the trained network is temporally saved, it is iteratively retrained till RAE is not further improved or if a week of calculation time has elapsed. The described algorithm was implemented in Matlab v6.3 using a Celeron processor desktop computer @ 1 GHz and 128 Mbytes of RAM. Typical calculation times ranged from 1 to 7 days.

#### 4.3. Smoothing and compression

The goal in compression is to represent the original signal with the lowest number of wavelet coefficients. In addition to compression, the signal was smoothed with the DWT by removing the noise. The number of data points obtained from a compressed voltammogram will depend on the mother wavelet and decomposition level used. To perform a voltammogram compression, only the approximation coefficients obtained with DWT were considered. Therefore, the reconstructed signal will be smoothed and could be slightly distorted in some cases. One hundred and sixty-four data points originally composed our voltammograms. The mother wavelets evaluated were coiflets, daubechies,

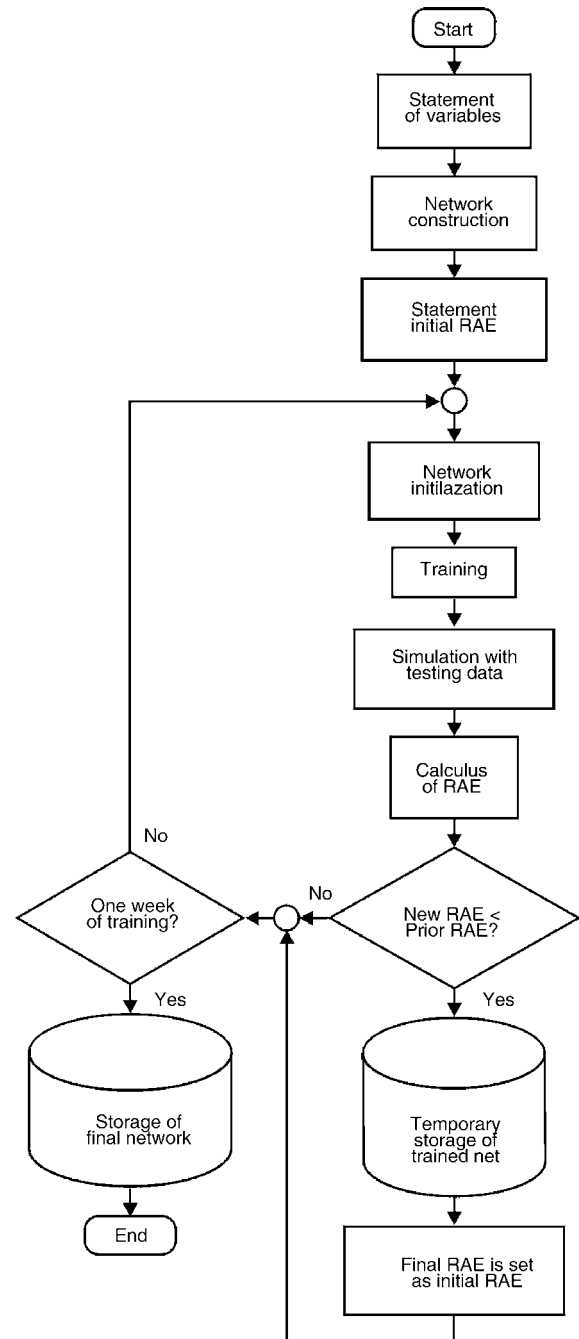


Fig. 4. Flow chart of training process for the artificial neural networks.

biorthogonal and symlets. After the application of the DWT, we obtained from 96 approximation coefficients for wavelet coiflets with order 5 and decomposition level 1, to seven approximation coefficients for wavelet biorthogonal of order 2.6 and decomposition level 5. Fig. 5 shows four bar graphs that compare the number of approximation coefficients obtained with DWT when four different mother wavelets of different order and under different decomposition levels were evaluated.

In our work, a factor  $f_c$  to evaluate the similarity between the original and the reconstructed signals is proposed. It is

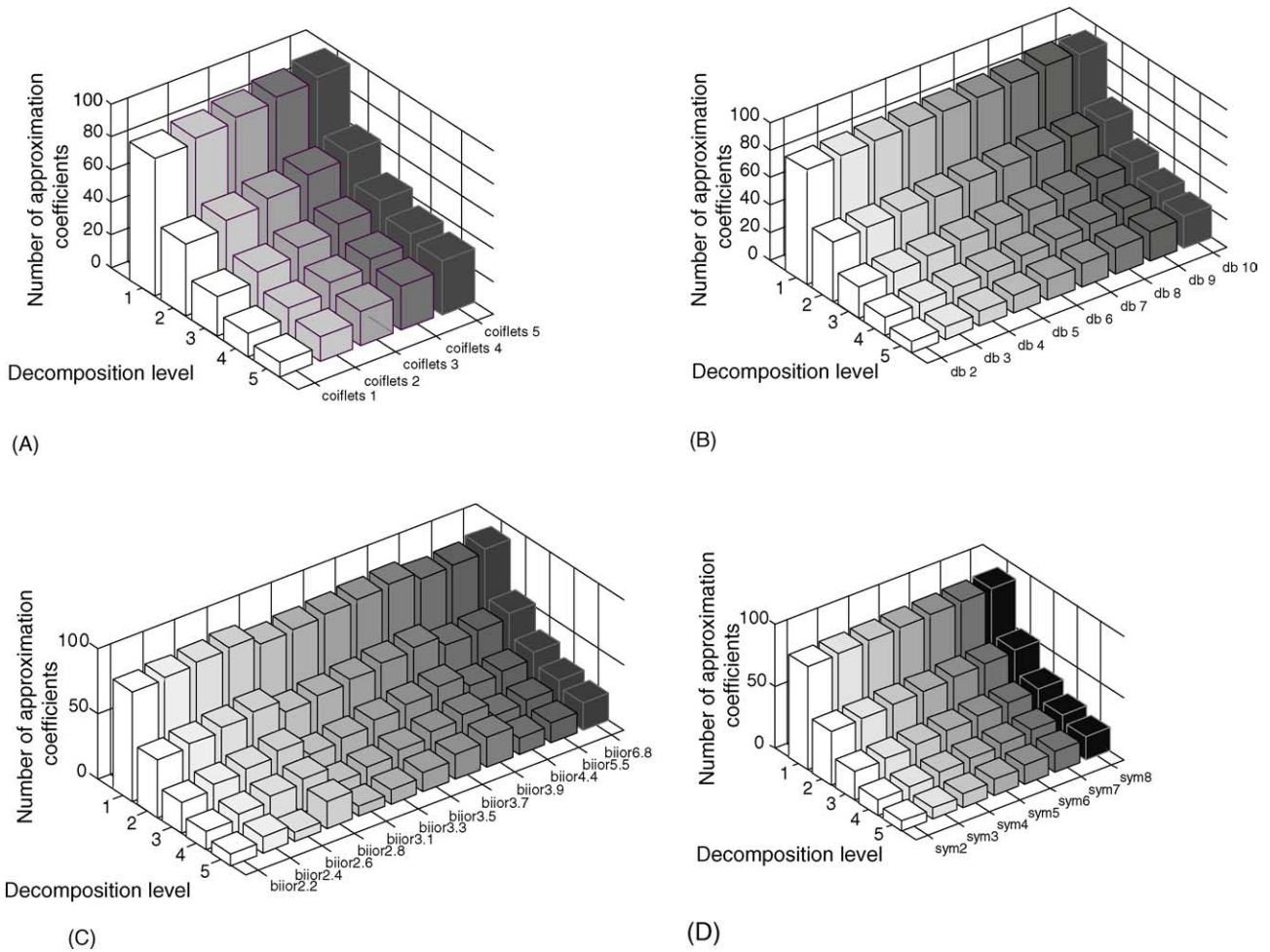


Fig. 5. Bar graphs showing the number of approximation coefficients obtained with five decomposition levels using wavelets (A) coiflets, (B) daubechies, (C) biorthogonal and (D) symlets of different orders. Normally, voltammograms were reduced to vectors having 7–30 approximation coefficients.

well known that this task is usually performed by the correlation coefficient  $R$ . For this reason, the factor  $f_c$  was referenced to the factor  $R$  for validation. The value of  $R$  resulted greater than  $f_c$  for all the wavelets and decomposition levels used but less detail sensitivity in the reconstructed signals was observed. For example, using coiflets at level 3, the mean values were  $0.9688 \pm 0.0252$  and  $0.9867 \pm 0.0169$  for  $f_c$  and  $R$ , respectively. Mean values for  $f_c$  and  $R$  for nine orders of Daubechies' wavelets at five decomposition levels applied to the set of voltammograms, are shown in Fig. 6. In this case,

$f_c$  and  $R$  factors had similar trends, but the factor  $f_c$  presented better discrimination capability than  $R$ , specially for the first levels, as can be seen by the distance between the markers (●) and (○).

Voltammograms were compressed using 165 combinations obtained with 33 different mother wavelets and five different decomposition levels. Each time the matrix of voltammograms was compressed, it was reconstructed and compared against the original data using the factor. The mother wavelet and decomposition level finally selected were

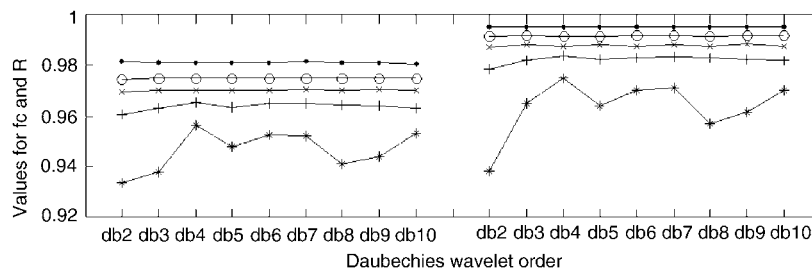


Fig. 6. Mean values of  $f_c$  (left side) and  $R$  (right side) factors obtained from comparing the raw voltammograms with reconstructed signals. The daubechies wavelet family (db2–db10) was used to compact signals at five levels: (●) level 1, (○) level 2, (×) level 3, (+) level 4 and (\*) level 5.

chosen considering that: (i) similarity between original signals and reconstructed were greater than  $f_c$  0.95, and (ii) the least number of approximation coefficients were used.

