

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA EN ACUEDUCTOS DE LOS  
MUNICIPIOS DE NORTE DE SANTANDER (TOLEDO Y PAMPLONA), A TRAVÉS  
DE UN MUESTREADOR DE ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO ACOPLADO A UN  
SISTEMA DE PERCEPCIÓN SENSORIAL**



JENIFFER KATERINE CARRILLO GÓMEZ

Director. CRISTHIAN MANUEL DURÁN ACEVEDO

Codirector: RAMÓN OVIDIO GARCÍA RICO

Maestría en Controles Industriales

Facultad de Ingenierías y Arquitectura

Universidad de Pamplona

2018

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante mi formación profesional. A mi madre LUCIA GÓMEZ, por ser el pilar más importante de mi vida, por demostrarme su cariño, apoyo incondicional, por velar siempre por mi bienestar y depositar su entera confianza en cada reto que se me presenta sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ello que gracias ella soy lo que soy ahora. A mis familiares por el apoyo incondicional en mi carrera y logros.

A mi novio CRISTHIAN DURÁN, que con su valor y entrega ha sido una persona incondicional en mi vida, ha sido mi soporte, mi fuerza, mi consejero, mi apoyo, mi luz, mi guía, mi todo, para seguir adelante y no bajar los brazos en los momentos difíciles. Gracias por ser por ese hombre maravilloso, por haber dedicado tiempo y esfuerzo para ayudarme a culminar una meta más, por ser mi pareja idónea, por ser un ejemplo a seguir.

## Agradecimientos

iii

Este proyecto es el resultado de la dedicación y esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por esto agradezco a mis directores, los doctores CRISTHIAN DURÁN Y OVIDIO GRACIA, por sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigadora.

Como prioridad en mi vida agradezco a Dios por su infinita bondad, y por haber estado conmigo en los momentos que más lo necesitaba, por darme salud, fortaleza, responsabilidad y sabiduría, por haberme permitido culminar un peldaño más de mis metas, y porque tengo la certeza y el gozo de que siempre va a estar conmigo. A mis padres, por haber estado conmigo apoyándome en los momentos difíciles, por dedicar tiempo y esfuerzo para ser una mujer de bien, y darme excelentes consejos en mi caminar diario

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida.

El presente estudio consiste en el desarrollo e implementación de un equipo muestreador “Headspace” estático (MECS), que cumple la función de concentrar y extraer los diferentes compuestos orgánicos volátiles (VOC’s) emitidos por especies bacterianas (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Klebsiella Oxytoca*) suspendidas en muestras de agua contaminada en el laboratorio y muestras de agua recolectadas en las diferentes estructuras (Entrada a la planta, después de la sedimentación, salida de la planta y agua de grifo) de las plantas de tratamiento de agua potable de los municipios de Toledo y Pamplona. El MECS fue acoplado a un sistema de percepción sensorial compuesto por una cámara de 16 sensores de óxidos metálicos que fue usada como una alternativa de monitoreo continuo para evaluar la calidad del agua mediante la detección e identificación de las bacterias, con tiempos de respuesta rápido, bajo costo, en comparación con los métodos convencionales.

La metodología se dividió en tres etapas, en ellas se evaluaron algunos parámetros analíticos como la especificidad, selectividad y sensibilidad, con el objetivo de validar e implementar la técnica propuesta (MECS acoplado a un olfato electrónico) para la determinación de contaminantes bacterianos en el agua. La primera etapa consistió en analizar muestras de agua estéril y contaminadas con *Escherichia coli*, modificando la temperatura de incubación en los viales (50°C, 70°C y 90°C), esto se realizó con el fin de verificar la temperatura óptima a la cual el olfato electrónico acoplado al equipo de extracción consigue discriminar entre el control negativo y la muestra con el analito de interés (*E. coli*). Una vez finalizada la etapa 1 y de acuerdo con los resultados obtenidos, se escogió la temperatura óptima de mejor clasificación del agua estéril y *E. coli* (50°C) para realizar pruebas de especificidad/selectividad del método propuesto. Con la especificidad se buscó evaluar la capacidad del sistema para diferenciar el analito de interés, en este caso *E. coli*, que es una bacteria indicadora de contaminación fecal en aguas (control positivo), de otros analitos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, que son similares y pueden tender a la confusión (controles de especificidad). Los resultados obtenidos fueron comparados con la muestra sin contaminación bacteriana, agua estéril (control negativo). Por último, se evaluó la sensibilidad del método, para ello se realizaron diluciones del control positivo para disminuir progresivamente la población bacteriana en suspensión, con el fin de estimar la población bacteriana más pequeña que el sistema fuera capaz de detectar. Es decir, con esto se busca determinar la capacidad para detectar la bacteria (*E. Coli*) en bajas concentraciones.

La validación de la técnica propuesta se realizó tomando agua de las diferentes operaciones unitarias de las plantas de tratamiento de agua potable del municipio de Toledo y Pamplona, las cuales fueron analizadas por el método de filtración por membrana en los laboratorios de la Universidad de Pamplona en paralelo con el sistema de olfato electrónico acoplado a un MECS, para verificar la presencia de la bacteria y los rangos de concentración.

Los resultados obtenidos demostraron que la metodología propuesta e implementada logró discriminar entre muestras de agua contaminada por varias especies bacterianas y agua estéril, adicionalmente fue capaz de predecir los rangos de concentración de *Escherichia coli* en muestras de agua de las PTAP, estos resultados se vieron reflejados en las técnicas de reconocimiento de patrones (PCA, DFA, PNN), obteniéndose porcentajes de clasificación y discriminación de más del 80%.

## Tabla de contenido

v

CAPITULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	5
1.3. OBJETIVOS .....	6
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
CAPITULO 2:.....	7
CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA POTABLE .....	7
2.1. Filtración por membrana.....	9
2.2. Microextracción de fase solida (SPME) por espacio de cabeza (HS) .....	12
2.3. Acoplamiento de la cromatografía de gases – espectrometría de masas. ....	13
CAPITULO 3:.....	16
SISTEMA DE OLFATO ELECTRÓNICO.....	16
3.1. ¿Qué es el sistema de olfato electrónico? .....	16
3.2. Funcionamiento del olfato electrónico.....	16
3.3. Aplicaciones del sistema de olfato electrónico en calidad.....	19
3.4. Limitaciones del olfato electrónico.....	22
CAPITULO 4:.....	25
PROCESADO DE DATOS .....	25
4.1. Algoritmos de reconocimiento de patrones .....	25
4.2. Acondicionamiento de la señal .....	26

4.3.	Pre-procesador de los datos .....	26vi
4.4.	Reducción de variables .....	29
4.4.1.	Análisis de Componentes Principales (PCA): .....	30
4.4.2.	La función de análisis discriminante (DFA).....	31
4.5.	Clasificación .....	32
4.5.1.	Redes neuronales .....	32
4.5.2.	Ventajas que ofrecen las redes neuronales.....	33
4.5.3.	Red PNN (Probabilistic Neural Networks).....	33
CAPITULO 5:.....		36
DESARROLLO DEL EQUIPO DE EXTRACCIÓN.....		36
5.1.	Diseño del muestreador de espacio de cabeza estático (MECS) para extraer los VOC's. .....	36
5.1.1.	Introducción .....	37
5.1.1.1.	Formación del espacio de cabeza.....	39
5.1.1.2.	Formación del espacio de cabeza.....	40
5.1.1.3.	Procedimientos de inyección de muestra .....	40
5.1.1.4.	Factores que afectan la calidad de la clasificación .....	40
5.1.1.4.1.	La temperatura .....	41
5.1.1.4.2.	La humedad.....	41
5.1.1.4.3.	Tiempo de extracción.....	42
5.1.1.4.4.	Volumen del espacio de cabeza y forma del vial.....	42
5.1.2.	Descripción general del muestreador de espacio de cabeza estático (MECS).....	42
5.1.2.1.	Características técnicas del sistema de calentamiento .....	44

5.1.2.2. Controlador PID de temperatura.....	45vii
5.1.2.2.1. Calculo del controlador.....	46
5.2. Sistema de olfato electrónico .....	52
5.3. Acondicionamiento de las muestras.....	55
5.3.1. Preparación de los controles .....	55
5.3.1. Control negativo.....	55
5.3.2. Control positivo y de especificidad.....	55
5.4. Realización de las medidas. ....	57
5.4.1 Primera etapa. ....	57
5.4.2. Segunda etapa .....	58
5.4.3. Tercera etapa.....	59
5.5. Adquisición de medidas, análisis y procesado de datos. ....	60
5.6. Validación del sistema .....	61
CAPITULO 6:.....	63
ANÁLISIS Y RESULTADOS .....	63
6.1. Primera etapa (Pruebas del sistema con muestras de agua estéril y Escherichia coli a diferentes temperaturas).....	63
6.2. Segunda etapa (Pruebas del sistema con muestras de agua estéril, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Klebsiella oxytoca).....	68
6.3. Tercera etapa (Pruebas del sistema para evaluar la sensibilidad del método, disminuyendo progresivamente la población bacteriana).....	74
6.4. Validación del sistema .....	76

6.4.1. Comparación entre las muestras recolectadas en la planta, agua estéril y muestras contaminadas con <i>E-coli</i> .....	viii 77
6.4.2. Comparación entre las muestras recolectadas en la planta, agua estéril y muestras contaminadas con <i>E-coli</i> a diferentes concentraciones.....	78
6.4.2.1. Planta de Empopamplona del municipio de Pamplona.....	78
6.4.2.2. Planta del municipio de Toledo. ....	81
CONCLUSIONES .....	85
REFERENCIAS.....	87



## Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de las operaciones unitarias que conforman la planta de tratamiento de agua potable.....	7
Figura 2. Procedimiento de la técnica de filtración por membrana. ....	10
Figura 3. Recuento de coliformes totales y E. coli .....	10
<i>Figura 4. Proceso de extracción por espacio de cabeza (HS) y proceso de desorción en cromatografía de gases. ....</i>	<i>13</i>
Figura 5. Vista simplificada de detección e identificación de bacterias: Métodos convencionales y método propuesto.....	14
Figura 6. Módulos del sistema de olfato electrónico .....	16
Figura 7. Bloques de un sistema de reconocimiento de patrones para una nariz electrónica. ....	18
Figura 8. Topología de un modelo neuronal PNN.....	34
Figura 9. Esquema general de la metodología implementada .....	36
Figura 10. . Vial en que se crea un equilibrio estático.....	39
Figura 11. Factores que afectan la medición. ....	40
Figura 12. Diseño del sistema de extracción estático (MECS).....	43
Figura 13. Visualización de los parámetros a trabajar.....	44
Figura 14. Comportamiento entrada- salida del sistema.....	46
Figura 15. Método a lazo abierto o curva de reacción.....	47
Figura 16. Curva de Reacción del Proceso usando el método de los dos Puntos. ....	47
Figura 17. Respuesta del sistema de control a 50°C.....	51
Figura 18. Respuesta del sistema de control a 70°C.....	51

Figura 19. Respuesta del sistema de control a 90°C.....	51x
Figura 20. Tiempos de concentración, adquisición y limpieza programados para cada medida..	52
Figura 21. Nariz electrónica B-NOSE acoplada al muestreador de espacio de cabeza estático...	54
Figura 22. Metodología para la inoculación e incubación de las muestras. ....	56
Figura 23. Acondicionamiento de la muestra en los viales .....	56
Figura 24. Procedimiento llevado a cabo para la dilución del control positivo.....	59
Figura 25. Estructura de la PTAP del municipio de Toledo. ....	62
Figura 26. Estructura de la PTAP del municipio de Pamplona .....	62
Figura 27. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 90°C.....	63
Figura 28. Resultados con análisis de funcionamiento de discriminantes (DFA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 90°C .....	64
Figura 29. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 70°C.....	64
Figura 30. Resultados con análisis de funcionamiento de discriminantes (DFA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 70°C.....	65
Figura 31. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 50°C.....	65
Figura 32. Resultados con análisis de funcionamiento de discriminantes (DFA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 50°C .....	66
Figura 33. Resultados con análisis de tres componentes principales (PCA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 50°C.....	66
Figura 34. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de Agua estéril.....	69

Figura 35. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de Escherichia coli .....	70xi
Figura 36. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de Pseudomonas aeruginosa... 70	
Figura 37. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de Klebsiella oxytoca .....	71
Figura 38. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril, E-coli, Pseudomonas y Klebsiella a 50°C. ....	72
Figura 39. Resultados con análisis de componentes principales (DFA) de Agua estéril, E-coli, Pseudomonas y Klebsiella a 50°C. ....	72
Figura 40. Resultados obtenidos usando una red neurona PNN para la clasificación de Agua estéril, E-coli, Klebsiella y Pseudomonas a 50°C. ....	73
Figura 41. Resultados obtenidos usando una red neurona PNN con Leave-one-out, para la clasificación de Agua estéril, E-coli, Pseudomonas y Klebsiella a 50°C. ....	73
Figura 42. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y diferentes concentraciones de E-coli .....	74
Figura 43. Resultados con análisis de componentes principales (DFA) de Agua estéril y diferentes concentraciones de E-coli .....	75
Figura 44. Comparación entre las muestras de la planta, agua estéril y E-coli. Planta Empopamplona .....	77
Figura 45. Comparación entre las muestras de la planta, agua estéril y E-coli. Planta de Toledo .....	77
Figura 46. Resultado del análisis con PCA del conjunto de medidas de las muestras entrenamiento vs muestras extraídas de la planta Empopamplona.....	79
Figura 47. Resultado del análisis con DFA del conjunto de medidas de las muestras entrenamiento vs muestras extraídas de la planta Empopamplona.....	80

Figura 48. Resultado del análisis con PCA del conjunto de medidas de las muestrasxii entrenamiento vs muestras extraídas de la planta de Toledo.....	82
Figura 49. Recuento de E. coli en las muestras de la PTAP de Toledo.....	84

## Lista de tablas

Tabla 1. Características microbiológicas .....	9
Tabla 2. Clasificación de los distintos tipos de sensores de gases en función de su principio de operación.....	17
Tabla 3. Aplicación de olfato electrónico en la detección de microorganismos. ....	20
Tabla 4. Métodos de extracción de parámetros. ....	27
<i>Tabla 5. Métodos de normalización utilizados en el preprocesado de la señal de los sensores. .</i>	<i>28</i>
Tabla 6. Descripción de parámetros.....	44
Tabla 7. Características de un termopar tipo K.....	45
Tabla 8. Datos adquiridos variando la señal PWM.....	45
Tabla 9. Parámetros de sintonización usando el Método de Ziegler-Nichols a Lazo.....	49
Tabla 10. Lista de los sensores que componen la matriz de sensores de la B-NOSE .....	53
Tabla 11. Parámetros usados para la discriminación de las muestras.....	58
Tabla 12. Concentraciones iniciales y finales después de la incubación. ....	60
Tabla 13. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril y <i>Escherichia coli</i> a diferentes temperaturas.....	67
Tabla 14. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> . ....	74
Tabla 15. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril y concentraciones de <i>Escherichia coli</i> .....	76

Tabla 16. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua <sup>xiv</sup> estéril, concentraciones de Escherichia coli y muestras de la planta de Empopamplona.....	78
Tabla 17. Análisis microbiológico usando el método de filtración por membrana. PTAP de Pamplona.....	81
Tabla 18. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril, concentraciones de Escherichia coli y muestras de la planta de Toledo.....	81
Tabla 19. Análisis microbiológico usando el método de filtración por membrana. PTAP de Toledo. .....	83

# **CAPITULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003) en las guías para la calidad del agua potable, establece la ausencia de cualquier microorganismo en el agua potable para consumo humano que pueda afectar la salud del consumidor, este parámetro es utilizado como guía de calidad para la creación de reglamentos o normas, también sirve para evaluar los riesgos de contaminación, vigilar los procesos de tratamiento y hacer planes correctivos para alcanzar la calidad deseada. En Colombia la calidad microbiológica solo incluye el control de bacterias como coliformes totales y fecales. Para la detección de los contaminantes microbiológicos en agua se usan técnicas convencionales como: Fermentación de tubos múltiples, filtración por membrana, enzima sustrato, sustrato definido, entre otros, sin embargo, hay que recalcar que estos métodos son tediosos, representan altos costos, tiempos de análisis, siendo un obstáculo para establecer la calidad microbiana del agua para consumo humano.

Una forma de evaluar la calidad microbiológica del agua para el consumo humano, es monitorear constantemente un indicador bacteriano tan importante como *Escherichia coli* (Edberg *et al.*, 2012) una bacteria Gram (-) de la familia Enterobacteriaceae, considerada el principal integrante del grupo de los coliformes fecales. Actualmente existe una gran limitación para determinar *E. Coli* u otro tipo de bacterias en el agua, esto se debe a que la mayoría de plantas de tratamiento de agua potable no cuentan con laboratorios, tecnologías especializadas, equipos, insumos, personal capacitado que permita realizar dichas pruebas microbiológicas, limitando su frecuencia de análisis (1 a 2 veces al mes), ya que deben enviarse muestras a laboratorios certificados generando costos, errores derivados del muestreo que pueden alterar los análisis y retrasos en la obtención de resultados, es por eso que las limitaciones de los métodos convencionales han llevado a que las investigaciones se centren en el desarrollo de métodos rápidos y precisos para identificar bacterias.

Para un monitoreo continuo, tiempos de respuesta rápido y bajo costo, se han desarrollado nuevas técnicas usando un sistema multisensorial (olfato electrónico), este se ha investigado como una alternativa, reemplazando los métodos convencionales usados para la detección e identificación de bacterias (Gardner *et al.*, 1998; McEntegart *et al.*, 2000; Lakshmanan *et al.*, 2007; Siripatrawan's, 2008; Green *et al.*, 2011; Krishnamurthy *et al.*, 2012; Nuñez *et al.*, 2013; Geoffrey *et al.*, 2014).

Según las investigaciones, el sistema de olfato electrónico se puede utilizar para el análisis específico, identificación y reconocimiento de olores complejos y compuestos orgánicos volátiles, ya que está conformado por un conjunto de sensores de gases químicos con sensibilidades parcialmente solapadas (Duran, 2005). Dentro de los subsistemas del equipo

multisensorial se encuentra la etapa de acondicionamiento de la muestra, por lo tanto, es importante preparar la muestra con las condiciones adecuadas con el objetivo de que los sensores de gases tengan buena sensibilidad y selectividad a la hora de detectar los VOC's emanados por las especies bacterianas. Una forma de aumentar la sensibilidad y selectividad es incorporando métodos de concentración de la muestra, para ello existen técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME) que consta de dos pasos: extracción y desorción del analito, aunque este método es muy eficaz depende de ciertos parámetros de muestreo como el tipo de recubrimiento de la fibra (los VOC's varían de acuerdo al tipo de fibra), el tiempo de extracción, tiempo de equilibrio, la temperatura de extracción y desorción. Adicionalmente existen técnicas de espacio de cabeza (HS) dinámico y estático, la primera consiste en someter una muestra a una temperatura determinada mediante un gas inerte (Herrero et al., 2016). Los compuestos volátiles son retenidos posteriormente en una trampa adsorbente, que a continuación se somete a desorción mediante un disolvente y se inyecta para su separación por cromatografía de gases. La técnica de espacio de cabeza estático es de aplicación muy simple y bajo costo, es por eso que en esta investigación se diseñó e implementó un sistema muestreador de espacio de cabeza estático, el cual consiste en introducir la muestra en un vial cerrado mediante un septum, aplicando una determinada temperatura con el objeto de extraer una alícuota de la fracción de vapor con una jeringa para muestras gaseosas, que se inyectan en el cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas (GC-MS) (Sauer *et al.*, 2010), en nuestro caso a un sistema de olfato electrónico compuesto por 16 sensores de óxido metálico, que transforman las señales recibidas en señales eléctricas, adquiriendo la información y extrayendo rasgos característicos de las muestras examinadas. A través de métodos de reconocimiento de patrones tales como: Análisis de Componentes Principales (PCA), función de discriminantes (DFA), redes neuronales (PNN) o inteligencia artificial, se discriminaron y/o clasificaron los compuestos generados por las diferentes muestras.



## **1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La calidad del agua tiene consecuencias importantes sobre la salud humana, en los últimos años ha ido incrementando la ocurrencia de diversas enfermedades relacionadas con el uso del agua con presencia de microorganismos como *E. coli* (Gomez, 2015) y sustancias químicas. En Colombia la calidad microbiológica solo incluye el control de bacterias como coliformes totales y fecales como la *Escherichia Coli*, esta última es elegida como indicador de contaminación fecal y es importante en la verificación de la calidad microbiológica del agua, sin embargo, también se han propuesto otras bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*) para ser usados como indicadores complementarios (Ríos, et al., 2017). La resolución 2115/2007 en su artículo 25 expone los valores admisibles desde el punto de vista microbiológicos donde nos indica que el valor permitido para estos microorganismos es de cero/100ml cuando se trata de agua para el consumo humano. La presencia de *E. Coli* en muestras de agua potable, indica la existencia de fallas en la eficiencia del tratamiento de agua, proceso de desinfección en las plantas de tratamiento y sistema de distribución indicando que se debe investigar el origen de la contaminación de inmediato para tomar las respectivas medidas correctivas, preventivas y así producir un agua de alta calidad para el consumo humano y que cumpla con las exigencias de la normatividad.

Hoy en día existe una gran limitación para determinar *E. coli* u otro tipo de bacterias en el agua, esto se debe a que la mayoría de plantas de tratamiento de agua potable no cuentan con laboratorios, tecnologías especializadas que requieren alta inversión inicial, equipos, insumos, personal capacitado que permita realizar dichas pruebas microbiológicas, limitando su frecuencia de análisis (1 a 2 veces al mes) ya que deben enviarse muestras a laboratorios certificados generando costos, errores derivados del muestreo que pueden alterar los análisis y retrasos en la obtención de resultados, por otro lado para detectar e identificar las bacterias se han usado métodos tradicionales como recuentos en placa, estos métodos son tediosos y requieren demasiado tiempo (de 2 días en adelante dependiendo el método y la bacteria que se esté identificando) e impiden al operador o jefe encargado de la planta hacer un seguimiento en línea y tomar un plan de mejora en el proceso de tratamiento en caso de que los resultados sean positivos.

Esta propuesta se llevó a cabo en las plantas de tratamiento de agua potable de los municipios de Pamplona y Toledo. La mayor problemática observada, radica en el municipio de Toledo ya que sus instalaciones y equipos son obsoletos, generando una baja eficiencia del agua potable suministrada, adicionalmente para evaluar la calidad del agua desde el punto de vista microbiano la planta no cuenta con laboratorios, equipos, personal calificado para realizar los análisis microbiológicos diarios que permitan a los operadores hacer un seguimiento y mejorar el proceso de remoción de bacterias presentes en el agua. Para realizar los análisis microbiológicos el jefe de planta debe enviar muestras a laboratorios en la ciudad de Cúcuta una vez al mes proporcionando demoras en la obtención de resultados ya que implica tiempo a la hora de tomar y transportar las muestras

y hacer la detección e identificación de las bacterias usando métodos convencionales. En cuanto la planta del municipio de Pamplona esta cuenta con laboratorios y los equipos necesarios para realizar los análisis, pero la problemática radica en forma similar a la planta de Toledo en la demora para la obtención de resultados.

¿El desarrollo de la técnica de un sistema de olfato electrónico acoplado a un sistema de extracción de espacio de cabeza estático permite detectar contaminantes bacterianos en el agua proveniente de las plantas de tratamiento de agua potable del municipio de Toledo y Pamplona y sirve como herramienta de bajo costo, fácil implementación reducción de tiempo en la obtención de resultados para evaluar la calidad del agua en tiempo real?

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Existe una necesidad de mejorar y realizar un monitoreo en línea del agua proveniente de las plantas de tratamiento de agua potable, esto se debe a que los métodos de detección de bacterias realizados en los laboratorios son costosos, requieren de material y personal calificado, adicionalmente la obtención de resultados es demasiado lenta para poder desarrollar por parte de los operadores o las empresas una respuesta operativa, correctiva para proporcionar un nivel de la protección de la salud pública en tiempo real. Hay una gran necesidad de incorporar nuevos métodos que sean capaz de detectar rápidamente la contaminación bacteriana, debido a la potencial graves consecuencias para la salud humana.

Ante la situación planteada se propuso evaluar la calidad del agua a través de un monitoreo continuo con tiempos de respuesta rápido y bajo costo usando un sistema muestreador de espacio de cabeza estático (MECS) que permita generar y extraer de los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) que son emanados por las bacterias indicadoras de contaminación del agua.

El sistema propuesto tendrá como principales ventajas: La reducción de costos y tiempo para obtener resultados en comparación con las técnicas convencionales, ya que los análisis se podrán realizar in-situ y se podrá hacer una detección e identificación de *E. coli* y otros tipos de bacterias en tiempo real. Como un resultado destacado de la propuesta es la implementación y uso por parte de los operarios o personal de cada una de las plantas, ya que el sistema servirá de apoyo importante como una herramienta preventiva y de gestión, garantizando una buena remoción de contaminantes en el agua proveniente del acueducto de los municipios de Toledo y Pamplona y así producir un agua de alta calidad para el consumo humano y que cumpla con las exigencias de la normatividad.

## **1.3. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la calidad del agua en acueductos de municipios de norte de Santander (Toledo y Pamplona), a través de un muestreador de espacio de cabeza estático acoplado a un sistema de percepción sensorial.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar el estudio de acondicionamiento de las muestras (control positivo, negativo y de especificidad) en el laboratorio de microbiología mediante condiciones controladas.
- Diseñar un sistema de extracción de espacio de cabeza estático para concentrar y extraer los compuestos volátiles orgánicos emanados por las especies bacterianas y muestras de agua estéril.
- Implementar un equipo de medición multisensorial compuesto por una cámara de sensores de óxidos metálicos, para la detección de los compuestos volátiles orgánicos emitidos por las muestras contaminadas y libres de cualquier contaminante microbiano.
- Acoplar el instrumento de medida al muestreador para la detección de las bacterias en las muestras de agua.
- Realizar la etapa pre-procesamiento y procesamiento de datos (Reconocimiento de patrones e inteligencia artificial).
- Validar el funcionamiento del sistema mediante la comparación con métodos convencionales.

## **CAPITULO 2:**

# **CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA**

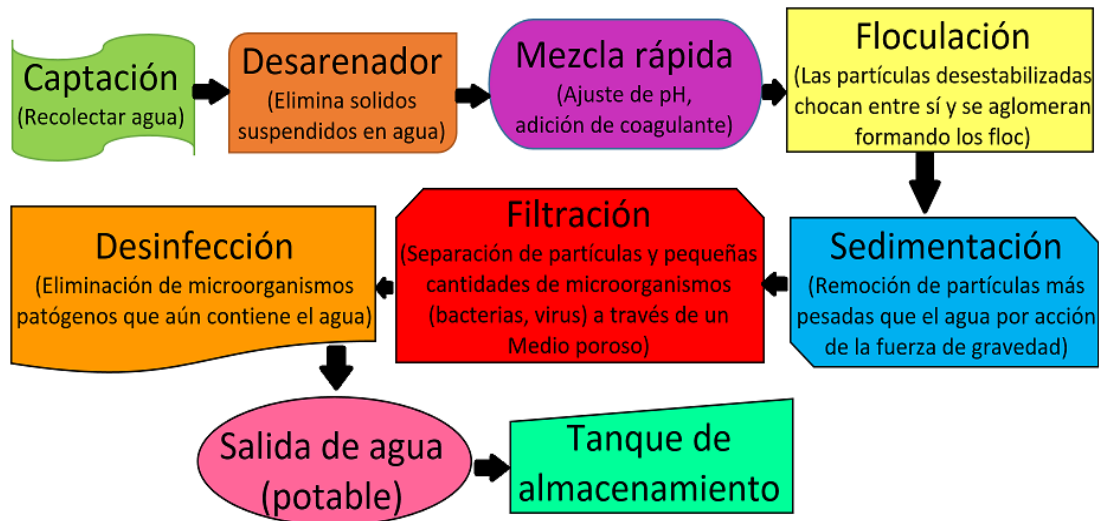
## **POTABLE**

El agua es esencial y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio. El acondicionamiento del agua para el consumo humano es un proceso que implica varios procesos para su potabilización y su complejidad depende de las características del agua cruda.

La evaluación de los sistemas de tratamiento para potabilización de agua para consumo humano es una herramienta importante para conocer su operación y permitir ajustar los parámetros operacionales de acuerdo al diseño preconcebido de la planta y en función de la calidad del agua a tratar (Hurtado Giraldo, 2016). Durante el proceso de potabilización, el agua pasa por algunas operaciones unitarias con el fin de eliminar la materia en suspensión, eliminación de bacterias y microorganismos que pueden alterar nuestra salud (Chulluncuy Camacho, 2011).

Esta investigación se desarrolló en dos municipios de Norte de Santander: Toledo y Pamplona. La planta de tratamiento de agua potable (PTAP) del municipio de Toledo, es de tipo convencional con filtración rápida y recibe únicamente agua de la aducción que parte del desarenador de la captación de la quebrada Los Remansos, la planta tiene una capacidad de 35 litros por segundo (L/s) como caudal de diseño, pero opera entre 30 a 35 L/s, volumen suficiente para cubrir la demanda actual de la población. En cuanto la planta del municipio de Pamplona recoge agua de dos fuentes superficiales El Rosal y Cariongo o Monteadentro, con una capacidad de operación de 110 L/s. A continuación, en la Figura 1 se describe de forma general las estructuras que hacen parte del tratamiento del agua potable en las plantas de tratamiento.

*Figura 1. Diagrama de las operaciones unitarias que conforman la planta de tratamiento de agua potable.*



*Fuente: La autora*

Hoy en día es de gran importancia, mejorar las condiciones de acceso al agua potable, ya que esta puede proporcionar beneficios o repercusiones, por lo tanto, el tema de la calidad del agua para consumo humano preocupa cada vez más a los países de todo el mundo, principalmente al sector de la salud (OMS, 2003). , por esta razón hoy en día es muy importante realizar el seguimiento y vigilancia de la calidad del agua potable desde el afluente que entra a la planta para su tratamiento, el efluente y el agua en la red de distribución de los sistemas de suministro.

La vigilancia de la calidad del agua, la prevención y el control de riesgos para la salud causados por el consumo de agua contaminada suministrada por las personas prestadoras del servicio del acueducto, debe cumplir con ciertos parámetros (análisis organolépticos, físicos, químicos y microbiológicos) establecidos en el decreto 475 (1998). Los parámetros incorporados en esta norma indican un porcentaje de aporte al análisis de calidad de agua, las propiedades organolépticas básicas (color aparente, turbiedad, pH, cloro residual libre, olor y sabor) tienen un aporte del 22.5%, las características químicas (aluminio, alcalinidad total, dureza total, sulfatos , calcio, cloruros, magnesio, fosfatos, manganeso, molibdeno, zinc , hierro total, nitratos, nitritos, fluoruros, metales y carbono orgánico total), que aporta 37.5% del total; características microbiológicas (coliformes totales y fecales) con el restante 40% del puntaje. Según los porcentajes las características microbiológicas juegan un papel muy importante a la hora de evaluar la calidad del agua, ya que tiene una fuerte incidencia en la salud de las personas y sirve como vehículo de muchos microorganismos causadores de enfermedades, mayormente provenientes de la contaminación por excrementos humanos y de otros animales.