The number of approximation coefficients obtained with wavelets evaluated at decomposition level 5 varies from 7 to 33. However, not all reconstructions performed with this level showed an  $f_c$  greater than 0.95. Nevertheless, approximation coefficients obtained with decomposition level 4 produces a better reconstruction of voltammograms. For this level, the number of approximation coefficients obtained goes from 13 to 37 and  $f_c$  is greater than 0.96. In order to get a balance between the least possible number of approximation coefficients and a  $f_c$  greater than 0.95, voltammogram compression using the fourth order Daubechies' wavelet and a decomposition level 4, obtaining 16 approximation coefficients and a  $f_c$  of 0.965 ( $R=0.984$ ), was performed.

As the decomposition level increases, the frequency band of the low-pass filter (LPF) is shifted to the lower frequency and applying a downsampling to the filtered signal, the number of approximation coefficients is reduced. The method used in the Mallat's algorithm to obtain the approximation coefficients is similar to the decimation technique utilized in the sampling rate conversion. The performance of the fourth order Daubechies' wavelet observed in voltammograms compression, was compared to the conventional method of decimation (downsampling 1 out of 10 original values). In this case, each raw voltammogram was reduced from 164 to 16 data points.

#### 4.4. WT-ANN modelling

In order to choose the ANN that best fulfilled our purpose, different structures with supervised learning were considered. All these used an input layer with 16 neurons, equal to the compressed voltammogram (16 approximation coefficients obtained after the DWT pre-processing). Structures evaluated had three or one output neurons and one or two hid-

den layers with variable number of neurons. In the structure with one hidden layer and three outputs, neurons varied from 20 to 40 in steps of 10 neurons. In the structure of two hidden layers, neurons varied from 5 to 10 in the first layer and from 25 to 20 in the second layer; here, the sum of neurons in the two hidden layers was fixed as 30. Also, different combinations of transfer functions in hidden and output layer, in addition to training algorithms, were tested in order to get the best modelling network. All the combinations evaluated are summarized in Table 1.

For all these ANN architectures, different learning algorithms were used in order to select the one with better training and prediction abilities. In all calculations, as graphically summarized in Fig. 7, the best performing ANNs were feed-forward backpropagation with Bayesian regularization algorithm.

In the structure with one output neuron we trained three parallel ANNs, one per aminoacid. The structure that best performed had two hidden layers without any linear transfer function, 6 neurons in the first hidden layer, 24 in the second one and linear transfer function in output layer (network L). Other combinations listed in Table 1 did not reach at least the initially programmed RAE. Each training procedure lasted approximately 5 days to get the lowest RAE and it was considered done when no improvements in RAE were obtained after 48 h of extra training. Minimum RAE values for these networks were 6.768%, 5.901% and 8.545% for Trp, Cyr and Tyr aminoacids, respectively.

Network performances were also evaluated by comparing obtained versus expected values with linear regression analysis. Fig. 8 shows this comparison for the three parallel networks with one output. Table 2 contains the values for the slope and intercept of the regression lines corresponding to these comparisons, and their corresponding uncertainties at the 95% confidence level, for training and external test subsets. In all cases, regression lines were indistinguishable from the theoretical comparison, line having 1 value for the slope

Table 1  
Structure of the 16 evaluated networks processing the approximation coefficients ( $cA_4$ -db4)

Network	Number of neurons in hidden layer 1	Number of neurons in hidden layer 2	Transfer functions
A	40	–	logsig–logsig
B	40	–	logsig–tansig
C	40	–	tansig–tansig
D	40	–	tansig–logsig
E	20	–	logsig–purelin
F	30	–	logsig–purelin
G	40	–	logsig–purelin
H	20	–	tansig–purelin
I	30	–	tansig–purelin
J	40	–	tansig–purelin
K	5	25	tansig–tansig–purelin
L	6	24	tansig–tansig–purelin
M	7	23	tansig–tansig–purelin
N	8	22	tansig–tansig–purelin
O	9	21	tansig–tansig–purelin
P	10	20	tansig–tansig–purelin

Networks are labelled 'A' to 'P'. The last column indicates the combinations of transfer functions used in the layers: hidden1–output or hidden1–hidden2–output.

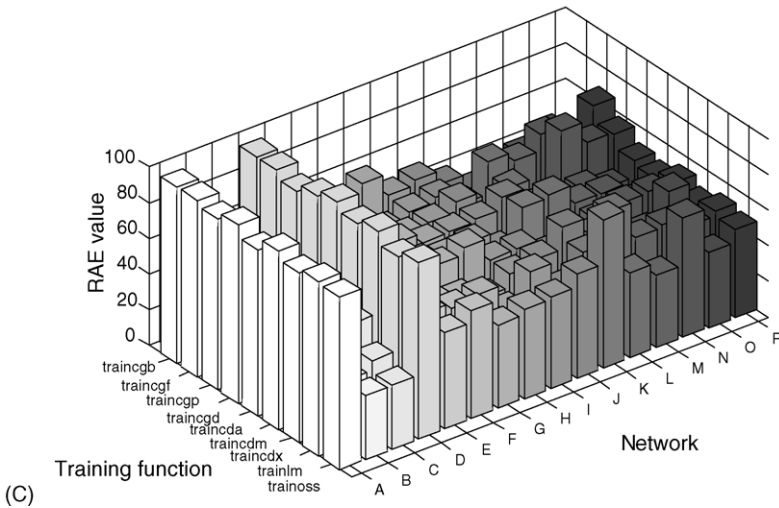
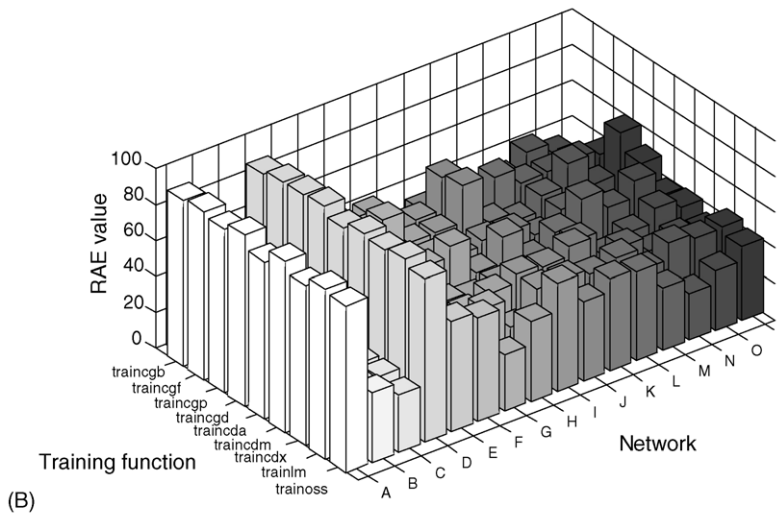
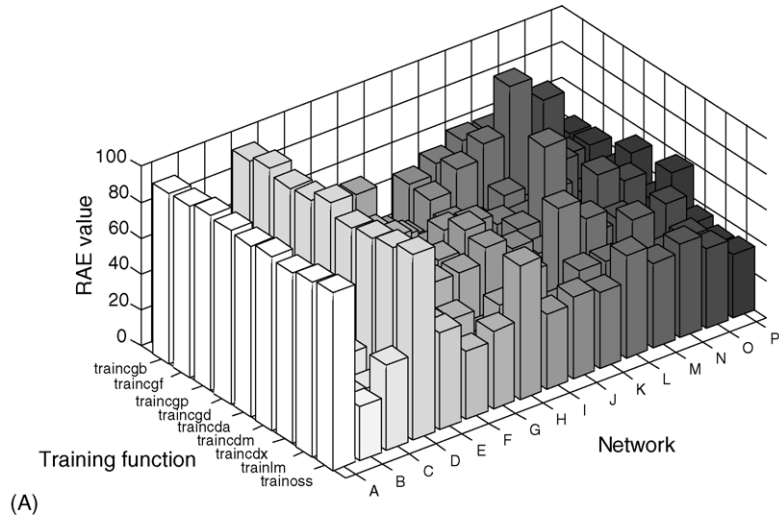


Fig. 7. Calculated RAE values for outputs Trp (A), Cys (B) and Tyr (C). Labels contained under ‘Training Functions’ correspond to the different functions available in Matlab used to train the networks, traincgb is the conjugate gradient backpropagation with Powell–Beale restarts; traincgp the conjugate gradient backpropagation with Polak–Ribiere updates; traincgd the gradient descent backpropagation; traincda the gradient descent with adaptive learning rate backpropagation; traincdm the gradient descent with momentum backpropagation; traincdx the gradient descent with momentum and adaptive learning backpropagation; trainlm the Levenberg–Marquardt backpropagation; trainoss the one-step secant backpropagation.