La resolución número 2115 (2007), señala las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua. En el capítulo tres de la resolución, se indican los valores máximos aceptados (1 Unidad Formadora de

Colonia (UFC) o 1 microorganismo en 100 cm<sup>3</sup> de muestra) desde el punto de vista microbiológico que debe tener el agua usada para el consumo humano. Conforme a lo mencionado se puede decir que el agua apta para consumo humano, no debe contener microorganismos patógenos y debe estar libre de bacterias indicadoras de contaminación fecal.

Como indicadores de contaminación fecal, las bacterias de referencia elegidas son las del grupo de coliformes fecales, la principal representante de ese grupo de bacterias es *Escherichia coli*, que es usada como indicador general de monitoreo de calidad del agua. En la actualidad existen varias técnicas como Filtración por membrana, Sustrato Definido, enzima sustrato y presencia – ausencia, que son empleadas para la detección y cuantificación de *Escherichia coli* y coliformes totales. La Tabla 1, indica las técnicas usadas para determinar coliformes totales y *Escherichia coli*, adicionalmente indica los valores permisibles de la cantidad de microorganismos en las muestras de agua.

*Tabla 1. Características microbiológicas*

<b>Técnicas utilizadas</b>	<b>Coliformes Totales</b>	<b>Escherichia coli</b>
Filtración por membrana	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>
Enzima – Sustrato	< 1 microorganismo en 100 cm <sup>3</sup>	< 1 microorganismo en 100 cm <sup>3</sup>
Sustrato definido	0 microorganismo en 100 cm <sup>3</sup>	0 microorganismo en 100 cm <sup>3</sup>
Presencia – Ausencia	Ausencia en 100 cm <sup>3</sup>	Ausencia en 100 cm <sup>3</sup>

*Fuente: (Resolución 2115, 2007 artículo 11)*

Dentro de la investigación realizada el método de validación usado en el laboratorio para la detección de *Escherichia coli* en las muestras recolectadas en las plantas de tratamiento de agua potable de los municipios de Toledo y Pamplona, fue el de filtración por membrana el cual es un método aceptado y utilizado a nivel nacional e internacional por los entes reguladores debido a su fácil manejo y empleo, descrito por la APHA-AWWA-WPCF “Standard Methods” (APHA-AWWA-WPCF, 1992)

## **2.1. Filtración por membrana**

La técnica de filtración por membrana consiste en hacer pasar un volumen conocido de agua a través de un filtro estéril de 0.45 µm, aplicando vacío, con el objetivo de retener células bacterianas de manera que queden homogéneamente distribuidas en el filtro; seguido a lo anterior, se retira el filtro de la unidad de filtración y se coloca sobre el medio de cultivo de agar chromocult como se muestra en la Figura 2. La placa Petri se incuba durante 24 horas a 37°C, al cabo de este tiempo se lee el número de colonias resultantes.

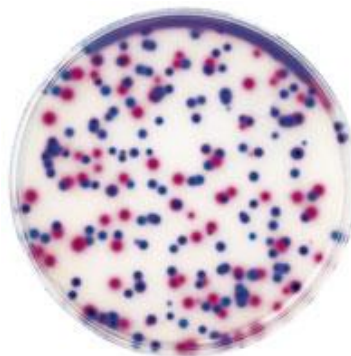
Figura 2. Procedimiento de la técnica de filtración por membrana.



Fuente: (s.f)

Para la lectura se debe tener en cuenta que para las colonias de coliformes totales estas tornan un color rojo salmón y en el caso de *Escherichia coli* el color característico es azul oscuro como se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Recuento de coliformes totales y *E. coli*



Para el recuento de coliformes totales, se cuentan las colonias de color rojo salmón más las azules oscuras. El resultado se obtiene por la multiplicación del número total de colonias de la caja más representativa por el inverso de la dilución utilizada. Para el caso de *E. coli* se cuentan las colonias que presenten color azul oscuro-violeta sin tener en cuenta las de Coliformes totales (rojo salmón). Se confirman las colonias de *E. coli* dudosas realizando



la prueba del indol, agregando 2 gotas de reactivo de Kovacs, el cual produce un halo rojo alrededor de la colonia.

Para la prueba confirmativa de *E. coli*, se usa la prueba de Bactident, el cual consiste en extraer del medio de cultivo colonias bien crecidas que se encuentren individualizadas, colocando esta suspensión bacteriana en una cubeta de reacción en 200  $\mu$ L de agua desionizada y colocar está en una bandejita, incubando a 37°C durante 120 minutos. La lectura de *E. coli* se realiza después de dos horas.

La identificación de la *E. coli* tiene lugar detectando las enzimas de beta-Dglucoronidasa y triptofanasa. El 94 % de las cepas de *E. coli* poseen esta enzima y la formación de Indol a partir de triptófano es positiva en el 99 % de todas las cepas de *E. coli*. (Vergine et al., 2017)

Las desventajas de este método implementado se traduce a robustez, además cuando la muestra (agua) tiene turbidez se puede ver afectada la membrana (obstrucción), pero la principal desventaja es que tiende a subestimar el número de *E. coli* presentes en la muestra, debido a que solo detecta las bacterias viables cultivables que están sanas, ya que aquellas bacterias (*e coli*) que necesitan recuperarse, por competencia con otras especies, no siempre lo hacen, por tanto no aparecen colonias y su conteo se puede subestimar, sumándole el tiempo que puede demorar en obtener resultados (28 a 30 h).

De acuerdo a lo explicado anteriormente la detección y cuantificación de todos los microorganismos potencialmente patógenos, presentes en el agua demanda tiempo, los costos son elevados y no siempre se obtienen resultados positivos o que confirmen la presencia de los microorganismos.

Adicionalmente existen otros métodos usados para la identificación y cuantificación de las especies bacterianas, estos se basan en el reconocimiento de olores complejos y compuestos orgánicos volátiles que se generan como productos o subproductos de las vías metabólicas, por ejemplo, el olor asociado con un cultivo de *Escherichia coli*, en parte es causado por el metabolismo de triptófano a indol por la enzima triptófano (Newton et al., 1965; Lough et al., 2017). Desde hace mucho tiempo se sabe que las especies bacterianas producen un olor característico, que a menudo pueden usarse como medio para la identificación presuntiva de las diferentes especies. En un estudio realizado por Schulz y Dickschat (2006), los autores revisaron todos los compuestos volátiles orgánicos liberados por diversas especies bacterianas, en esta investigación analizaron aproximadamente 346 VOC's en los cuales se encontraban compuestos como: aromáticos, alcoholes, cetonas, ácidos grasos (FAS), hidrocarburos, compuestos de azufre y VOC's que contienen nitrógeno. Cabe mencionar que los perfiles de los VOC's difieren entre las especies bacterianas debido a las condiciones de crecimiento (diferentes vías metabólicas para el crecimiento), a los diferentes medios de cultivo que varían en su constitución y fuentes de energía, técnica de muestreo, método de extracción y otros parámetros. (Núñez et al., 1983; Turton et al., 1983; Robacker et al., 2009; Tait et al., 2014).

Investigaciones recientes han demostrado que uno de los métodos más usados para concentrar, extraer, analizar, identificar y cuantificar los VOC's emanados por diferentes especies bacterianas, es la microextracción de fase sólida (SPME) por espacio de cabeza (HS) acoplado a cromatografía de gases /espectrometría de masas. (GC-MS). Existe una gran cantidad de datos publicados sobre la identificación de metabolitos microbianos volátiles in vitro por HS-SPME-GC-MS que ha sido ampliamente revisada en la literatura por varios autores los cuales han sido compilados en la base de datos en línea mVOC (Lemfac et al., 2014), por ejemplo Nilsson et al. (1996) analizaron los metabolitos volátiles emitidos por la especie *Penicillium*, análisis de compuestos orgánicos volátiles microbianos emitidos por hongos (Sawoszczuk et al., 2015), identificación del perfil de los metabolitos volátiles emitidos por las bacterias (Heather et al., 2012; Boots et al., 2014; Tait et al., 2014).

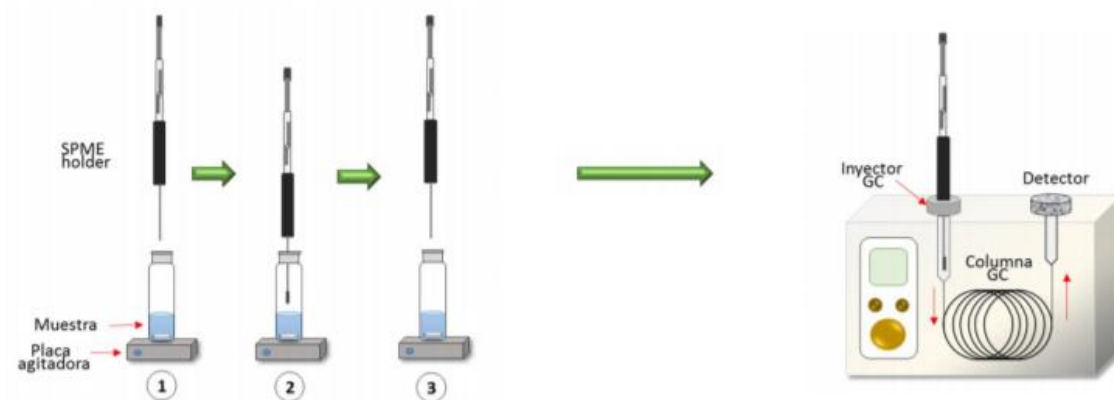
## **2.2. Microextracción de fase solida (SPME) por espacio de cabeza (HS)**

La técnica (HS-SPME) es un método eficaz para extraer y concentrar los VOC's bacterianos. La Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una técnica de extracción sin solvente que se basa en la exposición de una fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria al Espacio de Cabeza hasta que se alcanza un equilibrio entre los analitos volátiles en la fase gas y en la fibra (Cromlab S.L, s.f.).

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinados, de manera que se produce una migración de los analitos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, en una segunda etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra. (Peñalver, 2016)

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas: en la primera la fibra se introduce a través del septum de un vial donde se encuentra la muestra y la fibra se pone en contacto con los analitos o su espacio de cabeza durante un tiempo y temperatura determinados, de manera que se produce una migración de los mismos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza el equilibrio. En una segunda etapa, después de un tiempo determinado, la fibra es retirada del vial e inmediatamente se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra en el instrumento analítico para su análisis. En la Figura 4 se muestra el procedimiento general de SPME (Ríos, 2017).

Figura 4. Proceso de extracción por espacio de cabeza (HS) y proceso de desorción en cromatografía de gases.



Fuente: (Ríos, 2017)

El método SPME implica el equilibrio directo del analito en dos fases distintas, mientras que en espacio de cabeza entran en juego tres fases, la muestra líquida (o gaseosa), la fase de vapor por encima de la muestra de líquido (espacio de cabeza) y la fase de extracción (polimérica líquida o adsorbente sólido). Idealmente, la matriz debe ser homogénea y los analitos estables en las fases implicadas.

Aunque la microextracción en fase sólida (SPME) es un método eficaz para extraer y concentrar los VOC's bacterianos, la calidad de analito extraído por la fibra en SPME puede verse afectada por diversos parámetros, por ejemplo, las características del recubrimiento de la fibra (la elección depende de la estructura química de la muestra), la temperatura, el tiempo de extracción (la cantidad de analito extraído depende del tiempo), la adición de sal o un disolvente orgánico a la muestra, modificación del pH, agitación de la muestra, geometría del vial, composición de la matriz y el volumen de la misma.

### 2.3. Acoplamiento de la cromatografía de gases – espectrometría de masas.

Estos dos instrumentos combinan las características de separación e identificación de la cromatografía de gases y espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de las especies bacterianas.

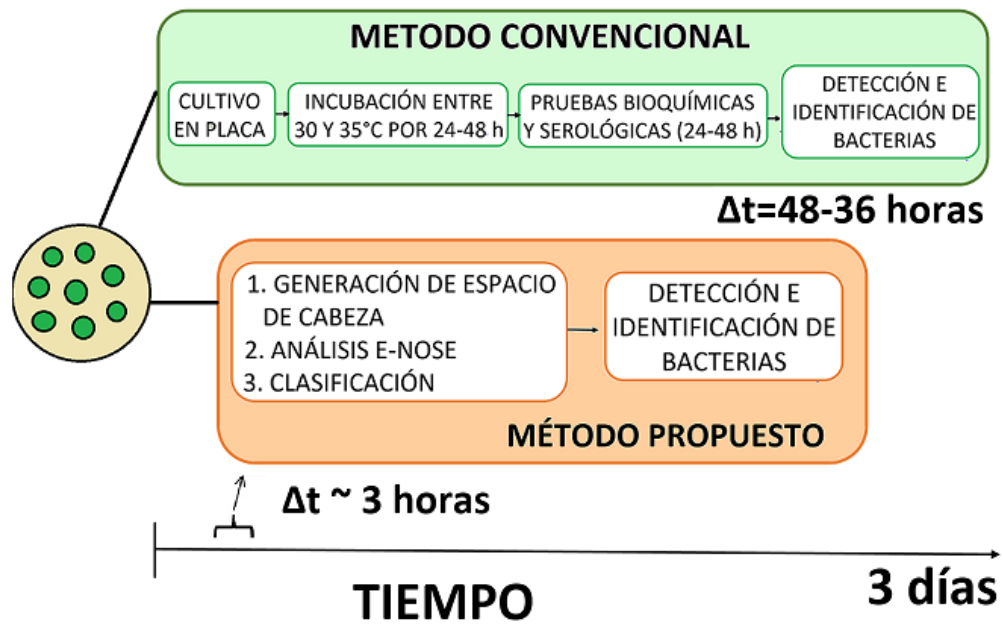
La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de

los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS y constituyen una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas.

En resumidas cuentas, la detección y cuantificación de contaminantes microbiológicos en el agua a menudo se lleva a cabo manualmente en instalaciones del laboratorio usando métodos convencionales como la técnica de fermentación de tubos múltiples, filtración por membrana, y otras técnicas como cromatografía de gases/ espectrometría de masas, estos son instrumentos comúnmente usados para la detección de bacterias en agua, mediante la emanación de VOC’s. Los beneficios potenciales de los métodos analíticos basados en laboratorio han sido reconocidos por mucho tiempo, pero los estudios han demostrado que no son muy eficientes para las aplicaciones de monitoreo en el sitio, requieren instalaciones, equipos, reactivos, personal, tiempo y concentrar las muestras. Con el avance tecnológico en la química analítica, se han desarrollado nuevas técnicas mediante el uso de sensores de gases (e-nose), proporcionando una monitorización rápida y continua de una amplia gama de diferentes compuestos químicos volátiles liberados por las bacterias. En la Figura 5 se muestra un esquema general de las etapas y el tiempo requerido para detectar e identificar los contaminantes por medio de los métodos convencionales y el método propuesto.

*Figura 5. Vista simplificada de detección e identificación de bacterias: Métodos convencionales y método propuesto.*



Fuente: (Autores)

## CAPITULO 3:

# SISTEMA DE OLFATO ELECTRÓNICO

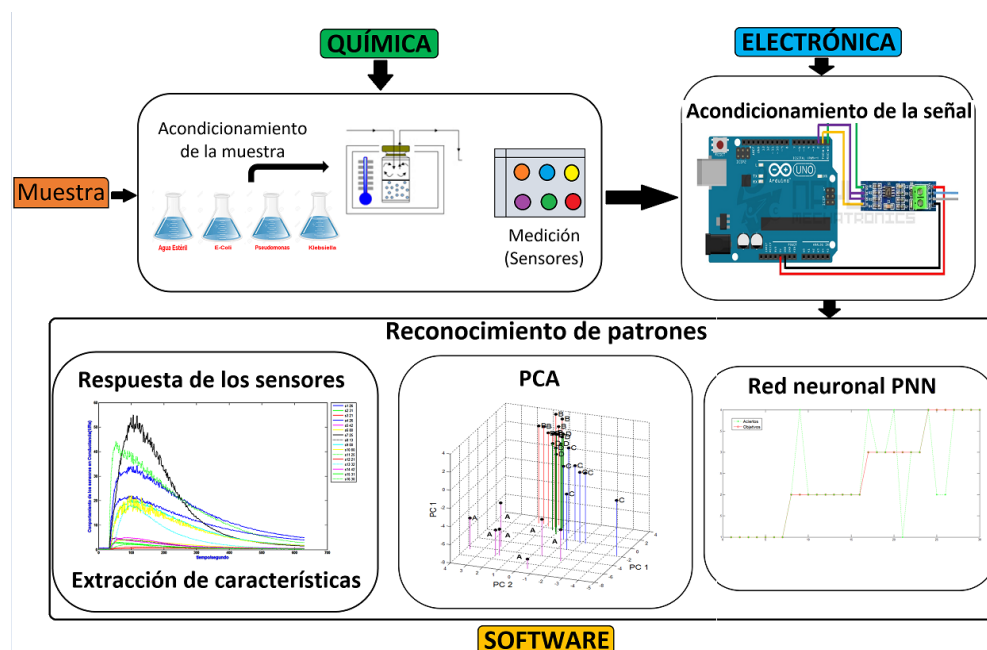
### 3.1. ¿Qué es el sistema de olfato electrónico?

Una de las definiciones más destacadas y popular es la de Gardner y Barlett (Gardner y Barlett., 1999): “Instrumento que comprende una agrupación de sensores químicos con sensibilidades parcialmente solapadas junto a un sistema de reconocimiento de patrones, capaz de analizar y reconocer aromas simples o complejos”. En la actualidad este sistema es usado para determinar, reconocer e identificar niveles muy bajos de sustancias químicas volátiles, esta técnica de análisis es de gran aplicabilidad diferentes campos de acción, por ejemplo, en la industria alimenticia, ambiente, seguridad, medicina y calidad, entre otros.

### 3.2. Funcionamiento del olfato electrónico

Un sistema de olfato electrónico está compuesto por tres módulos el químico, el electrónico y el software (Duran, 2005) como se observa en la Figura 6.

Figura 6. Módulos del sistema de olfato electrónico



Fuente: (Duran, 2005)

Inicialmente la muestra es acondicionada por técnicas de concentración y extracción de compuestos volátiles, siendo la más usada la microextracción de fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) como se referenció en el capítulo 2. Una vez extraído los compuestos son transportados hacia un sistema de medida compuesto por sensores de gases que transforman la información recibida en señales eléctricas, tras la respuesta típica que representa la medida del cambio de algún parámetro físico. Ejemplo, la resistencia o conductividad, de acuerdo con el estímulo recibido proveniente de los compuestos aromáticos de la muestra. Mediante un sistema de control y medida automatizado se registran los cambios en la resistencia de los sensores generando una matriz de datos de  $m$  columnas por  $n$  filas, donde las columnas son el número de sensores presentes en la nariz y  $n$  el número de muestras tomadas.

Hoy en día en el mercado se encuentran disponibles diferentes clases de sensores, actualmente en la fabricación de equipos comerciales de olfato electrónico se emplean sensores de tipo: los polímeros conductores, las microbalanzas de cristal de cuarzo y los de onda acústica de superficie. (Quicazán et al., 2011). Adicionalmente existe una clasificación de los sensores en función del principio de operación que utilicen, las propiedades más empleadas son conductividad, voltaje, capacidades, calentamiento, masas o constantes ópticas las cuales cambian al variar la concentración de las especies químicas que interaccionan con el recubrimiento sensible del sensor. En la Tabla 2, se encuentra la clasificación de los distintos tipos de sensor.

*Tabla 2. Clasificación de los distintos tipos de sensores de gases en función de su principio de operación.*

<b>Tipo de sensor</b>	<b>Principio de operación</b>
Semiconductores de óxido de metal (MOS) Polímeros orgánicos conductores (CP)	Variación de la conductividad a través de un material semiconductor que actúa como recubrimiento sensible.
Transistor efecto campo de semiconductores de óxido de metal (MOSFET)	Variación de la conductividad a través de una capa de material semiconductor que actúa como amplificador de la interacción entre el analito y el recubrimiento sensible que es una capa de metal.
Amperométricos Células electroquímicas	Variación de la magnitud de la corriente generada por la reacción electroquímica del analito al oxidarse o reducirse sobre un catalizador en la superficie de un electrodo.
Capacitancia	Variación de la constante dieléctrica del polímero que actúa como recubrimiento sensible cuando un analito se adsorbe sobre él.

Calorimétricos	Variación del calor de adsorción que se genera al adsorberse el analito sobre el recubrimiento sensible depositado sobre dos metales diferentes de cuya unión resulta un voltaje, voltaje que varía con el calor adsorbido
Microbalanza de cristal del cuarzo (QCM) Onda acústica de superficie (SAW)	Variación de la frecuencia de oscilación de un cristal de cuarzo sobre cuyo recubrimiento sensible se adsorben las moléculas gaseosas incrementando la masa que soporta dicho cristal.
Ópticos de fibra óptica	Variación de la propiedad óptica (índice de refracción, intensidad de luz) de un haz de luz al pasar a través de una capa o recubrimiento sensible sobre el que se han adsorbido las moléculas gaseosas de la muestra de interés.
Ópticos de calorimetría	Obtención de un patrón de cambio cuantitativo de color por diferencia de la imagen RGB de una matriz compuesta por diferentes recubrimientos sensibles antes de ser expuesta a la mezcla gaseosa, de la imagen después de la exposición

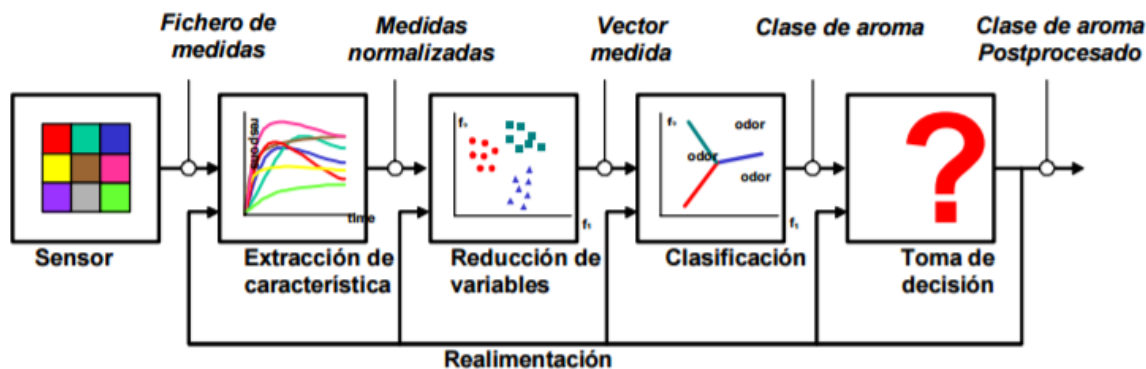
*Fuente: (Correa, s.f.)*

Algunos sensores son especialmente característicos por su sensibilidad, duraderos, bajo costo (MOS, MOSFET, Amperométricos), y otros por combinar especificidad y sensibilidad (SAW y ópticos). Los principales inconvenientes son la lentitud de recuperación (MOS), el envejecimiento (QCM), la deriva (CP, SAW), la falta de reproducibilidad de los sensores para los distintos lotes de fabricación (CP, MOSFET, QCM, SAW), falta de reproducibilidad de la respuesta respecto a condiciones ambientales (humedad relativa, dióxido de carbono), y el coste (CP, ópticos, SAW y Amperométricos).

Siguiendo el esquema propuesto en la Figura 6, una vez obtenidas las señales de los sensores de la nariz electrónica, es necesario implementar técnicas de procesamiento de datos y, posteriormente, interpretarlos de acuerdo con la aplicación que se desea evaluar. El uso apropiado de técnicas de reconocimiento de patrones asegura que las señales de los sensores obtenidas podrían ser apropiadamente analizadas para construir modelos confiables, sea para predicción, identificación o clasificación. (Quicazán et al., 2011).

*Figura 7. Bloques de un sistema de reconocimiento de patrones para una nariz electrónica.*





*Fuente: (Lozano et al., 2014).*

Como se muestra en la Figura 7, el sistema de reconocimiento de patrones se divide en cuatro etapas: extracción de características y preprocesado de la señal, reducción de la dimensionalidad, clasificación y toma de decisión. El bloque inicial en esta figura representa el conjunto de la nariz electrónica, cuya salida es la matriz de datos con las medidas temporales realizadas. (Lozano et al., 2014), estos datos son usados para entrenar el sistema de reconocimiento de patrones, generando una base de datos que luego permitirá reconocer cada uno de los patrones almacenados en memoria si se vuelve a presentar al sistema.

### 3.3. Aplicaciones del sistema de olfato electrónico en calidad

En la última década se han realizado investigaciones que buscan aprovechar las ventajas que tienen los sistemas de olfato electrónico como herramienta de evaluación de control de calidad en los diferentes campos de acción (ambiental, agroindustria, biomédicas).

El olor producido por las bacterias es un factor clave para evaluar la calidad del agua, alimentos, etc. Se sabe que los microorganismos producen una gama de compuestos volátiles orgánicos (VOC's) que evolucionan como productos o subproductos de las vías metabólicas; por ejemplo, la generación de hidrocarburos, alcoholes alifáticos y cetonas a partir de la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que el indol evoluciona a partir de la descomposición del aminoácido triptófano (Schulz et al., 2007) y se puede detectar fácilmente con el olfato humano, este indol es responsable del olor pútrido asociado con *Escherichia coli* (Kai et al., 2009; Yu et al., 2000; Bunge et al., 2008), sin embargo, el olfato humano tiene una gran limitación en cuanto a la detección y descripción adecuada del olor característico de cada especie bacteriana existente, por lo que se necesita el uso de técnicas que tengan buena sensibilidad y que tengan la capacidad de detectar, identificar los VOC's microbianos en tiempo real, esto se hace con el objeto de detectar rápidamente las bacterias que tienen implicaciones importantes en términos de tomar acciones

preventivas y correctivas para mejorar la calidad del agua, de algún producto o tratamiento de infecciones en un entorno clínico, entre otros. Una de las técnicas empleadas a nivel de laboratorio es la cromatografía o espectrometría de masas, estos métodos presentan desventajas a nivel económico, debido a su compleja instrumentación y requieren personal experto para el análisis completo de las muestras. Varias investigaciones han reportado que para un monitoreo continuo, tiempos de respuesta rápido y bajo costo, se han desarrollado nuevas técnicas usando un sistema multisensorial (olfato electrónico), este se ha investigado como una alternativa, reemplazando los métodos convencionales usados para la detección, identificación monitorización rápida y continua de una amplia gama de metabolitos bacterianos.

Por ejemplo, Lozano, Santos, Suárez, Herrero y Aleixandre (2016), desarrollaron una red inalámbrica de narices electrónicas para detectar contaminantes químicos (amoníaco, etanol, tolueno y acetato de etilo) en agua, los VOC's de las diferentes sustancias se extrajeron mediante un sistema de muestreo de fase solida por espacio de cabeza. El sistema fue capaz de discriminar entre las diferentes clases obteniendo un 100% de clasificación. También se han realizado trabajos para la predicción de la concentración de *Escherichia coli* usando una matriz de sensores electrónicos y una red neuronal artificial, en este estudio, las muestras de *E-coli* (100 UFC/ml) fueron incubadas a 37°C para cuantificar su crecimiento cada 2 horas hasta completar 12 horas, analizando los VOC's generados en cada tiempo. Usando técnicas como DFA fue posible llevarse a cabo la clasificación en los diferentes tiempos y el potencial para predecir el número de *E. coli* y la concentración de compuestos metabólicos específicos se investigó utilizando una red neuronal artificial (ANN) (Siripatrawan et al., 2004). En la Tabla 3, se presentan algunas aplicaciones de los sistemas de olfato electrónico aplicados a la detección de microorganismos

*Tabla 3. Aplicación de olfato electrónico en la detección de microorganismos.*

Descripción	Referencia
Detección e identificación simultánea de microorganismos a partir de muestras de espacio de cabeza utilizando una nariz electrónica. En este estudio se inocularon 12 tipos de bacterias y levaduras en placas, después de la incubación y mediante el espacio de cabeza generado en las muestras se analizaron los compuestos presentes. La clasificación global de las 12 bacterias diferentes y una levadura patógena fue del 93,4%, adicionalmente tomaron un subconjunto de siete	Gibson et al., 1997

---

bacterias dando un 100% de clasificación. En un segundo experimento, compararon tres cultivos de levadura similares y se clasificaron correctamente a un nivel de 96,3%.

Desarrollaron un sistema de medición para la prueba de cianobacterias en agua. descubrieron que la red óptima de MLP clasifica correctamente el 97.1% de las cianobacterias desconocidas no tóxicas y el 100% de las desconocidas. Los algoritmos óptimos LVQ y Fuzzy ARTMAP pudieron clasificar el 100% de ambas cepas de muestras de cianobacterias. La precisión de MLP, LVQ y Fuzzy ARTMAP en términos de predicción de cuatro fases de crecimiento diferentes de cianobacterias tóxicas fue 92.3%, 95.1% y 92.3%, respectivamente. Estos resultados muestran la posible aplicación de narices electrónicas basadas en redes neuronales para probar la calidad del agua potable como alternativa a los instrumentos, como la cromatografía líquida o la microscopía óptica.

Gardner, Woo Shin, Hines y Dow, 2000.

Detección y discriminación de bacterias coliformes con matrices de sensores de gas. Usando análisis de componentes principales PCA, lograron discriminar cultivos en agua de *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.

McEntegart et al., 2000.

Potencial de detección de microorganismos y metales pesados en agua potable utilizando tecnología de nariz electrónica. Determinaron el potencial de detección de tres especies microbianas (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) solos y en presencia de bajas concentraciones de diferentes metales pesados (As, Cd, Pb y Zn). Los estudios muestran que es posible discriminar muestras de agua de control de agua contaminada con 0.5 ppm de una mezcla de metales.

Canhoto y Magan, 2003

Tecnología electrónica de nariz para la detección de contaminación microbiana y química del agua potable. Realizaron comparaciones entre dos sistemas de nariz electrónicos que utilizan matrices

Canhoto y Magan, 2005.

---

---

de sensores de polímeros conductores para la detección temprana y la discriminación entre especies bacterianas (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*,  $10^2$  CFU mL<sup>-1</sup>), esporas de hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium culmorum* y *Penicillium sp.*,  $10^2$  esporas mL<sup>-1</sup>) y trazas (ppb) de pesticidas (DDT y dieldrina). Utilizando PCA, DFA, fue posible diferenciar entre las diferentes especies bacterianas y fúngicas después de 24 h de incubación a 25 ° C. Sin embargo, 10 y 100 ppb de los pesticidas no pudieron discriminarse de manera efectiva de los controles.