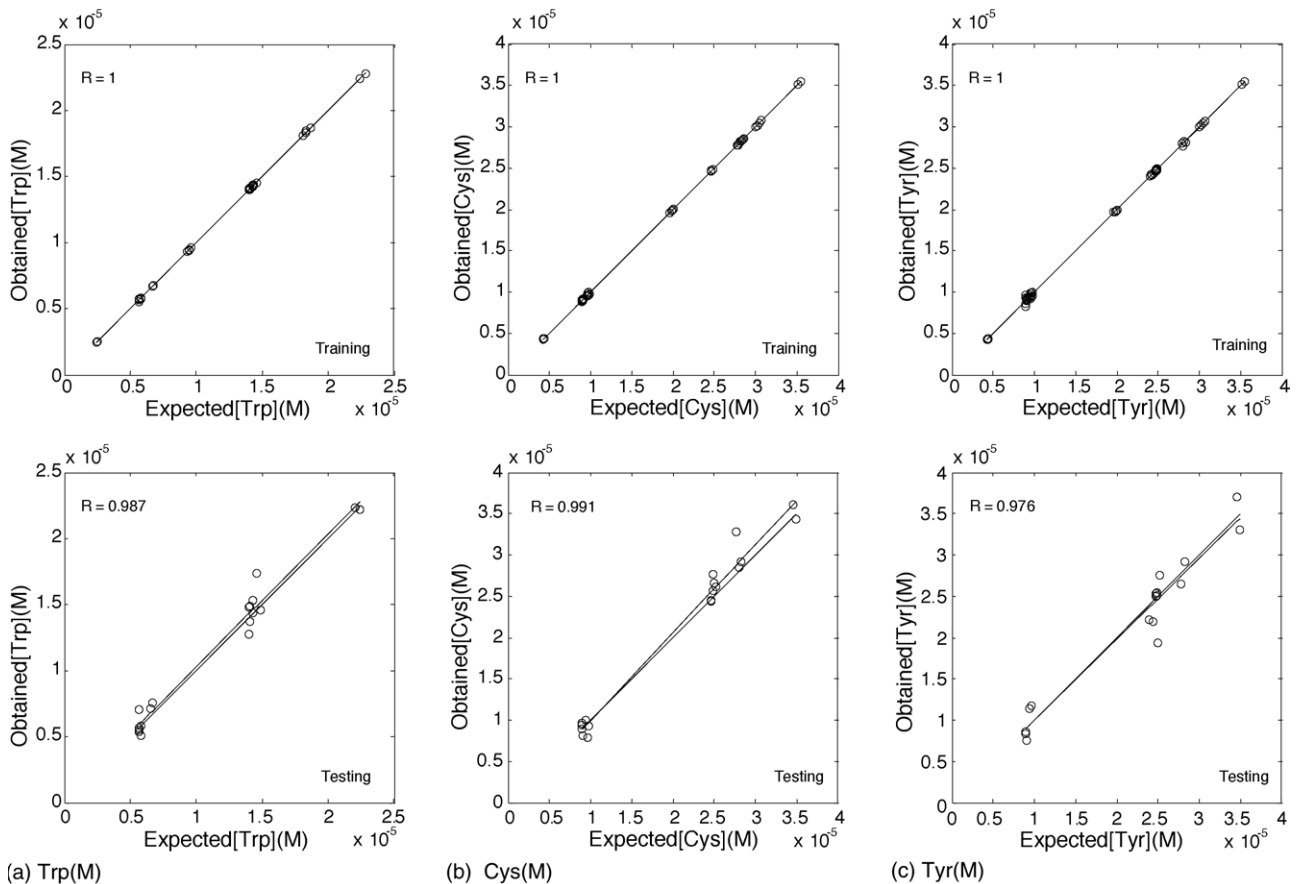


Fig. 8. Comparison of the obtained vs. expected results for the three considered substances obtained using the three parallel ANNs with one output each. The dashed line corresponds to ideality ( $y=x$ ) and the solid line is the regression of the comparison data. Each substance tested occupies one column in the order tryptophan, cysteine and tyrosine. The two rows correspond to the training (top) and external test subsets (bottom).

and zero value for the intercept. From these results, it can be seen that the parallel ANNs permitted an excellent modelling of the voltammograms pretreated by DWT technique.

The ANN structure with three outputs was also tested, as it could simplify and reduce the data treatment. However, this structure never showed comparable results to the three parallel networks. The best performing ANN with three outputs had one hidden layer with 40 neurons with non-linear transfer functions, plus a linear function in the output layer (network J). This structure was harder to train, reaching the minimum RAE after 3 weeks of iterative training. Obtained RAE values for this network were 10.607%, 10.809% and 12.560% for Trp, Cys and Tyr amino acids, respectively (mean RAE

11.328%). Fig. 9 shows the comparison lines obtained with this network for the training and external test subsets. Table 3 contains the corresponding values of slope and intercept of the respective comparison lines, together with their uncertainties at the 95% confidence level. The table clearly shows a slightly worse modelling performance, specially for the test subset.

In order to compare the obtained results, a decimation procedure for data reduction was done as a reference. The processing of the voltammograms compacted by decimation, was accomplished using a similar model to that obtained with the best performing applied to the  $cA_4$ -db4: three parallel ANNs (network L, Table 1) and Bayesian regularization

Table 2

Linear regression parameters obtained for the comparison line ( $y = m \times x + b$ ) obtained vs. expected concentration for the three substances considered

Aminoacid	Training set		External test set	
	$m$	$b$	$m$	$b$
Trp	$0.999 \pm 0.0022$	$1.1E-8 \pm 2.6E-8$	$1.006 \pm 0.086$	$2.3E-7 \pm 11E-7$
Cys	$0.999 \pm 0.0018$	$0.89E-8 \pm 3.7E-8$	$1.063 \pm 0.076$	$-6.4E-7 \pm 17E-7$
Tyr	$0.998 \pm 0.0060$	$0.36E-8 \pm 12E-8$	$0.97 \pm 0.12$	$1.7E-7 \pm 27E-7$

Values split for training and external test subsets, using the three parallel neural networks with one output each (network L). Uncertainty intervals calculated at the 95% confidence level.

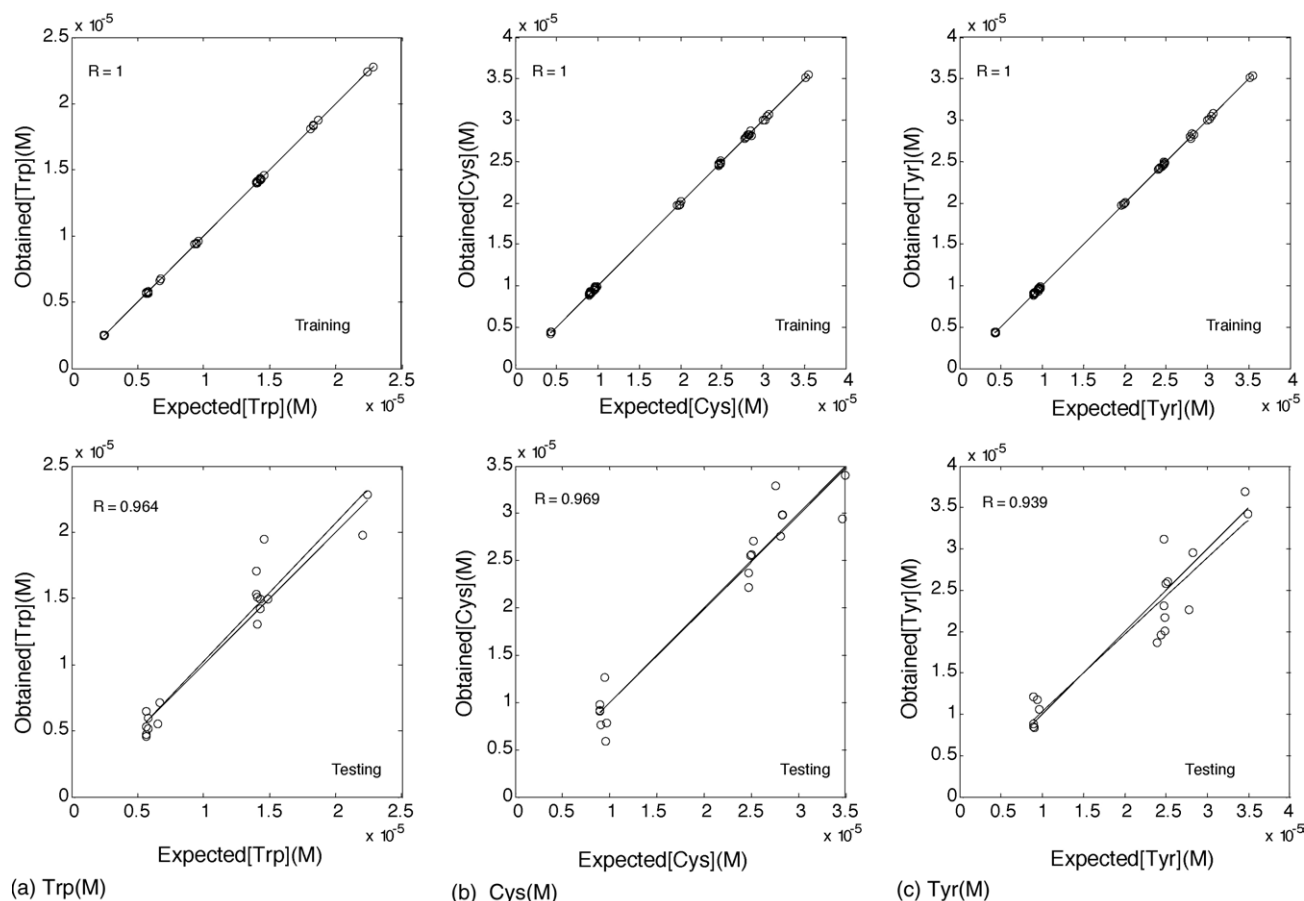


Fig. 9. Comparison of the obtained vs. expected results for the three considered substances obtained using the ANN with three concentration outputs. The dashed line corresponds to ideality ( $y=x$ ) and the solid line is the regression of the comparison data. Each substance tested occupies one column in the order tryptophan, cysteine and tyrosine. The two rows correspond to the training (top) and external test subsets (bottom).