Potencial de una nariz electrónica para la detección y diferenciación temprana de *Streptomyces* en agua potable. En el estudio los autores emplean una e-nose para detectar y controlar la actividad temprana de *Streptomyces* en el agua en diferentes etapas de diferenciación, así como para discriminar entre diferentes especies en función de sus patrones de producción volátiles. Bastos y Magan, 2006.

Sistema E-Nose para detectar E-Coli en agua potable del distrito de Udupi. Este trabajo tiene la intención de detectar contaminantes biológicos del agua como el grupo coliforme de bacterias en el consumo agua con e-NOSE. Los resultados de este análisis se compararon con el método estándar de Fermentación Múltiple de Tubos de Prueba (MTTF), que indica el Número más probable (MPN) para la densidad bacteriana en el agua potable. Nayak et al., 2012.

---

*Fuente: (Autores)*

### **3.4. Limitaciones del olfato electrónico.**

Las narices electrónicas están siendo ampliamente utilizadas por algunas compañías como un instrumento de control de calidad. Las fortalezas incluyen alta sensibilidad y correlación con paneles sensoriales humanos para muchas aplicaciones. Las limitaciones de todo su potencial incluyen:

- ✓ La pérdida de sensibilidad en presencia de vapor de agua, ya que la reacción que se produce entre el oxígeno de la superficie y las moléculas de agua conduce a una disminución en la resistencia de referencia del sensor de gas y da como resultado una disminución de la sensibilidad (Gong et al., 2006 y Wang et al., 2010), adicionalmente existen otros problemas relacionados con la baja sensibilidad entre ellas se encuentran: las altas concentraciones de un solo componente como el alcohol, mal acondicionamiento de la muestra, provocando la dilución de la concentración de esta. Una de las maneras de superar ese inconveniente es la de incorporar métodos de pre concentración.
- ✓ Problemas generados a la hora de determinar el tiempo de recuperación de los sensores lo que puede provocar un efecto de memoria en la cámara en el instante de realizar una nueva medida (Duran et al., 2012),
- ✓ Las derivas del sensor hacen referencia a que el comportamiento ideal de un sensor químico debe dar siempre la misma respuesta cuando es expuesto a muestras idénticas, no obstante, en la mayoría de sensores que se utilizan en los sistemas de olfato el electrónico no se cumple con lo expuesto anteriormente, lo cual produce variaciones en la respuesta del sensor, provocadas por variaciones de temperatura en el espacio de cabeza de la muestra, variaciones en la humedad o temperatura en la superficie del sensor, variaciones en la presión ambiental, envejecimiento de los sensores u otros efectos químicos y físicos que influyen (variaciones de las condiciones experimentales). (Moreno et al., 2009; Duran 2005).
- ✓ La falta de selectividad del sensor que a veces se traduce en una incapacidad de distinguir entre un grupo de diferentes tipos de clases. Por ende, es importante añadir técnicas multivariantes para extraer la información específica necesaria para cada tipo de clase, ya que es evidente que muchos de los compuestos orgánicos volátiles identificados son comunes en las especies.
- ✓ Incapacidad de proporcionar calibración absoluta, esto se debe a que se debe entrenar el equipo con un gran número de medidas, adicionalmente cada vez que deba sustituirse un sensor o se deba calibrar el equipo será necesario entrenar nuevamente el sistema.
- ✓ Vida relativamente corta de algunos sensores; necesidad de hacer un trabajo considerable de desarrollo de métodos para cada aplicación específica; y la falta de poder obtener datos cuantitativos para las diferencias de aroma. (Harper, 2001)

En resumidas, los sensores que hacen parte del sistema deben tener alta sensibilidad al grupo de compuestos químicos destinados a la detección, con un umbral de detección similar al de la nariz humana, hasta aproximadamente  $10^{-12}$  g ml<sup>-1</sup>, deben tener una selectividad relativamente baja para ser sensibles a una gran cantidad de compuestos químicos diferentes. Los sensores deben ser capaces de operar a temperaturas relativamente bajas cuando sea necesario, tener requisitos de calibración, un tiempo de recuperación rápido entre ejecuciones y procedimientos de mantenimiento para mantener los costos operativos bajos. También deben tener tiempos de entrenamiento y análisis breves, particularmente cuando se usan como sistemas en línea. (Alphus, 2009).

## **CAPITULO 4:**

### **PROCESADO DE DATOS**

#### **4.1. Algoritmos de reconocimiento de patrones**

Una de las partes importantes en las SDOE son el conjunto de técnicas que se utilizan para procesar los datos obtenidos a través de la etapa de sensado. Tales técnicas se denominan algoritmos de “reconocimiento de patrones” o “técnicas de inteligencia artificial” y se pueden definir como los procesos matemáticos que retransforman los datos originales de las medidas en información útil para el usuario final. Estos algoritmos matemáticos pueden ser clasificados de diferentes formas atendiendo a sus características. Así podemos distinguir entre algoritmos supervisados y no supervisados si nos fijamos en el proceso de aprendizaje, algoritmos de clasificación o de cuantificación en función de la naturaleza (binaria o analógica) de la respuesta que deben proporcionar a cada estímulo de entrada lineales o no lineales según las operaciones que realicen, paramétricos o no paramétricos en función de si se hacen suposiciones iniciales sobre el proceso a modelar, etc. (Gualdrón, 2006).

**Métodos paramétricos:** Las técnicas paramétricas comúnmente se relacionan a una búsqueda estadística basada en la suposición de que la totalidad de los datos de entrada pueden ser descritos por una función densidad probabilística (PDF). En muchos casos, se supone que los datos siguen una distribución normal con una media constante y una varianza determinada. Estas técnicas intentan encontrar una relación matemática subyacente entre el sistema de entrada (señales de los sensores) y sus salidas (clases o descriptores).

**Métodos no paramétricos:** los métodos no paramétricos no tienen en cuenta la función de densidad probabilística para los datos de entrada y su aplicación es más genérica. Dentro de esta clasificación nos encontramos con las redes neuronales artificiales y los sistemas expertos.

**Supervisado:** En un método de reconocimiento de patrones con aprendizaje supervisado, un conjunto de olores conocidos se introduce en la nariz electrónica de manera sistemática, donde los clasifica de acuerdo con descriptores o clases conocidas, agregándose a la base de conocimiento, posteriormente un olor desconocido se prueba contra la base de

conocimiento para predecir la clase. El olor desconocido se analiza utilizando la relación creada en el entrenamiento dentro de un conjunto de olores conocidos.

**No supervisados:** Los métodos con aprendizaje no supervisado aprenden separando las diferentes clases de manera rutinaria, discriminando entre los olores desconocidos. Este método utiliza un esquema de asociaciones intuitivas sin conocimiento previo, lo que los hace más cercanos al sistema olfativo humano. (Rubio et al., 2016)

#### **4.2. Acondicionamiento de la señal**

En la primera etapa los sensores de gases pueden responder ante diferentes muestras odorantes y ofrecer un patrón de respuesta según la intensidad y características del compuesto medido. La respuesta de los sensores debe ser medida y convertida a una señal eléctrica, (tensión, corriente) La señal eléctrica que se obtiene a la salida de los sensores no es la adecuada para ser adquirida por un computador, por lo que es necesario procesarla a través de circuitos de acondicionamiento de la señal analógica mediante un circuito de división de voltaje a través de una resistencia de carga de 1 a  $10K\Omega$ .(Campo, 2017)

#### **4.3.Pre-procesador de los datos**

De la etapa del pre-procesado de la señal, se extrae información de la respuesta de los sensores y se preparan los datos para el análisis de patrones multivariantes, convirtiéndose en la primera etapa informatizada, donde los datos son muestreados y almacenados en la memoria del ordenador. El propósito principal de la etapa de preprocesado de la señal es seleccionar cuidadosamente un número de parámetros que sean representativos de la respuesta de los sensores. En esta etapa se pueden identificar tres pasos generales: manipulación de la línea de base, compresión y normalización.

- ✓ La manipulación de la respuesta del sensor con respecto a su línea base es la primera etapa del preprocesado de la señal, que consiste en la manipulación de la respuesta del sensor con respecto a su línea base, es decir, a su respuesta a una muestra de referencia; con el propósito de compensar sus derivas entre otras cosas. Y considerando la respuesta dinámica del sensor, se utilizan comúnmente tres técnicas: Diferencial, Relativa y Fraccionaria. La Diferencial es la técnica en la cual los valores de la señal de la línea base de un sensor se restan de su respuesta ante una muestra, con el objetivo de eliminar la señal de ruido que puede estar presente en la señal del sensor. La Relativa divide la respuesta del sensor ante una muestra entre la respuesta del sensor a la muestra de referencia, proporcionando una respuesta sin dimensiones. La técnica Fraccionaria consiste en que, de la respuesta



del sensor ante una muestra, se resta la respuesta a la muestra de referencia y luego el resultado se divide entre la respuesta a la muestra de referencia; con el propósito de compensar a los sensores que tienen niveles de respuesta intrínsecamente grandes o pequeños.

- ✓ La segunda etapa del preprocesado es comprimir la respuesta de la matriz de sensores para formar un vector de características o la huella digital olfativa. En principio, con la compresión se pretende transportar la misma información, pero empleando la menor cantidad de espacio. De acuerdo al procedimiento empleado para generar la huella digital olfativa dinámica, los métodos de compresión transitorios se pueden agrupar en tres clases: métodos de Submuestreo, métodos de Extracción de Parámetros y métodos de Identificación de Sistemas. El método de Submuestreo es un método que muestrea, es decir, selecciona una pequeña parte de la respuesta transitoria del sensor (y/o sus derivadas) en diferentes tiempos ya sea durante la exposición al olor y/o fase de recuperación del olor. El método de Extracción de Parámetros comprime la respuesta transitoria utilizando un número de descriptores, tales como el tiempo de subida de la curva de respuesta, sus respuestas máximas y mínimas, etc. La Identificación del Sistema es un método que ajusta un modelo teórico, por ejemplo, autorregresivo, a los transitorios experimentales y utilizan los parámetros modelos como características.

En la Tabla 4, se muestran los diferentes algoritmos de pre-procesamiento utilizados para obtener las respuestas de los sensores o lo que es lo mismo, las entradas al algoritmo de reconocimiento de patrones.

*Tabla 4. Métodos de extracción de parámetros.*

<b>Nombre y abreviatura</b>	<b>Algoritmo</b>
Conductancia relativa	$\frac{G_f}{G_i}$
Resistencia relativa	$\frac{R}{R_a}$
Diferencia de conductancias fraccional (DCF)	$\frac{(G_f - G_i)}{G_f}$
Diferencia de resistencia fraccional (DRF)	$\frac{(R_f - R_i)}{R_f}$
Logaritmo absoluto de la diferencia de conductancias	$\log( G_f - G_i )$
Logaritmo absoluto de la diferencia de conductancias fraccional	$\log\left(\frac{ G_f - G_i }{G_f}\right)$
Incremento de conductancia	$G_f - G_i$

Máximo incremento de la conductancia	$G_{max} - G_{min}$
Máxima diferencia fraccional	$(G_{max} - G_{min})$
Logaritmo absoluto de la Máxima diferencia fraccional	$\log\left(\frac{G_{max}}{(G_{max} - G_{min})}\right)$

*Fuente: (Lozano, 2014)*

Donde:

Gi: Conductancia inicial

Gf: Conductancia final

Gmax: Conductancia máxima

Gmin: Conductancia mínima

- ✓ La normalización constituye la etapa final del preprocesado digital. Es un proceso que clasifica relaciones, objetos, formas de relación y demás elementos en grupos, en base a las características que cada uno posee, aplicando una serie de reglas y ayuda a los diseñadores a desarrollar esquemas que minimicen los problemas de lógica. Y las técnicas de normalización se pueden agrupar en dos clases: métodos locales y globales. Los métodos locales son los que operan a través de la matriz de sensores, sobre cada “olfateo” individual para compensar las variaciones muestra a muestra causadas por la concentración del analito y la deriva del sensor, entre otros. Los métodos globales son procedimientos típicamente utilizados para asegurar que las magnitudes del sensor sean comparables, evitando que los procedimientos siguientes de reconocimiento de patrones sean saturados por sensores con valores arbitrariamente grandes. (Moreno et al., 2009)

En este proyecto se han definido 4 tipos de normalizado que pueden ser utilizados por el usuario del software B-NOSE. La Tabla 5 describe cada una de las técnicas implementadas en el preprocesado.

*Tabla 5. Métodos de normalización utilizados en el preprocesado de la señal de los sensores.*

<b>Normalización</b>	<b>Descripción</b>	<b>Expresión</b>
<b>Auto escalado (Autoscaling)</b>	El objetivo de esta normalización es la de dar igualdad de escala a cada una de las variables o parámetros que describen cada medida. Este tipo de escalado es muy útil cuando los parámetros que describen cada experiencia son de naturaleza (y por	

	tanto de unidades) diferentes. Incluso en el caso de que cada variable represente el mismo parámetro para un sensor hay que recordar que diferentes sensores trabajan en diferentes valores de resistencia, por lo que es conveniente que todos ellos trabajen dentro del mismo rango de valores <sup>1</sup> .	
<b>Centrado (mean centring)</b>	En esta normalización a cada una de las columnas (variables) se le resta su valor medio. Es decir, toda medida es descrita por variables de media nula <sup>6</sup> .	$\bar{R}_j = \frac{\sum_{i=1}^n R_{ij}}{n}$ $\bar{R}_{ij} = R_{ij} - \bar{R}_j$
<b>Normalizado por matriz</b>	Divide toda la matriz por el elemento máximo de la misma. En este caso solo un elemento valdrá la unidad. <sup>6</sup> .	$\bar{R}_{ij} = \frac{R_{ij}}{\max_i(R_{ij})}$
<b>Normalizado por columna</b>	Se calcula la media de cada columna (sensor) y se divide por el valor máximo de la matriz.	

*Fuente: (Daniel, 2010)*

#### 4.4.Reducción de variables

El vector de características que resulta de la etapa de pre-procesamiento en muchas ocasiones no es adecuado para ser procesado en los siguientes pasos debido a su alta dimensionalidad y redundancia. El problema de la redundancia es bastante significativo en las narices electrónicas debido a las selectividades parcialmente solapadas de los sensores de gases. Las técnicas más comúnmente utilizadas para la reducción de variables son el Análisis de Componentes Principales (PCA), el Análisis Discriminante Lineal (LDA) y el Análisis de Componentes Independientes (ICA).

#### 4.4.1. Análisis de Componentes Principales (PCA):

Es una técnica estadística utilizada para reducir la dimensionalidad (número de variables) de un conjunto de datos. El PCA busca la proyección según la cual los datos queden mejor representados en términos de mínimos cuadrados. Este método construye una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (llamado el Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente. Para construir esta transformación lineal debe construirse primero la matriz de coeficientes de correlación. Debido a la simetría de esta matriz existe una base completa de vectores propios de la misma. La transformación que lleva de las antiguas coordenadas a las coordenadas de la nueva base es precisamente la transformación lineal necesaria para reducir la dimensionalidad de datos. Una de las ventajas de PCA para reducir la dimensionalidad de un grupo de datos, es que retiene aquellas características del conjunto de datos que contribuyen más a su varianza manteniendo un orden de bajo nivel de los componentes principales e ignorando los de alto nivel. El objetivo es que esos componentes de bajo orden a veces contienen el aspecto más importante de esa información. Además, es un método lineal sin supervisión que ha sido ampliamente usado en varias investigaciones de narices electrónicas, tanto en olores simples como complejos (por ejemplo, alcohol, cerveza, café, monitoreo de la fermentación de salsas (Eklöv et al, 1998). La utilización de este método por Hai y Wang (Hai y Wang, 2006) nos muestra un ejemplo de cómo esta técnica reduce la dimensión de variables a dos o tres componentes principales y guardando, además, el contenido de la información original del grupo de datos. (Moreno, 2009)

Los parámetros del modelo pueden calcularse directamente de la matriz de datos centralizada  $X$ , bien sea por descomposición en valores singulares o por la diagonalización de la matriz de covarianza (positiva semidefinida). Sea  $x_i$  el  $i$ -ésimo vector de observación (vector columna) de tamaño  $c$ ,  $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)^T$  La matriz de rotación  $U$  permite calcular las  $p$  componentes principales  $z$  que mejor representan  $x$ . (Sánchez, L.G., Osorio, G.A., 2008)

$$Z = U^T (1)$$

$U$  Puede obtenerse al solucionar un problema de valores propios, y está definida como los  $p$  mayores vectores propios de  $X^T X$ , esto es:

$$X^T X U = n U A (2)$$

La matriz  $X^T X$  está asociada a la matriz de covarianza; además, puede calcularse como (Martinez & Kak, 2001).

$$c = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i x_i^T \quad (3)$$

El problema de valores propios  $Cu = \lambda u$  implica que todas las soluciones de  $u$  deben estar en el espacio generado por el conjunto de vectores  $x_1, x_2, \dots, X_n$ ; por lo cual (Schölkopf, Smola, & Müller, 1998).

$$(x_i, u) = (x_i, Cu), \forall i = 1, \dots, n. \quad (4)$$

#### 4.4.2. La función de análisis discriminante (DFA)

Es un clasificador paramétrico de aprendizaje supervisado, que puede utilizarse para el análisis tanto cuantitativo como cualitativo. El Análisis Discriminante se puede considerar como un análisis de regresión donde la variable dependiente es categórica y tiene como categorías la etiqueta de cada uno de los grupos,  $y$ . Las variables independientes son continuas y determinan a qué grupos pertenecen los objetos. Se pretende encontrar relaciones lineales entre las variables continuas que mejor discriminen en los grupos dados a los objetos.

A partir de  $q$  grupos donde se asignan a una serie de objetos y de  $p$  variables medidas sobre ellos ( $x_1 \dots x_p$ ), se trata de obtener para cada objeto una serie de puntuaciones que indican el grupo al que pertenecen ( $y_1 \dots, y_m$ ), de modo que sean funciones lineales de  $x_1, \dots, x_p$

$$\begin{aligned} y_1 &= a_{11}x_1 + \dots + a_{1p}x_p + a_{10} \\ y_m &= a_{m1}x_1 + \dots + a_{mp}x_p + a_{m0} \end{aligned} \quad (5)$$

donde  $m = \min(q - 1, p)$ , tales que discriminen o separen lo máximo posible a los  $q$  grupos. Estas combinaciones lineales de las  $p$  variables deben maximizar la varianza entre los grupos y minimizar la varianza dentro de los grupos.

Se puede descomponer la variabilidad total de la muestra en variabilidad dentro de los grupos y entre los grupos. Partimos de:

$$Cov(x_j, x'_j) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j)(X'_{ij} - \bar{X}'_j) \quad (6)$$

Se puede considerar la media de la variable  $x_j$  en cada uno de los grupos  $I_1, \dots, I_q$ , es, decir.

$$\bar{x}_{kj} = \frac{1}{n_k} \sum_{i \in I_k} x_{ij} \quad (7)$$

para  $k = 1, \dots, q$

De este modo, la media total de la variable  $x_j$  se puede expresar como función de las medias dentro de cada grupo. Así,

$$\sum_{i \in I_k} x_{ij} = n_k \bar{x}_{kj}, \quad (8)$$

Entonces

$$\begin{aligned} \bar{x}_j &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{ij} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^q \sum_{i \in I_k} x_{ij} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^q n_k \bar{x}_{kj} \\ &= \sum_{k=1}^q \frac{n_k}{n} \bar{x}_{kj} \end{aligned} \quad (9)$$

Así,

$$Cov(x_j, x'_j) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^q \sum (x_{ij} - \bar{x}_j)(x'_{ij} - x'_j) \quad (10)$$

En el proyecto se seleccionaron dos variables canónicas y se proyectaron en un plano dimensional con dos factores.

## 4.5. Clasificación

### 4.5.1. Redes neuronales

Las redes neuronales artificiales (fuzzy ARTMAP, PNN, SVM) se utilizan en una gran variedad de aplicaciones de procesamiento de datos, donde se requiere la extracción de información y el análisis de los datos en tiempo real. Una de las principales ventajas de las redes neuronales es que la mayor carga computacional se requiere únicamente en la etapa de entrenamiento. Una vez que la red neuronal se entrena para una tarea en particular, su operación es relativamente rápida y con ello se pueden identificar rápidamente muestras desconocidas (Ludermir y Yamazaki, 2003).

En definitiva, las redes neuronales no son más que un modelo artificial y simplificado del cerebro humano, que es el ejemplo más perfecto del que disponemos para un sistema que

es capaz de adquirir conocimiento a través de la experiencia. Una red neuronal es “un nuevo sistema para el tratamiento de la información, cuya unidad básica de procesamiento está inspirada en la célula fundamental del sistema nervioso humano: la neurona”.

#### **4.5.2. Ventajas que ofrecen las redes neuronales.**

Debido a su constitución y a sus fundamentos, las redes neuronales artificiales presentan un gran número de características semejantes a las del cerebro. Por ejemplo, son capaces de aprender de la experiencia, de generalizar de casos anteriores a nuevos casos, de abstraer características esenciales a partir de entradas que representan información irrelevante, etc. Esto hace que ofrezcan numerosas ventajas y que este tipo de tecnología se esté aplicando en múltiples áreas (Ruiz, 2001). Entre las ventajas se incluyen:

***Aprendizaje Adaptativo.*** Capacidad de aprender a realizar tareas basadas en un entrenamiento o en una experiencia inicial.

***Auto-organización.*** Una red neuronal puede crear su propia organización o representación de la información que recibe mediante una etapa de aprendizaje.

***Tolerancia a fallos.*** La destrucción parcial de una red conduce a una degradación de su estructura; sin embargo, algunas capacidades de la red se pueden retener, incluso sufriendo un gran daño.

***Operación en tiempo real.*** Los cálculos neuronales pueden ser realizados en paralelo; para esto se diseñan y fabrican máquinas con hardware especial para obtener esta capacidad.

***Fácil inserción dentro de la tecnología existente.*** Se pueden obtener chips especializados para redes neuronales que mejoran su capacidad en ciertas tareas. Ello facilitará la integración modular en los sistemas existente.

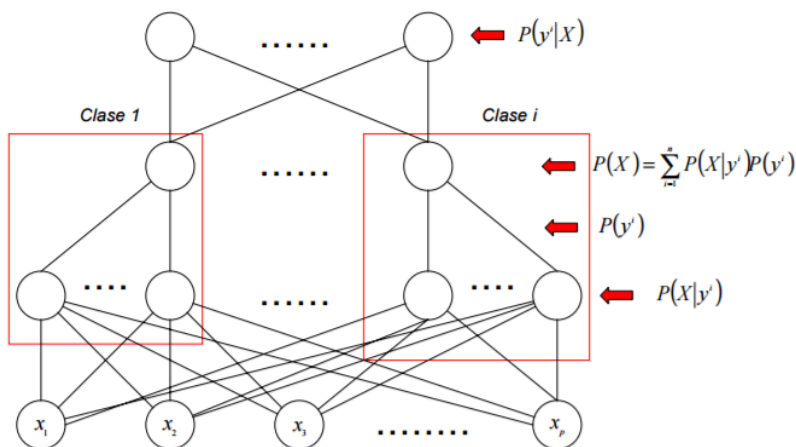
#### **4.5.3. Red PNN (Probabilistic Neural Networks)**

Los modelos neuronales probabilísticos (probabilistic neural networks, PNN) surgen en los años 70 y fueron descritos por Meisel (1972). Pero no empezaron a tener importancia hasta los años 90 con Specht. Dichos modelos aparecen de forma natural en el marco de la teoría de la probabilidad y son en esencia un clasificador bayesiano. Desde esta óptica y con un perfil clásico, los algoritmos de clasificación asumen el conocimiento de la distribución de las variables aleatorias que se utilizan para clasificar. Pero en la mente de

todos está la idea de la problemática que ocasiona en los análisis, la existencia de mayores desviaciones o la aparición de distribuciones multimodales. Con el objetivo de clasificar también pueden ser utilizados los modelos feed-forward (comentadas en apartados anteriores, MLP), aunque adolecen de ciertos problemas. Según Master (1995), la primera de las dificultades radica en su forma de operar y la segunda, en el desconocimiento de cuál es el comportamiento teórico esperado. (s.f).

La PNN es una RNA semi-supervisada basada en las redes de decisión bayesiana. Esta red es muy utilizada en problemas de clasificación. La red consta de dos capas, una red de neuronas de base radial con un número de neuronas igual al número de vectores de entrenamiento y una capa competitiva de neuronas cuyo número es igual al número de categorías consideradas en el problema de clasificación. En la Figura 8, se muestra un esquema general de esta arquitectura de red. Cada neurona de base radial (de la capa de entrada) almacena como pesos uno de los vectores de entrenamiento. En la fase de clasificación o reconocimiento, se presenta un nuevo vector de entrada. En la primera capa se calculan las distancias Euclídeas entre el vector de entrada y los pesos de cada neurona. En general, en la entrada de cada neurona de base radial se obtiene un escalar indicativo del parecido entre el vector a clasificar y los pesos de dicha neurona. Si para una neurona el escalar es cero, entonces el vector a clasificar ha resultado ser idéntico al vector de pesos de dicha neurona. Los escalares resultantes del cálculo de la distancia son multiplicados por un escalar denominado ‘spread’ que es idéntico para todas las neuronas de base radial de la red e introducidos como argumento en una función de tipo Gaussiana denominada ‘radbas’.

Figura 8. Topología de un modelo neuronal PNN



Fuente: (Gualdrón, 2006)



La expresión de dicha función (donde se ha denominado  $n$  al argumento) es:

$$radbas(n) = e^{-n^2} \quad (11)$$

La *Figura 8*, muestra el aspecto de dicha función que adquiere su valor máximo (igual a la unidad) cuando su argumento vale 0. Por lo tanto, dado un vector nuevo que deba ser clasificado, la neurona de base radial que produzca un máximo salida será aquella cuyos pesos más se parezcan al vector de entrada. La función del parámetro ‘spread’ es determinar la anchura de la campana de Gauss.

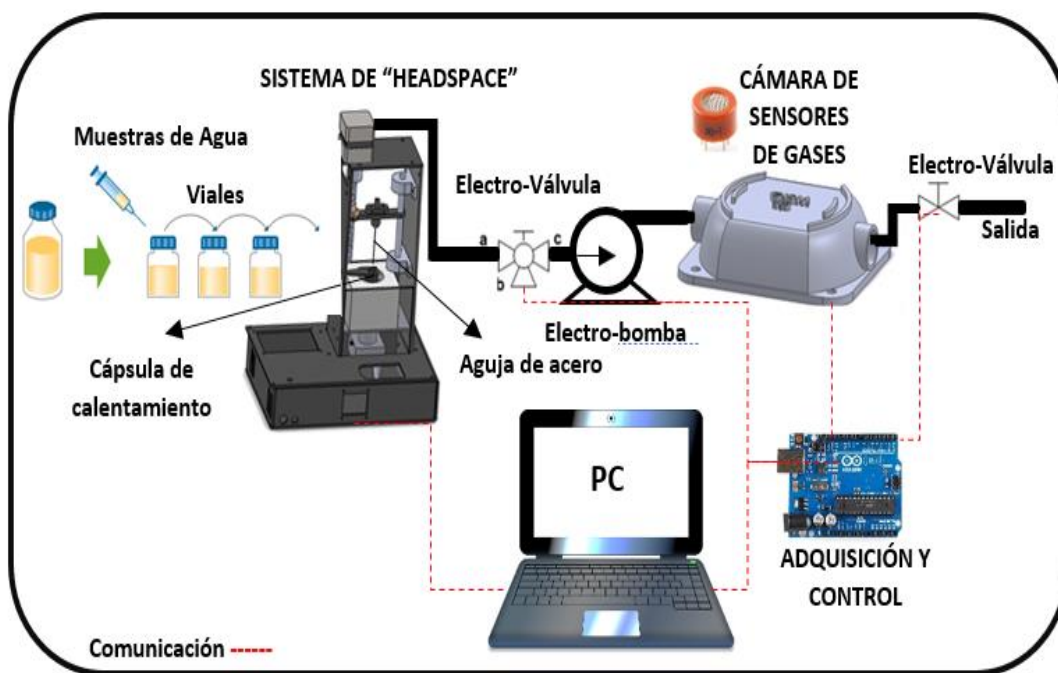
La segunda capa suma las contribuciones de las diferentes neuronas para generar un vector de dimensión igual al número de categorías. Este proceso es muy sencillo. Imaginemos que cuando resulta ganadora la neurona de base radial  $i$  esto implique que el vector de entrada pertenece a la categoría  $j$ . Entonces el peso del enlace entre la neurona de base radial  $i$  y la neurona competitiva  $j$  es igual a la unidad mientras que los pesos que enlazan a la neurona  $i$  con las demás neuronas competitivas (las otras categorías) son cero. El elemento de la posición  $i$ -ésima del vector resultante de sumar las contribuciones de las neuronas de base radial puede ser interpretado como la probabilidad de que el vector de entrada pertenezca a la categoría  $i$ -ésima. Finalmente, una función de transferencia “competitiva” sobre la salida de la segunda capa escoge el máximo entre todas las probabilidades, y produce un uno para esa clase y un cero para todas las demás clases.

## CAPITULO 5:

# DESARROLLO DEL EQUIPO DE EXTRACCIÓN

La Figura 9 describe cada uno de los pasos que se llevaron a cabo para el desarrollo de la metodología propuesta. En ella se puede considerar como primer paso la preparación y adecuación de las muestras en los viales, seguido de un muestreador automático de espacio de cabeza (Headsample) acoplado a un sistema de percepción sensorial. Para la adquisición, control y monitoreo de las señales originadas por los sensores se utilizó una tarjeta de adquisición de datos conectada a la cámara de sensores y el PC.

*Figura 9. Esquema general de la metodología implementada*



*Fuente: Autores*

### 5.1. Diseño del muestreador de espacio de cabeza estático (MECS) para extraer los VOC's.

### 5.1.1. Introducción

A pesar de que los sistemas de olfato artificial, han sido usados los últimos años en diferentes campos de acción, esta área aún permanece en la etapa de intensa investigación, tanto fundamental como aplicada. Estos sistemas implican, en particular, la búsqueda de nuevos materiales, la optimización de los procedimientos de medición y el análisis de datos, así como las técnicas óptimas de manejo de muestras.