Table 3

Linear regression parameters obtained for the comparison line ( $y=m \times x+b$ ) obtained vs. expected concentration for the three substances considered

Aminoacid	Training set		External test set	
	$m$	$b$	$m$	$b$
Trp	$0.998 \pm 0.0023$	$1.8E-8 \pm 2.7E-8$	$0.999 \pm 0.0034$	$0.26E-7 \pm 0.70E-7$
Cys	$0.999 \pm 0.0017$	$1.7E-8 \pm 3.5E-8$	$1.043 \pm 0.153$	$-2.0E-7 \pm 19E-7$
Tyr	$0.994 \pm 0.134$	$0.71E-8 \pm 305E-8$	$0.920 \pm 0.181$	$10E-7 \pm 413E-7$

Values split for training and external test subsets, using the neural network featuring three concentration outputs (network J). Uncertainty intervals calculated at the 95% confidence level.

algorithm for training. In this case, the obtained RAE values were noticeably worse: 10.1081%, 9.9269%, 16.6318% for Trp, Cys and Tyr, respectively.

## 5. Conclusions

We have shown in this communication how the coupling of DWT and ANNs is a successful option for the modelling of complex sensor signals, such as those of voltammetry, in order to make possible the voltammetric electronic tongue. The DWT processing of the voltammograms has permitted the reduction of the amount of information needed to repre-

sent their content in a factor of ca. 10, being the case studied of high difficulty, as the signal corresponded to the overlapped combination of three compounds plus noise and the oxidation of containing media. To estimate the degree of representation of the original data, a comparison factor  $f_c$  has been proposed, which computes the similarity between the original and the reconstructed signal with better results than with the correlation coefficient. The calibration models to quantify the three oxidizable amino acids have been successfully obtained employing ANNs and the DWT that reduced the representation of the data. The same treatment can be extended to the use of a larger number of sensor signals, per example, from electrodes made of different metals, in a more typical

voltammetric electronic tongue. Although the involved computing times are large, they are needed only for calibration, not for the application. Simpler tentatives such as direct modelling of downsampled voltammograms with ANNs did not yield acceptable models. This problem illustrates the need of treatments applying the DWT coupled with ANN technique, as the one proposed in this work.

The methodology outlined above is not uniquely applicable to voltammetric signals. A general approach can be equally applied to any spectral or dynamic signal, with information contained along the record, if the complexity of the information constrains the capability to model it directly with ANNs. Even though, the DWT treatment could be applied to other multiparametric analysis tools, such as principal component analysis (PCA) for identification purposes, or partial least squares (PLS) for calibration.

The study case reported here represents a clear simplification of the analytical procedures usually employed, as for the separate quantification of aminoacids in this study, techniques are needed like liquid chromatography with pre- or post-column labeling and spectroscopic detection of the corresponding derivatives (e.g. UV–vis spectrophotometry or fluorescence). Whereas sensors alone cannot resolve the application, by the performance accomplished with the coupled DWT–ANN chemometric treatment, a very simple and fast procedure is feasible, in order to satisfy the demand of rapid amino acid determinations in fields such as food, biochemistry, pharmaceutical and clinical analysis.

## Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the MCyT (Madrid, Spain) through project CTQ2004-08134, by CONACYT (Mexico) through project 43553 and by the Department of Universities and the Information Society (DURSI) from the Generalitat de Catalunya. Exchange of researchers was made through the ACI programme (DURSI, Generalitat de Catalunya).

## References

- [1] V. Pravdová, M. Pravda, G.G. Guilbault, Role of chemometrics for electrochemical sensors, *Anal. Lett.* 35 (2002) 2389–2419.
- [2] W.H. Chan, A.W.M. Lee, D.W.J. Kwong, Y. Liang, K. Wang, Simultaneous determination of potassium and sodium by optode spectra and an artificial neural network algorithm, *Analyst* 122 (1997) 657–661.
- [3] W.E. Van der Linden, M. Bos, A. Bos, Arrays of electrodes for multi-component analysis, *Anal. Proc.* 26 (1989) 329–335.
- [4] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. De-Román, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle, An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 248–256.
- [5] J.W. Gardner, P.N. Bartlett, Electronic noses, in: *Principles and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [6] Y. Vlasov, A.A. Legin, Non-selective chemical sensors in analytical chemistry: from electronic nose to electronic tongue, *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 255–260.
- [7] F. Winquist, P. Wide, I. Lundström, An electronic tongue based on voltammetry, *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 21–31.
- [8] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, Multivariate data analysis in electroanalytical chemistry, *Electroanalysis* 14 (2002) 1533–1542.
- [9] D.B. Hibbert, Data analysis of multi-sensor arrays, *Electroanalysis* 10 (1998) 1077–1080.
- [10] F. Despagne, D.L. Massart, Neural networks in multivariate calibration, *Analyst* 123 (1998) 157–178.
- [11] S. Alegret (Ed.), *Integrated Analytical Systems*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [12] P. Ciosek, E. Augustyniak, W. Wroblewski, Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitive electrode-based electronic tongue for qualitative analysis of beverages, *Analyst* 129 (2004) 639–644.
- [13] A.V. Legin, A.M. Rudnitskaya, Yu.G. Vlasov, C. Di Natale, A. D'Amico, The features of the electronic tongue in comparison with the characteristics of the discrete ion-selective sensors, *Sens. Actuat. B* 58 (1999) 464–468.
- [14] A. Rudnitskaya, A. Ehlert, A. Legin, Yu. Vlasov, S. Büttgenbach, Multisensor system on the basis of an array of non-specific chemical sensors and artificial neural networks for determination of inorganic pollutants in a model groundwater, *Talanta* 55 (2001) 425–431.
- [15] J. Gallardo, S. Alegret, M.A. de Roman, R. Muñoz, P.R. Hernandez, L. Leija, M. del Valle, Determination of ammonium ion employing an electronic tongue based on potentiometric sensors, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2893–2908.
- [16] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, Optimisation of a neural network model for calibration of voltammetric data, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 61 (2002) 35–49.
- [17] J. Simons, M. Bos, W.E. Van der Linden, Data processing for amperometric signals, *Analyst* 120 (1995) 1009–1012.
- [18] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, Simultaneous quantification of analytes in quaternary mixtures using dual pulse staircase voltammetry and genetically optimised neural networks, *Analyst* 129 (2004) 355–358.
- [19] V. Tchistiakov, C. Ruckebusch, L. Duponchel, J.P. Huvenne, P. Legrand, Neural network modelling for very small spectral data sets: reduction of the spectra and hierarchical approach, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 54 (2000) 93–106.
- [20] B. Walczak, D.L. Massart, Noise suppression and signal compression using the wavelet packet transform, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 36 (1997) 81–94.
- [21] R.M. de Carvalho, C. Mello, L.T. Kubota, Simultaneous determination of phenol isomers in binary mixtures by differential pulse voltammetry using carbon fibre electrode and neural network with pruning as a multivariate calibration tool, *Anal. Chim. Acta* 420 (2000) 109–121.
- [22] T. Artursson, P. Spångeus, M. Holmberg, Variable reduction on electronic tongue data, *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 255–264.
- [23] A.A. Ensafi, T. Khayamian, M. Atabati, Simultaneous voltammetric determination of molybdenum and copper by adsorption cathodic differential pulse stripping method using a principal component artificial neural network, *Talanta* 57 (2002) 785–793.
- [24] K. Jetter, U. Depczynski, K. Molt, A. Niemöller, Principles and applications of wavelet transformation to chemometrics, *Anal. Chim. Acta* 420 (2000) 169–180.
- [25] T. Artursson, M. Holmberg, Wavelet transform of electronic tongue data, *Sens. Actuat. B* 87 (2002) 379–391.
- [26] B.K. Alsberg, A.M. Woodward, D.B. Kell, An introduction to wavelet transforms for chemometricians: a time–frequency approach, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 37 (1997) 215–239.
- [27] A.K. Leung, F. Chau, J. Gao, A review on applications of wavelet transform techniques in chemical analysis: 1997, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 43 (1998) 165–184.



- [28] X. Shao, A.K. Leung, F. Chau, Wavelet: a new trend in chemistry, *Acc. Chem. Res.* 36 (2003) 276–283.
- [29] A. Grossmann, J. Morlet, Decomposition of Hardy functions into square integrable wavelets of constant shape, *SIAM J. Math. Anal.* 15 (1984) 723–736.
- [30] Wavelets in chemistry, in: B. Walczak (Ed.), *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, Amsterdam, 2000.
- [31] X. Shao, L. Sun, An application of the continuous wavelet transform to resolution of multicomponent overlapping analytical signals, *Anal. Lett.* 34 (2001) 267–280.
- [32] C.J. Coelho, R. Kawakami, M.C. Ugulino, M.F. Pimentel, E.C. da Silva, A solution to the wavelet transform optimization problem in multicomponent analysis, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 66 (2003) 205–217.
- [33] U. Depczynski, K. Jetter, K. Molt, A. Niemöller, Quantitative analysis of near infrared spectra by wavelet coefficient regression using a genetic algorithm, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 47 (1999) 179–187.
- [34] X. Shao, Ch. Pang, S. Wu, X. Lin, Development of wavelet transform voltammetric analyzer, *Talanta* 50 (2000) 1175–1182.
- [35] C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winquist, I. Lundström, Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review, *Anal. Chim. Acta* 426 (2001) 217–226.
- [36] S. Holmin, P. Spångeus, C. Krantz-Rülcker, F. Winquist, Compression of electronic tongue data based on voltammetry—a comparative study, *Sens. Actuat. B* 76 (2001) 455–464.
- [37] S. Holmin, F. Björefors, M. Eriksson, C. Krantz-Rülcker, F. Winquist, Investigation of electrode materials as sensors in a voltammetric electronic tongue, *Electroanalysis* 14 (2002) 839–847.
- [38] M. Cocchi, J.L. Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros, I. Naranjo-Rodríguez, J.M. Palacios-Santander, R. Seeber, A. Ulrici, Multicomponent analysis of electrochemical signals in the wavelet domain, *Talanta* 59 (2003) 735–749.
- [39] J.M. Palacios-Santander, A. Jimenez-Jimenez, L.M. Cubillana-Aguilera, I. Naranjo-Rodríguez, J.L. Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros, Use of artificial neural networks, aided by methods to reduce dimensions, to resolve overlapped electrochemical signals. A comparative study including other statistical methods, *Mikrochim. Acta* 142 (2003) 27–36.
- [40] S.G. Mallat, A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 11 (1989) 674–693.
- [41] H. Fang, H. Chen, Wavelet analyses of electroanalytical chemistry responses and an adaptive wavelet filter, *Anal. Chim. Acta* 346 (1997) 319–325.

## Biographies

**Laura Moreno-Barón** received the MSc degree in chemistry in 2005 from the Autonomous University of Barcelona, where he is at the moment pursuing his PhD in analytical chemistry. His main research topics are voltammetric sensors, electronic tongues, and chemometric tools for chemical sensors.

**Raul Cartas** received the BS degree in electronic engineering in 1999 from the Technological Institute of Veracruz in Mexico and the MSc

degree in electrical engineering from CINVESTAV-IPN in 2002. Now, he is beginning his PhD in Electronic Engineering at the Autonomous University of Barcelona, in the field of nonlinear signal processing for chemical sensors.

**Arben Merkoçi** was awarded the PhD in chemistry from the University of Tirana, Albania, on 1991 and then did post-doctoral researches in Greece, Hungary, Italy, Spain and USA. His main interests have been electroanalytical methods for several applications in sensors and biosensors. Currently he is “Ramon y Cajal” researcher and professor at the Sensors & Biosensor Group, Chemistry Department, Autonomous University of Barcelona. His main research interests concern the design of composites, biocomposites and nanobioconjugate materials for enzyme, immuno and DNA based electrochemical sensors.

**Salvador Alegret** received the PhD in chemistry in 1978 from the Autonomous University of Barcelona, and got his Full Professor position of analytical chemistry at Autonomous University of Barcelona in 1991, where he previously was an Associate Professor. He is head of the Sensors & Biosensors Group in the Chemistry Department. He is involved in the concept and development of integrated analytical systems, mainly electrochemical sensors and biosensors. The resultant sensor devices are typically applied in automated analytical systems based on bioinstrumentation or biomimetic concepts, and used for process control and monitoring in fields like medicine, environment and chemical industry.

**Manuel del Valle** received his PhD in chemistry in 1992 from the Autonomous University of Barcelona, and got a position of Associate Professor in analytical chemistry in 1997 at the same university. He is member of the Sensors & Biosensors Group where he is specialist in instrumentation and electrochemical sensors. He has initiated there the research lines of sensor arrays and electronic tongues. Other interests of his work are the use of impedance measurements for sensor development and the design of automated flow systems.

**Lorenzo Leija** is Senior Lecturer-Researcher at the Bioelectronics Section of the Department of Electrical Engineering at the CINVESTAV in Mexico DF. He is Electronics Engineer (1978) from the San Luis Potosí Technological Institute (México), MSc (1981) in Bioelectronics from the CINVESTAV (México) and PhD (1989) in “Genie Biologique” from the Nancy I University (France). His main research line follows the development of instrumentation for cardiac pacemaker and the use of RF on health.

**Pablo Rogelio Hernandez** received a BSc degree in Electronics in 1978 from the Instituto Politécnico Nacional. He was awarded the PhD degree from CINVESTAV-IPN, Mexico, in 1995. He is a Lecturer-Researcher at the CINVESTAV IPN at México city on the design of chemical sensors and the instrumentation for electrochemical measurements.

**Roberto Muñoz** received the BSc degree in electronics engineering from the National Polytechnic Institute of Mexico in 1983, the MSc in bioelectronics in 1986 and PhD in Electrical Engineering in 1999, both at the Center for Research and Advanced Studies of IPN (CINVESTAV). Since 1990, he has been a Lecturer-Researcher at the Department of Electrical Engineering of CINVESTAV on nonlinear biomedical signal processing and has made recent contributions in the field of potentiometric and voltammetric electronic tongues.



## Full Paper

# Resolution of Heavy Metal Mixtures from Highly Overlapped ASV Voltammograms Employing a Wavelet Neural Network

Juan Manuel Gutiérrez,<sup>a,b</sup> Laura Moreno-Barón,<sup>a</sup> Francisco Céspedes,<sup>a</sup> Roberto Muñoz,<sup>b</sup> Manuel del Valle<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Spain

\*e-mail: manel.delvalle@uab.es

<sup>b</sup> Bioelectronics Section, Department of Electrical Engineering, CINVESTAV, 07360 México DF, México

Received: July 22, 2008

Accepted: September 19, 2008

## Abstract

This work describes the chemometric assisted ASV determination of three heavy metals in water (lead, copper and cadmium) in presence of thallium and indium as interfering species. Stripping was carried out in open atmosphere, employing a graphite-epoxy transducer as working electrode, without any surface regeneration after each analysis. The concentration range studied was from 0.4 to 20 ppm for both analytes and interferents. Due to the overlapping nature of the signals, a wavelet neural network (WNN) was used for deconvolution of the voltammogram. In order to validate the resolution capability, a k-fold cross validation procedure was performed. Mixtures of metals could be resolved with good prediction of their concentrations; obtained vs. expected comparison graphs exhibited, for a set of samples not employed for training, correlation values of 0.996 for lead, 0.989 for cadmium and 0.995 for copper.

**Keywords:** Voltammetry, Heavy metals, Mixture resolution, Wavelet neural network

DOI: 10.1002/elan.200804419

## 1. Introduction

Pollution in the environment is a topic of major concern, especially from points of view of sustainability and remediation. Diverse types of water pollution have been characterized which need early detection and/or long term monitoring, being heavy metals one of the cases receiving most attention. During last years, our laboratory has been developing innovative chemometric techniques to improve the performance of electroanalytical procedures in different fields.

When one checks the most common techniques available for heavy metals, the classic approaches have used Hg as a support for metal determination. Since its toxicity and poison effects, new materials arose to substitute mercury or mercury modified electrodes in the determination of trace metals. These are bismuth films [1–4] and bismuth planar electrodes [5], carbon disk microelectrodes [6], carbon-paste [7–8] and carbon-paste modified electrodes [9].

Anodic stripping voltammetry (ASV) is a very sensitive analytical technique particularly appropriate for the detection of heavy metals, showing several advantages over other electrochemical procedures, for instance the concentration gain. However, the nature of the signals (especially those that are obtained from complex mixtures) demands the use of data processing techniques in order to decode the multivariate information [10–12].

Overlapping electrochemical signals has been a common problem in electroanalysis, where the goal is to quantify or to identify substances. For this purpose, multivariate calibration techniques and advanced chemometric tools are

becoming an alternative to classic chromatographic and spectrometric methods for the simultaneous determination of compounds, where a special sample pretreatment is commonly performed [13–15]. Some works that have used advanced data processing are associated with the determination of aminoacids [7, 16], phenols [17] and pharmaceutical principles [18]. This new methodology not only simplifies all the analytical process, expanding its use in situ, but economizes enormously its cost.

The most common used multivariate calibration methods are partial least square (PLS) and principal components regression (PCR). Its implementation is often associated to solve problems where there are a huge number of variables and relatively few data. In this way, the obtained prediction models are not suitable to discriminate new information, performing good results particularly when the relationship between variables is linear. Therefore, these methods fail when they try to represent the non-linear characteristic commonly present in the overlapping ASV measurements.

To tackle this inconvenience, a powerful processing tool used in chemometrics is artificial neural networks (ANNs), especially useful for modeling and calibrating complex analytical signals [19]. Treating voltammetric signals with ANN requires some kind of data preprocessing for its reduction such as principal component analysis (PCA), discrete Fourier transform (DFT) or wavelet transform (WT), in order to gain advantages in training time, avoid redundancy and obtain a model with better generalization ability; this preprocessing provides precise data interpretation from a data set [11].

There are many different types of ANNs that vary mainly either by its architecture or by the way they learn. However, a new concept on ANN emerged in the recent years known as wavelet neural network (WNN). Instead of using sigmoid activation functions in the hidden layer, these kind of networks employ nonlinear wavelet basis functions (named wavelets), which are localized in both the time space and frequency space [20]. This strategy has been developed as a non-stationary signal processing, useful in tasks as prediction, classification and/or modeling of different nonlinear signals, mainly when they are conformed by a large amount of input data [11, 21–23].

There are few works related with the application of WNN in chemistry [24–28]. Among these, only some of them dealt with multianalyte quantification with overlapped-signals in voltammetric applications [11–12], the oscillographic chronopotentiometric determination of mixtures of  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  [29] and the determination of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  with UV-visible spectrophotometry and PCA analysis [30]. Besides, WNN have been employed to build response models to differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of  $\text{Cu}^{2+}$  ion [31].

The aim of this work is the use of graphite-epoxy composite electrode and the application of the WNN as processing tool for the signal deconvolution of ASV voltammograms of mixtures of lead, copper and cadmium in presence of indium and thallium, as a potential monitor of pollution episodes by heavy metals.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and Solutions

Lead, copper, cadmium, thallium and indium stock solutions were prepared from analytical reagent grade chemicals in acetate buffer solution (0.1 M, pH 3.76). From those, 27 samples plus the origin point were prepared according to a fractional factorial design (FFD) with three levels of concentration and five factors (the five considered metals,  $3^{5-2}$ ), in the range of 0.4–20 ppm. The concentrations in each sample were selected in order to generate a simplified model space without trends and drifts, which ensures that learning in WNNs is not conditioned by a previous data sample. An extra set was formed by 10 synthetic solutions prepared in the same way but with concentrations generated randomly inside the model space. Table 1 shows the specific concentrations of the five considered metals in the 38 samples prepared.