La experiencia a largo plazo en esa área requiere sistematización y generalización. Dicha actividad se centra en el desarrollo de transductores físicos y materiales sensibles para sensores (Arshak et al., 2004; Adhikari et al., 2004), así como en procedimientos de medición y análisis de datos multidimensionales (Pearce et al., 1997; Roussel et al., 1999). Sin embargo, el nivel de generalización y formalización en el área de la preparación de la muestra, la extracción de la muestra y la medición siguen siendo insuficientes. Como se ha dicho en la mayoría de los casos, los SDOE implican los siguientes elementos funcionales: (i) un módulo de preparación e inyección de muestras que garantiza el contacto entre los sensores y la muestra, esta puede implicar operaciones de separación y/o concentración de los componentes; (ii) un sistema de recuperación, responsable de limpiar las superficies de los sensores y las celdas de medición (desde aquí en la celda), así como para que el sistema regrese al estado inicial después de cada medición; (iii) una unidad de grabación de datos que registra las señales del sensor y las transforma en una forma aceptable para su posterior procesamiento; (iv) un sistema de procesamiento de datos que ejecuta clasificación, identificación y otras operaciones, dependiendo de la tarea asignada.

El resultado final (clasificación e identificación de los objetos estudiados) depende en gran medida de cuán óptimamente se realizan cada una de las etapas anteriores. Si una de las etapas no es realizada correctamente, el rendimiento total del proceso puede ser bajo, pueden introducirse errores y, consecuentemente, puede esperarse inconsistencia en los resultados. (Vidal, 2009)

La etapa de la preparación de la muestra es una de las etapas clave y más críticas, ya que está demostrado que puede generar errores en la medición (Esbensen et al., 2014; Boeker 2014), Por ello, podemos concluir que la preparación de la muestra es hoy en día un factor importante del proceso analítico total. Una posible definición de la muestra podría ser: "la preparación de la muestra consiste en convertir una matriz real en una forma adecuada para su análisis". Para lograr este objetivo, el estado físico de la muestra deber ser el adecuado atendiendo a los requerimientos de la técnica seleccionada (sistema de extracción acoplado a un sistema de olfato electrónico), adicionalmente la premisa de obtener datos adecuados para el análisis se basa en la exactitud de la reproducción (repetibilidad en ñas medidas) de

las condiciones experimentales, tales como: temperatura, volumen del espacio de cabeza (HS), concentración y presión de vapor, humedad, etc. (Hodgins, 1997; Mielle 1996), además de elegir la vía óptima para el manejo de muestras en el caso específico, asimismo en la medición se debe tener en cuenta los factores ambientales que pueden influir en las respuestas de los sensores y deben ser cuidadosamente compensados. De lo contrario, la incertidumbre de la medición dará lugar a una gran pérdida de información y, en el peor de los casos, a una clasificación incorrecta (Boeker, 2014).

Un sistema industrial biológico lleva a cabo un análisis en tiempo real del entorno externo sin una preparación preliminar de los objetos que se estudiarán. Los sistemas olfativos artificiales también tienden a la máxima velocidad de operación y simplicidad; sin embargo, como regla general, no se puede evitar el procedimiento de preparación de muestras para el análisis. Los siguientes factores principales requieren procedimientos adicionales especiales (en particular, en la etapa de preparación de la muestra): (Burlachenko et al., 2016).

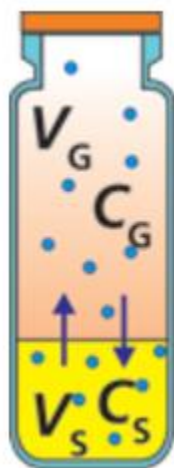
1. La cantidad de componentes en las mezclas a estudiar.
2. Baja concentración de las sustancias que son específicas del carácter del producto o proceso dado.
3. Presencia de componentes dominantes (por ejemplo, agua) en las mezclas a estudiar.
4. Sensibilidad del sensor (respuestas similares a diferentes sustancias);
5. Estado de agregación de la muestra (debe transformarse en fase de vapor para la medición).

Para proporcionar versatilidad en los sistemas de olfato electrónico, la velocidad de operación y portabilidad, la preparación de la muestra debe ser lo más simple posible (no requiera de mucho tiempo y no use equipos complejos adicional), adicionalmente debe formar un entorno de fase vapor que al estar en contacto con el conjunto de sensores haya una respuesta representativa con respecto a los componentes específicos que componen la muestra, así como también permita mejorar la calidad de clasificación y lograr una robustez reconocimiento.

La preparación de la muestra para el análisis se lleva a cabo los siguientes pasos: (i) formación de HS (un ambiente gaseoso o de vapor, eso representa la composición del componente del objeto bajo investigación); (ii) enriquecimiento de muestra, preconcentración, etc. (a baja concentración de los componentes seleccionados); (iii) filtrado y separación (para liberar componentes objetivo, componentes dominantes separados, proporcionar separación en el tiempo de diferentes componentes, etc.).

El análisis HS es la técnica de preparación de muestras más popular para SDOE. No requiere equipo especial ni tiempo considerable para procedimientos adicionales. El análisis del HS estático implica la determinación de los compuestos volátiles en la fase gaseosa que se encuentra por encima de una muestra (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006). La Figura 10, muestra un sistema típico con sus características físico-químicas más importantes como el Volumen de la Fase Líquida  $V_S$  y de la fase gaseosa  $V_G$ , la Concentración de los analitos tanto en Fase Líquida  $C_S$  como en Fase GAS  $C_G$ , y la migración de las moléculas de soluto entre las dos fases.

Figura 10. . Vial en que se crea un equilibrio estático



Si el sistema contiene analitos volátiles que son solubles en la fase de la muestra (fase condensada), éstos se distribuirán entre ambas fases de acuerdo con su equilibrio termodinámico. En el caso más general, para formar HS, un objeto se mantiene en un contenedor hermético de volumen constante o variable hasta que se alcanza un nivel de equilibrio preestablecido (a temperatura y presión constantes) entre la muestra (sólida o líquida) y el gas / fase de vapor. En este caso, la fase de vapor contiene todas las componentes del objeto en concentraciones definidas por las constantes de Henry:

$$P_i = H_p X_{i,l} \quad (12)$$

donde  $P_i$  es la presión parcial del componente  $i$  en la fase de vapor en unidades de atm,  $X_{i,l}$  es una fracción molar del componente  $i$  en el líquido y  $H_p$  es la constante de ley de Henry del componente  $i$  a una temperatura dada en unidades de atm. La presión de vapor total es la suma de las presiones parciales  $P_i$ .

#### 5.1.1.1. Formación del espacio de cabeza.

Para promover el establecimiento de ese equilibrio, generalmente se aplican algunos procedimientos adicionales de preparación de muestras. Están destinados a aumentar el

contacto superficial libre con la fase gaseosa: molienda, homogeneización, etc. para muestras sólidas y burbujeo, para líquidos. Se pueden usar algunos procedimientos especiales además del establecimiento espontáneo de equilibrio entre el objeto y la fase gaseosa. El calentamiento y la presión reducida se encuentran entre los procedimientos más populares y eficientes que promueven la transición de los componentes volátiles de la muestra a la fase gaseosa (vaporización) (Mielle & Marquis,1999)

El tiempo necesario para el equilibrado del HS depende de la difusión de los componentes volátiles de la muestra desde y hacia la muestra propiamente dicha. Sin embargo, no se puede predecir, por lo que el tiempo necesario de equilibrado debe ser establecido para las muestras en particular. Esto puede hacerse preparando varios viales con la misma muestra, manteniendo la temperatura constante para diferentes tiempos.

#### **5.1.1.2. Formación del espacio de cabeza.**

Históricamente, el análisis de espacio de cabeza, se ha aplicado principalmente utilizando métodos estáticos (espacio de cabeza estático, SHS): consiste en introducir la muestra en un vial cerrado mediante un septum, aplicar una determinada temperatura y después de la formación de HS [16,26,33], se extrae una alícuota de la fracción de vapor con una jeringa para muestras gaseosas. Usando las constantes de volatilidad de la ley de Henry, es posible estimar la composición de la fase gaseosa si se conoce la composición de la muestra de medición. Esto abre el camino para una planificación óptima de los procedimientos de muestreo, manipulación y medición (Robbins, 1993; Ouoba, 2015) Las ventajas de SHS son la simplicidad, el bajo costo y la ausencia de equipo adicional específico.

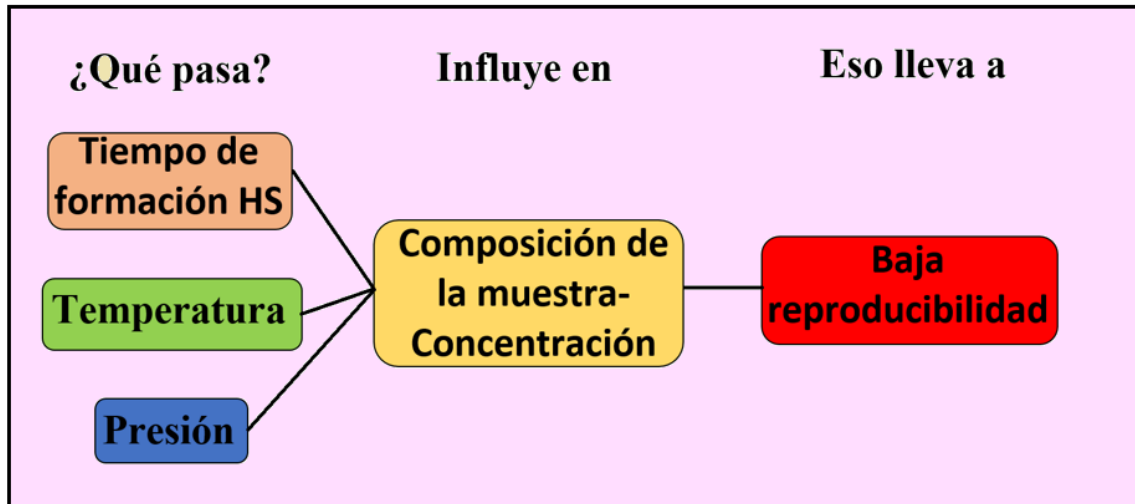
#### **5.1.1.3. Procedimientos de inyección de muestra**

Las muestras de prueba (HS, extracto, etc.) pueden inyectarse en la celda de medición utilizando métodos estáticos o dinámicos. De forma estática, el conjunto de sensores se encuentra directamente en el objeto HS o la muestra se inyecta a la celda sin un flujo, ya sea manualmente o con un automuestreador de pistón. Los parámetros que deben verificarse y pueden optimizarse son la temperatura, la presión, la concentración de la muestra, el volumen de la celda y la construcción. La principal ventaja de la forma estática de inyección de muestra es su simplicidad y requisitos mínimos para equipos adicionales.

#### **5.1.1.4. Factores que afectan la calidad de la clasificación**

Las principales razones para la degradación de la clasificación son una mala reproducibilidad, pérdida de información y distorsión de la señal. La Figura 11 presenta los factores que afectan la medición y como estos pueden influir en los resultados experimentales.

*Figura 11. Factores que afectan la medición.*



*Fuente: (Burlachenko et al., 2016)*

En el análisis del HS es deseable tener una concentración de analito suficientemente alta en el equilibrio del HS, y, mientras más elevada sea, mayor será la sensibilidad analítica, independientemente de la técnica que luego se emplee para el muestreo de volátiles.

Hay dos parámetros que se pueden modificar fácilmente en todas las técnicas de análisis del HS: el volumen del vial y su temperatura. Además, también es posible afectar las propiedades químicas de la matriz de la muestra y del analito. (Vázquez, 2018)

#### **5.1.1.4.1. La temperatura**

La temperatura es un parámetro muy importante, ya que afecta tanto la cinética como la termodinámica del proceso, y por lo tanto a la sensibilidad y selectividad del proceso. El calentamiento de muestras líquidas produce una mayor difusión de los analitos ya que el aumentar la temperatura esta tiende a homogenizar la distribución volátil, y por lo tanto podría contribuir a las mejoras en la reproducibilidad de los resultados de medición (Roussel et al., 1999). Sin embargo, al exceder ciertos rangos de temperaturas se obtiene menor cantidad de analito extraído ya que afecta el proceso de evaporación de los componentes del objeto. Según Roussel (1999), las mediciones hechas por una matriz de sensores son más repetibles, cuando los analitos de las muestras se generan a la temperatura más baja.

#### **5.1.1.4.2. La humedad**

La humedad es otro factor importante que afecta el muestreo y medición [48]. De hecho, el agua generalmente está presente en todas partes al menos en cantidad traza. Dado que muchos recubrimientos de sensores son sensibles al agua, puede enmascarar la contribución de otros componentes de mezclas a base de agua. Esto lleva a la formación de señales que no pueden clasificarse de manera efectiva.

#### **5.1.1.4.3. Tiempo de extracción**

El objetivo de todo proceso de extracción es alcanzar el equilibrio de distribución en el sistema, ya que cuando ocurra se extraerá la máxima cantidad de analito. El tiempo de equilibrio se define como el tiempo tras el cual la cantidad de analito en cada fase permanece constante y corresponderá a la cantidad extraída a tiempo infinito. La agitación de una muestra reduce el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ya que favorece a la difusión de los analitos hacia el espacio de cabeza.

#### **5.1.1.4.4. Volumen del espacio de cabeza y forma del vial**

El modo de espacio de cabeza, los analitos son distribuidos entre la matriz de la muestra, y el espacio de cabeza. Los compuestos muy volátiles se acumulan en el espacio de cabeza, por lo que su volumen deber ser pequeño para que los analitos se concentren antes de su difusión. Si el volumen del espacio de cabeza es grande se produce una sustancial perdida de sensibilidad. El volumen del espacio de cabeza afecta también a la cinética del proceso. Cuanto más pequeño sea este, con relación al volumen de muestra, más rápido será el transporte de los analitos.

La forma del vial también afecta a a la cinética del proceso de extracción. Cuando se utiliza la modalidad de espacio de cabeza la transferencia de masa entre la muestra y el espacio de cabeza está influenciada por el tamaño de la superficie de contacto entre las dos fases. (tesis-vidal)

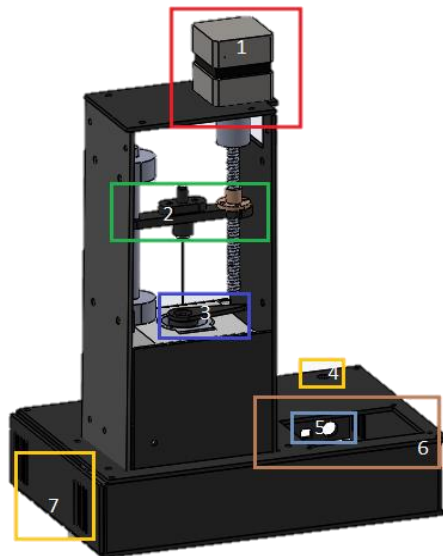
### **5.1.2. Descripción general del muestreador de espacio de cabeza estático (MECS)**

De acuerdo a lo expuesto anteriormente acerca de la importancia de pre-concentrar la muestra, y debido a que no se contaba con un equipo para realizar este procedimiento, se justificó realizar el diseño e implementación de un sistema de extracción de espacio de cabeza (MECS) que cumpliera la función de concentrar y extraer los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las especies bacterianas.



En la Figura 12, se ilustra cómo está compuesto el muestreador de espacio de cabeza estático (MECS).