### 2.2. Apparatus

ASV experiments were performed using an Autolab PGSTAT 30 System (Eco-chemie, The Netherlands). A home made graphite-epoxy working electrode was used for the measurements [32]. The cell was completed with an Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) and a commercial Platinum counter electrode (model 52-671, Crison, Spain).

Table 1. Concentration information for the complete data space, all values are in ppm. One voltammogram was measured for each combination of the five concentrations.

$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Tl}^{+}$	$\text{In}^{3+}$
<b>FFD concentrations (ppm)</b>				
0.42	0.43	0.43	0.41	0.41
1.19	1.20	1.21	1.17	7.48
1.96	1.95	1.98	1.88	13.78
2.98	8.06	8.10	7.96	1.27
3.53	8.10	8.18	8.00	8.09
4.27	8.98	9.10	8.78	15.01
5.47	15.84	15.74	15.26	2.11
6.58	17.11	16.85	16.72	9.90
7.41	17.63	17.78	17.46	17.53
7.88	2.99	10.51	17.74	2.89
8.65	3.76	11.12	18.39	10.32
9.82	4.72	12.57	19.88	17.74
9.56	9.67	16.82	2.70	3.40
10.23	10.28	17.08	3.39	9.06
11.30	11.30	18.50	4.22	17.17
12.12	16.70	2.83	9.62	4.27
13.33	18.51	3.65	10.77	11.60
14.00	18.93	4.42	11.48	18.61
14.80	5.26	19.67	12.41	5.04
16.02	6.25	21.40	13.27	12.41
16.58	6.99	22.24	14.01	19.65
17.66	13.03	5.51	20.56	6.27
18.81	13.48	6.27	21.09	13.31
20.19	14.64	7.36	21.80	21.40
18.79	18.76	11.83	4.89	6.40
19.27	19.21	12.69	5.41	13.14
20.52	20.40	13.56	6.56	20.51
10.42	10.37	10.35	10.27	10.08
<b>Extra set of samples randomly generated (ppm)</b>				
11.29	1.03	7.19	11.98	2.04
19.12	1.97	6.00	0.96	4.94
12.40	11.30	5.20	17.38	15.32
19.52	5.15	18.29	8.99	10.09
3.98	6.06	10.04	8.86	1.99
5.13	7.18	11.41	4.02	17.95
16.26	13.26	17.41	6.01	2.03
16.34	7.24	15.51	0.99	15.31
2.04	20.26	8.28	9.90	15.28
20.11	5.12	18.22	17.10	1.00

### 2.3. Hardware and Software

Data processing was performed by an AMD Turion 64X2 laptop. WNN algorithm was written in MATLAB (Math Work, Natick, MA, Version 7.0) by the authors.

### 2.4. Procedures

#### 2.4.1. Data Generation

Voltammograms were obtained under the following conditions: an accumulation potential ( $E_{\text{acc}}$ ) of  $-1.3$  V (vs. Ag/AgCl) applied for a fixed interval time ( $\tau_{\text{acc}}$ ) of 120 s; a stripping potential swept from  $-1.0$  to  $0.3$  V, using a potential step of  $0.00705$  V; a modulation time of  $0.07$  s

and a interval time of applied pulses of 0.3 s. During this procedure, the current is recorded in quiescent solution. One voltammogram of 153 current values was recorded for each sample. Measured currents were in the interval of 1.4 to 450  $\mu\text{A}$ .

All experiments were carried out without any oxygen removal from the sample and with no physical surface regeneration of the working electrode after each measure.

In order to obtain reliable measures that prevent the accumulative effect of impurities on the working electrode surface, an electrochemical cleaning stage was considered between measures. This stage is performed applying a conditioning potential ( $E_{\text{cond}}$ ) of +0.5 V for 40 s after each experiment, in a cell containing Milli-Q water.

#### 2.4.2. Data Processing with WNNs

WNN is a new class of networks that combines WT and ANN in a multilayer perceptron (MLP) architecture [33]. To develop a WNN, basic neurons were constructed with multidimensional wavelets employing wavelet frames; in this way, the network's outputs are weighted sums of inner products between multidimensional wavelet bases and input signal vectors. As the space of input data is represented by a new family of multidimensional wavelets, signal feature extraction is carried out by estimating the parameters in the wavelet neurons of the network with highest similarity (scaling and translating) plus the connection weights. This is done by minimizing a cost function which reflects the goodness of fit of the network. In our application, we used error backpropagation, and the difference between expected and obtained values is evaluated according to the mean squared error ( $MSE$ ) defined by:

$$MSE = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N \sum_{r=1}^m \left( y_{\text{exp}}^n(r) - y^n(r) \right)^2 \quad (1)$$

where  $y^n(r)$  is the  $r$ -th output of the network and  $y_{\text{exp}}^n(r)$  is the  $r$ -th expected concentration value related to the voltammogram input vector  $x^n$ .  $N$  corresponds to the number of input vectors and  $m$  the number of outputs.

In this paper a WNN's activation function corresponds to the first derivative of a Gaussian function defined by Equation 2. For a detailed mathematical analysis and algorithm's description, the reader can consult [12].

$$\Psi(x) = x e^{-0.5x^2} \quad (2)$$

With the 38 samples determined, the input data for WNN models is a voltammetric matrix of dimension [153, 38], and the target is a [5, 38] matrix ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Tl}^+$  and  $\text{In}^{3+}$  concentrations). The processed information was normalized to an interval of  $[-1, 1]$ , and randomly separated in two sets; three quarters of the data were used for training and the remaining quarter for testing. Figure 1 shows WNNs' task. Each voltammogram is represented by  $x^n$  which is mapped

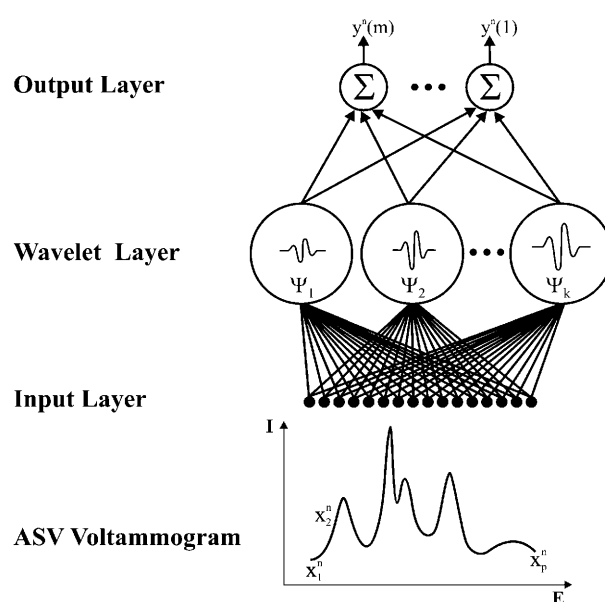


Fig. 1. General model of WNN used to interpret ASV responses. Function  $\Psi_k$  corresponds to the multidimensional wavelet, where  $k$  is the number of neurons in the hidden layer.  $x_j^n$  denotes the  $j$ -th current value of the  $i$ -th voltammogram, and  $y^n(m)$  the sought information for each concentration compound.

to a point of the five-dimensional space of concentrations identified by  $y^n(m)$ . WNN structures with an architecture of  $153 \times 4 \times 5$  were programmed and trained to obtain the concentration of each metal. Structures with more neurons in the hidden layer were not tested because the proposed architectures allowed to obtain satisfactory results, as reported in previous works [11–12].

Prediction capability of the model was evaluated using  $k$ -fold cross validation method, choosing different training and testing sets, in order to validate the reliability of the model.

### 3. Results and Discussion

A sample of the obtained voltammograms is plotted in Figure 2. As can be seen, a high overlapping effect and some intermetallic compound formation difficult the direct metal determination. Lead, cadmium and copper individual records lets to localize the position of the oxidation peak of each metal in the complex matrix ( $-0.57$  V for  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $-0.86$  V for  $\text{Cd}^{2+}$  and  $-0.22$  V for  $\text{Cu}^{2+}$ ). Thallium and Indium cannot be precisely allocated, although its redox activity is confirmed in the same range of potentials studied (among  $-0.65$  V for  $\text{Tl}^+$  and  $-0.75$  V for  $\text{In}^{3+}$ ).

Despite the high sensitivity of ASV in the conditions studied, the selectivity shown is poor as the overlapped signal corresponds to the contribution of each metal under study as well as to certain intermetallic species formed [34]. In this way, the obtained signals present noticeable overlapping and interference with the components in the sample,

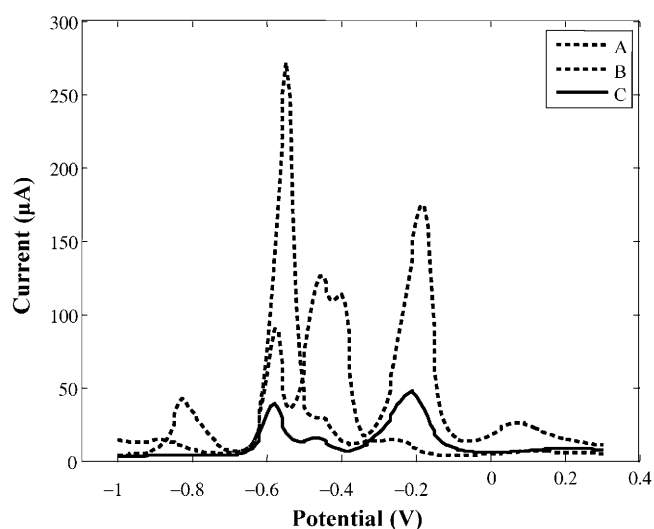


Fig. 2. Some voltammograms generated during the build of the response model. Sample composition: A) 11.30 ppm Pb, 11.30 ppm Cd, 18.50 ppm Cu, 4.22 ppm Tl and 17.17 ppm In; B) 12.12 ppm Pb, 16.70 ppm Cd, 2.83 ppm Cu, 9.62 ppm Tl and 4.27 ppm In; C) 5.13 ppm Pb, 7.18 ppm Cd, 11.41 ppm Cu, 4.02 ppm Tl and 17.95 ppm In.

which makes it difficult to directly extract the concentration of each component.

In order to resolve individual analytes from the ASV voltammograms of complex mixtures, the WNN models were programmed for the simultaneous quantification of metal species. The expected output error was programmed to reach a value of 0.025 ppm evaluated by the MSE error.

Several different parameters exist in a network architecture, some of them should be adjusted before training. One of the most important is known as *learning rate*, this parameter is used to determine the change in weights on each update, but unfortunately it is also a parameter for which is hard to find a suitable value. Other parameter is the number of epochs, this value is related with a stopping criteria. In our application, the learning rate and the maximum number of raining epochs were set to 0.0005 and 10 000, respectively. In all cases, the training error was reached in a number of iterations less than the maximum allowed.

To determine the WNN performance in quantification of metals, different comparison graphs between obtained and expected concentrations were built, both for training and for testing subsets. The linear regression of the comparison was a measure of the goodness of the model, given in ideal

conditions it should yield the diagonal identity line (slope 1 and intercept 0). Figure 3 shows the comparative graphs between real concentrations for lead, cadmium and copper and those predicted with the WNN model for training and testing subsets. The slope ( $m$ ) and intercept ( $b$ ) which defines the comparison line  $y=mx+b$  that best fits the data (along with the uncertainly interval for a 95% of significance) are shown for one of the study cases in Table 2, where the ideal situation is fulfilled in all cases (at the 95% confidence level). Simultaneously, the high level of linearity accomplished permits to express the low dispersion of obtained data.

Five extra training procedures, using the same WNN architecture, were programmed with random initialization of weights to verify the final model's consistency. Employing a 10-fold cross validation method, a testing set was selected each time randomly from the total set of the available data. To compare the accuracy of the predicted information, an average recovery yield was calculated for each WNN model [11]. Recovery yield ( $R_y$ ) is defined by Equation 3:

$$R_y = \frac{\sum_{i=1}^N 100 \cdot \left(1 + \frac{y_i - y_{\text{exp},i}}{y_{\text{exp},i}}\right)}{N} \quad (3)$$

where  $y_i$  is the  $i$ -th obtained concentration value,  $y_{\text{exp},i}$  is the  $i$ -th expected concentration value and  $N$  is the size of the external test set.

This information is showed graphically in Figure 4. In this figure, it is possible to observe the fluctuation of the  $R_y$  for each metal in the different WNN models.  $R_y$ 's value is a consequence of the random selection of the data, which in the worst case, never exceeds the 10% of the ideal  $R_y$ .

The mean recovery yield and standard deviation for different test can be seen in Figure 5. Accuracy of the predicted information is always below a 5% *RSD* uncertainly. This ensures the models' validity regardless of the data selection used to construct them.

To visualize the gain achieved with the proposed methodology, a number of synthetic samples with mixtures of the five metals were processed as described and their concentrations calculated by direct interpolation on a classic linear calibration, taking current values at characteristic potentials of each metal ( $-0.57$  V for  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $-0.86$  V for  $\text{Cd}^{2+}$  and  $-0.22$  V for  $\text{Cu}^{2+}$ ).

Table 3 summarizes this comparison, showing the obtained errors (in %) for the WNN model and for the direct

Table 2. Linear regression parameters for the comparison of obtained vs. expected data with the training and testing data sets using a WNN architecture whit four neurons in the hidden layer.

Metal	Trainig					Testing				
	$R$	$m$	$\Delta m$	$b$	$\Delta b$	$R$	$m$	$\Delta m$	$b$	$\Delta b$
$\text{Pb}^{2+}$	0.997	0.994	$\pm 0.030$	0.073	$\pm 0.391$	0.996	0.980	$\pm 0.069$	0.179	$\pm 0.928$
$\text{Cd}^{2+}$	0.986	0.960	$\pm 0.065$	0.345	$\pm 0.775$	0.989	0.986	$\pm 0.119$	0.134	$\pm 1.511$
$\text{Cu}^{2+}$	0.996	0.989	$\pm 0.038$	0.115	$\pm 0.462$	0.995	1.029	$\pm 0.088$	-0.412	$\pm 0.955$

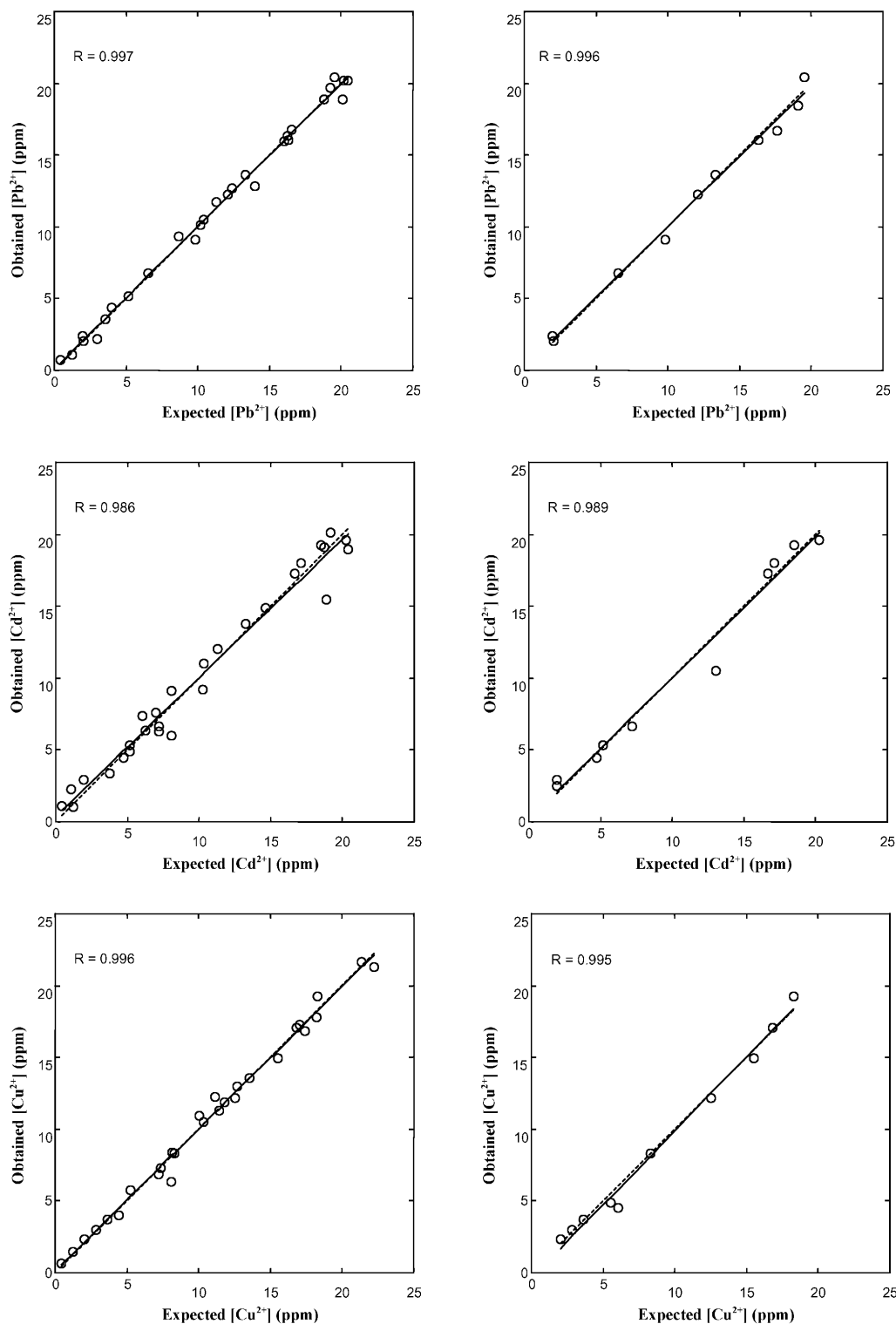


Fig. 3. Comparison between obtained results and those expected using a WNN model with four neurons in the hidden layer. The graphs correspond to lead, cadmium and copper. The dashed line corresponds to ideality ( $y = x$ ) and the solid line is the regression of the comparison data (correlation coefficient  $R$  is adjoined on each graph). Plots on the left correspond to training and plots on the right to external test subset.

interpolation. As it is clearly seen, the WNN yields values close enough to the expected ones (mean absolute errors between 4 and 11%) while the direct interpolation yields

error much larger, given the signal overlapping is not correctly considered and processed.

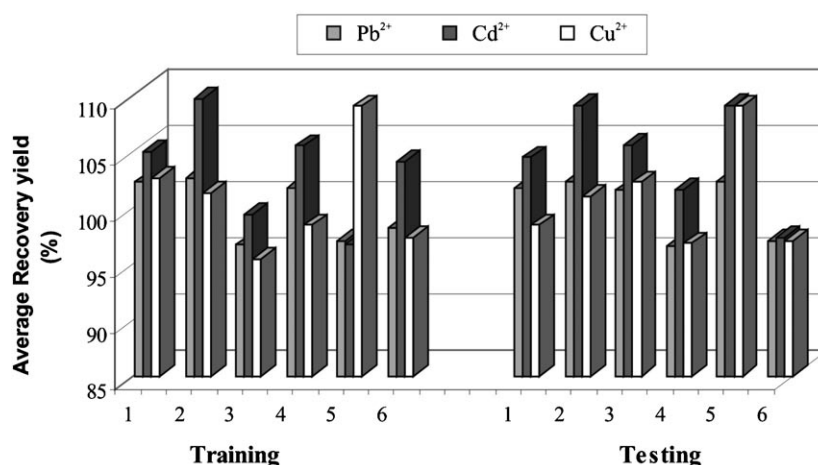


Fig. 4. Average recovery yield rated for the programmed WNN. Bars on the left correspond to each training session and bars on the right to the test set selected. The numbers below the x-axis, represent each WNN case.

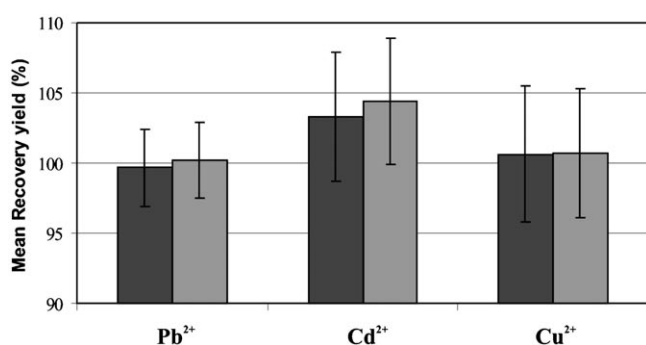


Fig. 5. Mean recovery yield and standard deviation obtained for the six WNN cases. In the representation, training is shown with dark grey and testing with light grey.

$$y=(0.780\pm 0.142)x+(2.120\pm 1.607) \text{ for training}$$

and

$$y=(0.452\pm 0.253)x+(5.035\pm 0.090) \text{ for testing.}$$

Recovery yield values calculated for Thallium in the six WNN models programmed, permits obtain an average of 96.978%, which means that the voltammograms contain enough analytical information able to predict concentrations near to reality. This situation does not occur for Indium. Although Indium was not correctly quantified, its presence was correctly compensated in the quantification of the other metals.

#### 4. Conclusions

In this paper a novel potential tool for voltammetric determinations is presented. A combination of ASV analytical technique and WNN permitted to obtain satisfactory results for the quantification of  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , even in

As well as for the metals of interest, the capability of the presented model was studied for the determination of the interfering metal  $\text{Tl}^+$ . The correlation coefficient obtained for  $\text{Tl}^+$  in the same study was acceptable ( $R=0.942$  for training and  $R=0.824$  for testing), comparison lines were

Table 3. Results obtained for the proposed WNN model and for direct interpolation. Mean absolute error of the obtained results, indicates overall deviation recorded.

Sample	WNN			Direct interpolation		
	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$
A	0.2	1.7	-0.8	18.9	-4.8	-63.6
B	-5.6	-24.0	-13.5	13.0	-69.5	-90.3
C	18.1	32.7	14.3	37.8	6.1	-14.5
D	0.2	-3.1	0.0	11.0	-54.0	-200.1
E	-7.6	-6.3	-3.2	-56.2	-71.1	-40.2
F	1.2	3.4	3.6	23.4	60.5	-53.9
G	-3.4	20.6	-34.7	-3.9	-154.9	-123.4
H	2.2	3.8	1.1	9.7	21.5	-96.1
I	-1.7	-9.3	-3.9	-55.1	-153.5	-56.5
J	3.1	5.0	1.3	-45.5	-45.8	-27.8
Mean absolute real error (%)	4.3	11.0	7.6	27.4	64.2	76.6

the presence of oxygen which commonly interferes in the range of potential studied. The methodology used was able to approximate semi-quantitatively the interfering  $Tl^+$  as well. However, no modeling was approached for the interfering  $In^{3+}$ , although its presence was properly counter-balanced, even at the 20 ppm level.

The experiments exhibited proper performance in all training and testing correlation coefficients, obtained from the expected vs. obtained concentrations comparison graphs, which were in all cases higher than 0.986.

When comparing the results obtained with the presented methodology and those obtained by direct interpolation in a simple linear calibration, the great potential of the WNN tool is demonstrated. The large errors by direct interpolation are caused by the strong overlapping effect, which does not allow to directly extract the contribution of each analyte in the mixture.

The multivariate models created with WNN describe correctly the complexity in the voltammograms caused by the overlapped peaks without any data pretreatment stage. Employing an appropriate family of wavelets (obtained at the end of the network's training), it is possible to interpret the analytical information present in the signal at different resolutions, ensuring a better interpretation of the input-output relationships. With the exposed information, it is possible to conclude that by using a WNN model, quantification of metals of interest at the sub-ppm level (lead, cadmium and copper) in the presence of interfering thallium and indium was attained, with average errors less than 5%.

The proposed data processing stage is able to be used as properly as other working electrodes, e.g. those employing mercury or bismuth, also without any oxygen removal. As an advantage, the use of carbon based electrodes brings the substitution of toxic and/or expensive materials for a simple and low cost transducer, capable to obtain sensitive results in the order of ppm. An additional benefit of the procedure is that no physical regeneration of the working electrode was necessary before each new experiment.

The proposed methodology is well suited for environmental monitoring purposes, giving the simplicity and robustness shown, where each electrode lasted for a minimum ca. 90 of determinations without any need of renewal of physical treatment.

## 5. Acknowledgements

This work has been developed under the PhD program in Chemistry at the Universitat Autònoma de Barcelona. Financial support for this work was provided by CONACYT (México) through the project "Apoyos Vinculados al Fortalecimiento de la Calidad del Posgrado Nacional, a la Consolidación de Grupos de Investigación, y de la Capacidad Tecnológica de las Empresas. Vertiente II". Mobility of researchers was possible through the Alfa network Bio-SenIntg (Alfa II-0486-FCFA-FCD-FI, European Union) and AECI project AMALENG (A/012192/07).

## 6. References

- [1] H. Xu, L. Zeng, D. Huang, Y. Xian, L. Jin, *Food Chem.* **2008**, *109*, 834.
- [2] G. H. Hwang, W. K. Han, J. S. Park, S. G. Kang, *Talanta* **2008**, *76*, 301.
- [3] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, C. E. Efstathiou, *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 5294.
- [4] N. Serrano, A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 6616.
- [5] Z. Zou, A. Jang, E. MacKnight, P. M. Wu, J. Do, P. L. Bishop, C. H. Ahn, *Sens. Actuators B, Chem.* **2008**, *134*, 18.
- [6] M. A. Baldo, C. Bragato, G. A. Mazzocchin, S. Daniele, *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 3413.
- [7] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, E. Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *405*, 153.
- [8] L. Moreno-Baron, A. Merkoçi, S. Alegret, *Electrochim. Acta*, **2003**, *48*, 2599.
- [9] M. A. El Mhammedi, M. Achak, A. Chtaini, *J. Hazard Mater.* **2008**, *161*, 55.
- [10] L. Moreno-Baron, R. Cartas, A. Merkoçi, S. Alegret, J. M. Gutiérrez, L. Leija, P. R. Hernández, R. Muñoz, M. del Valle, *Anal. Lett.* **2005**, *38*, 2189.
- [11] A. Gutiérrez, F. Céspedes, R. Cartas, S. Alegret, M. del Valle, J. M. Gutiérrez, R. Muñoz, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **2006**, *83*, 169.
- [12] J. M. Gutiérrez, A. Gutiérrez, F. Céspedes, M. del Valle, R. Muñoz, *Talanta* **2008**, *76*, 373.
- [13] R. M. Latorre, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, *J. Chromatogr. A* **2000**, *871*, 331.
- [14] K. Y. Lee, Y. Muraoka, M. Oshima, S. Motomizu, *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 183.
- [15] A. A. Karanasiou, N. S. Thomaidis, K. Eleftheriadis, P. A. Siskos, *Talanta* **2005**, *65*, 1196.
- [16] L. Moreno, A. Merkoçi, S. Alegret, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *507*, 251.
- [17] A. Gutiérrez, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle, *Anal. Bional. Chem.* **2005**, *382*, 471.
- [18] A. Gutiérrez, D. Calvo, F. Céspedes, M. del Valle, *Microchim. Acta* **2007**, *157*, 1.
- [19] F. Despagne, D. L. Massart, *Analyst* **1998**, *123*, 157R.
- [20] Q. Zhang, A. Benveniste, *IEEE Trans. Neural Netw.* **1992**, *3*, 889.
- [21] B. R. Bhakshi, G. Stephanopoulos, *AIChE J.* **1993**, *39*, 57.
- [22] L. Cao, Y. Hong, H. Fang, G. He, *Physica D.* **1995**, *85*, 225.
- [23] H. Szu, B. Telfer, J. Garcia, *Neural Netw.* **1996**, *9*, 695.
- [24] L. Liu, Q. Guo, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39*, 133.
- [25] X. Zhang, J. Qi, R. Zhang, M. Liu, Z. Hu, H. Xue, B. Fan, *J. Comput. Chem.* **2001**, *25*, 125.
- [26] T. Khayamian, M. Esteki, *J. Supercrit. Fluids* **2004**, *32*, 73.
- [27] Z. Kardanpour, B. Hemmateenejad, T. Khayamian, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *531*, 285.
- [28] R. Tabaraki, T. Khayamian, A. A. Ensafi, *J. Mol. Graph.* **2005**, *25*, 46.
- [29] H. Zhong, J. Zhang, M. Gao, J. Zheng, G. Li, L. Chen, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *59*, 67.
- [30] K. Zarei, M. Atabati, *Anal. Lett.* **2006**, *39*, 2085.
- [31] T. Khayamian, A. A. Ensafi, A. Bendivi, *Talanta* **2006**, *69*, 1176.
- [32] F. Céspedes, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 276.
- [33] Y. Meyer, *Wavelets: Algorithms and Applications*, Society for Industrial and Applied Mathematics, SIAM, Philadelphia, PA **1994**.
- [34] H. Chan, A. Butler, D. M. Falck, M. S. Freund, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2373.