*Figura 12. Diseño del sistema de extracción estático (MECS)*



*Nota 1. El MECS está compuesto por 1). Motor paso a paso para el control de tornillo sin fin del inyector, 2). Inyector, 3). Celda calefactora acoplada a un sensor de temperatura, 4). Fuente de alimentación (5-12VDC), 5). Interfaz táctil LCD, 6). Carcasa base y 7). Conector de alimentación alterna*

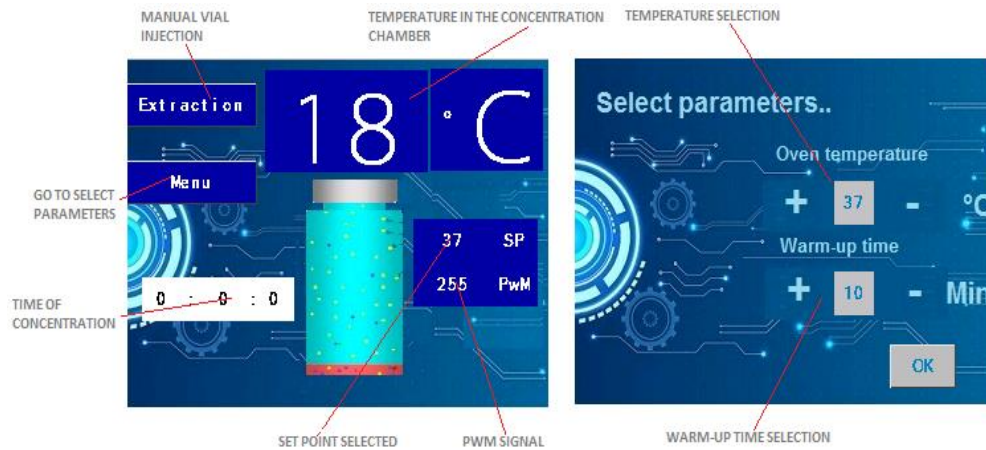
*Fuente: Autores*

El funcionamiento del sistema MECS es basado en el control de temperatura de la celda calefactora y el accionamiento de un motor paso a paso para el control del inyector de manera automática.

1. El proceso comienza en el momento de ubicar la muestra líquida que contiene los analitos orgánicos en un vial de 20 ml cerrado herméticamente mediante un septum, el cual es situado dentro de la celda calefactora con el objetivo de aplicar una temperatura adecuada y generar los componentes volátiles a una fase vapor (espacio superior del vial conocido como "Headspace") para después realizar posteriormente la extracción. El usuario a través de una interfaz de usuario gráfica provista de una pantalla *Liquid Crystal Display (LCD)* define el tiempo de incubación necesario para producir la volatilización de los compuestos y la

temperatura de la muestra en un rango de 0 a 110°C, como se observa en la Figura 13.

*Figura 13. Visualización de los parámetros a trabajar.*



*Fuente: Autores, jóvenes investigadores.*

### 5.1.2.1. Características técnicas del sistema de calentamiento

A continuación, en la *Tabla 6*, se describen los parámetros de la celda calefactora.

*Tabla 6. Descripción de parámetros.*

<b>Parámetros</b>	<b>Valor</b>
Resistencia	70 OHM
Voltaje	35 VDC
Corriente	0.5 A
Potencia	17.5 W

*Fuente: Autores*

La temperatura de la celda calefactora es regulada mediante un controlador PID discreto implementado en el sistema embebido (una tarjeta Arduino Mega). La acción de control se realiza sobre la resistencia calefactora con una potencia máxima de 17.5W, y sucesivamente es controlada por una salida analógica con Modulación Ancho de Pulso (PWM). La temperatura referenciada es censada a través de un termopar Tipo K y es mantenida por dicho controlador. Ver características del termopar (*Tabla 7*)

*Tabla 7. Características de un termopar tipo K*

<b>Parámetros</b>	<b>Valor</b>
Rango de temperatura	0 – 800 °C
Voltaje de funcionamiento	3. 0 ~ 5. 5V
Resolución de la temperatura	0.25°C

*Fuente: (Autores)*

### 5.1.2.2. Controlador PID de temperatura

Con el objetivo de conocer el comportamiento de la variable de salida (Temperatura) en función de la variable de entrada (PWM), el sistema se sometió a variaciones de la señal PWM y la temperatura se registró como se observa en la .

*Tabla 8.*

*Tabla 8. Datos adquiridos variando la señal PWM.*

<b>PWM</b>	<b>Temperatura</b>	<b>PWM</b>	<b>Temperatura</b>
0	24	130	89
10	26,5	140	93,5
20	31	150	98,75
30	37,5	160	103
40	42,5	170	107
50	46,5	180	112,3
60	50,5	190	116,8
70	56	200	121,7
80	61	210	127,8
90	67	220	134
100	73	230	139,6
110	78,5	240	144,7
120	83	250	151

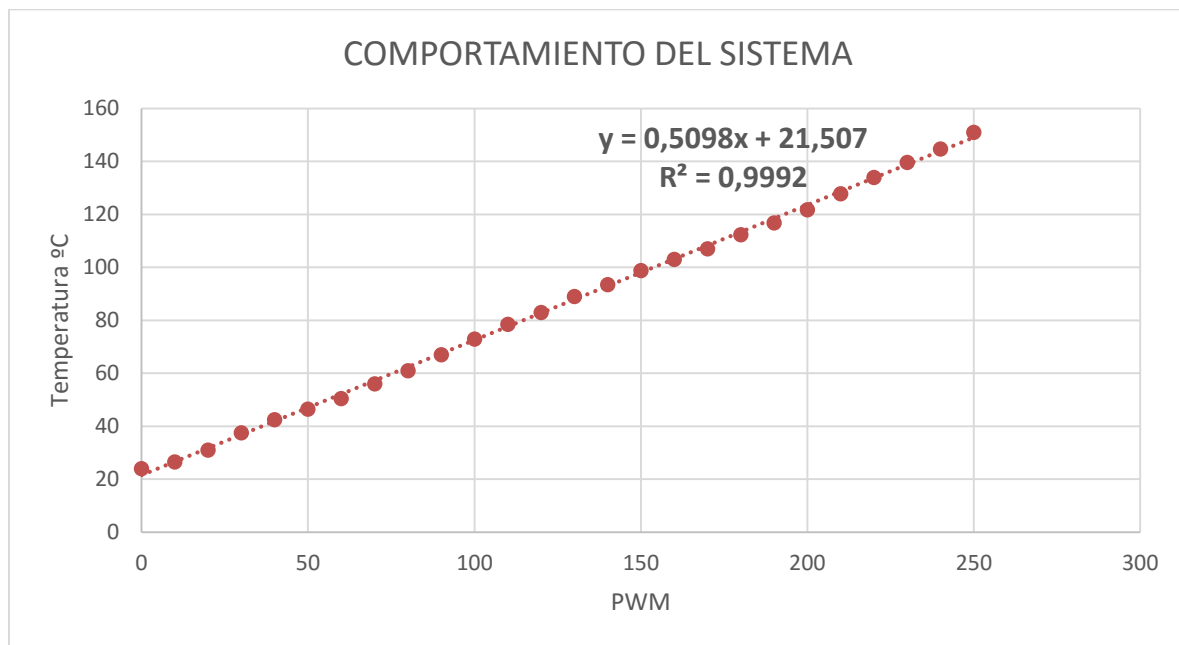
*Fuente: (Autores)*

Los datos obtenidos en la *Tabla 8*, se graficaron en Excel, para obtener la ecuación de la recta se escogió la línea de tendencia que mejor se ajustara a los datos adquiridos, debido

a que se observó que los valores de los datos aumentaban en una línea recta a un ritmo constante, se escogió la línea de tendencia lineal para obtener dicha ecuación.

En la Figura 14, se observa que el sistema tiene un comportamiento altamente lineal, esto se debe a que los componentes (Fuente conmutada, transistor de potencia, resistencia eléctrica, sensor) presentan comportamientos lineales de manera independiente.

*Figura 14. Comportamiento entrada- salida del sistema.*

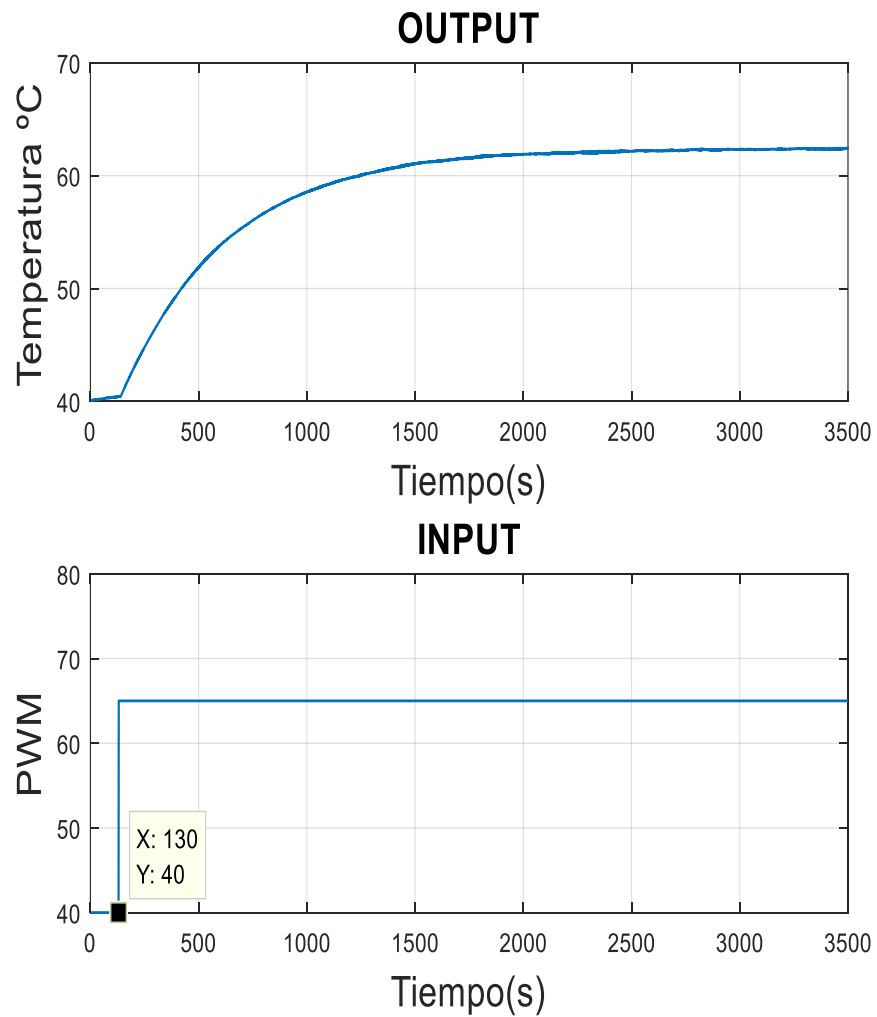


El hecho de que el sistema presente un comportamiento lineal facilita su control, con la implementación de un algoritmo de control PID se puede controlar la temperatura de manera satisfactoria, con el mismo controlador se puede trabajar en diferentes puntos de operación.

#### **5.1.2.2.1. Cálculo del controlador.**

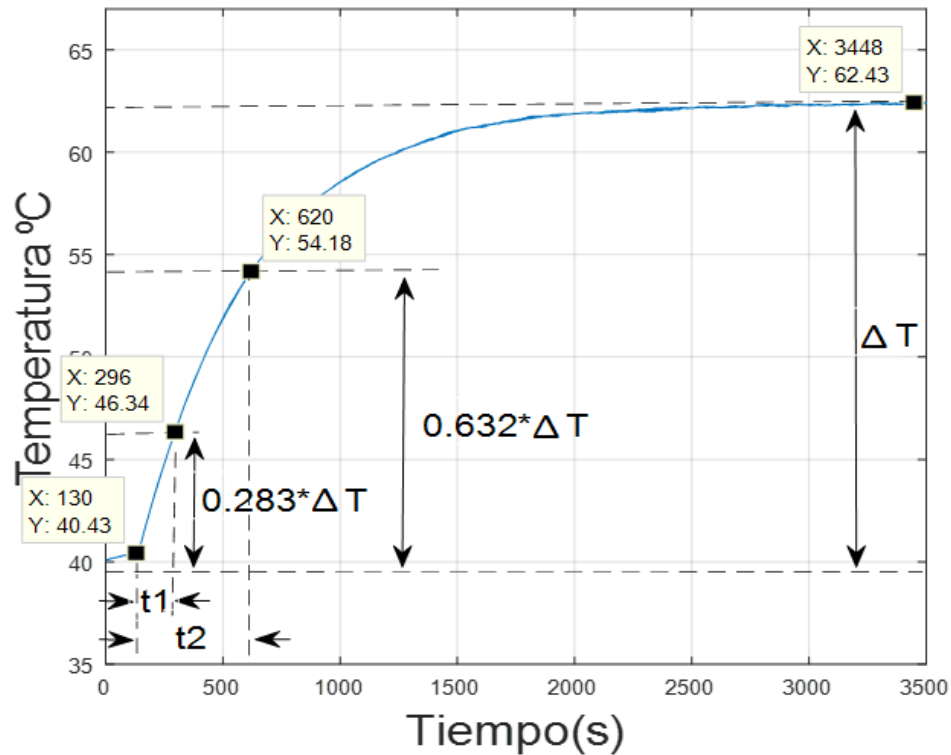
Los parámetros del controlador se calcularon empleando el método a lazo abierto o curva de reacción. Como su nombre lo indica, estos métodos se utilizan en lazo abierto, colocando el controlador en manual. Los datos requeridos para el ajuste se obtienen mediante la prueba de escalón que proporciona una curva de reacción como respuesta. Estos datos son los parámetros de  $K$ ,  $\tau$ ,  $t_o$ . Ver Figura 15.

*Figura 15. Método a lazo abierto o curva de reacción.*



El sistema se sometió a una entrada escalón de 25 unidades en  $t=130$  s dando como resultado la siguiente curva de reacción. Ver Figura 16.

*Figura 16. Curva de Reacción del Proceso usando el método de los dos Puntos.*



Se aplicó el método de los dos puntos  $t_{0.283}$  y  $t_{0.632}$ , estos tiempos y la ganancia del sistema se calcularon visualizado la curva de reacción.

Para calcular la ganancia del sistema se usa la Ec. 6

$$k = \frac{\Delta T}{\Delta PWM} \quad (13)$$

$$k = \frac{62.43 - 40}{65 - 40} = \frac{22.43}{25} = 0.8972$$

$$t_1 = 296 - 130 = 166$$

$$t_2 = 620 - 130 = 490$$

Teniendo estos dos puntos como datos, la constante de tiempo ( $\tau$ ) y el tiempo muerto ( $t_0$ ) son determinados por las ecuaciones 7 y 8:

$$\tau = 1.5[t_2 - t_1] \quad (14)$$

$$\tau = 1.5[490 - 166] = 486$$

$$t_0 = t_2 - \tau \quad (15)$$

$$t_0 = 490 - 486 = 4$$

Los parámetros  $k_p$ ,  $\tau_i$  y  $\tau_d$  son calculados con las ecuaciones propuestas por Ziegler-Nichols, Ver *Tabla 9*.

*Tabla 9. Parámetros de sintonización usando el Método de Ziegler-Nichols a Lazo*

Controlador	Parámetro de ajuste	Ecuación
<b>Proporcional, P</b>	$k_p$	$\frac{1}{k} = \left(\frac{t_0}{\tau}\right)^{-1} \quad (16)$
<b>Proporcional + Integral, PI</b>	$k_p$	$\frac{0.9}{k} \left(\frac{t_0}{\tau}\right)^{-1} \quad (17)$
	$\tau_i$	$3.33t_0 \quad (18)$
<b>Proporcional + Integral + Derivativo PID</b>	$k_p$	$\frac{1.2}{k} = \left(\frac{t_0}{\tau}\right)^{-1} \quad (19)$
		$2t_0 \quad (20)$
	$\tau_i$	
	$\tau_d$	$\frac{t_0}{2} \quad (21)$

*Fuente: (s,f)*

Reemplazando los valores obtenemos que:

$$k_p = 162$$

$$\tau_i = 8$$

$$\tau_d = 2$$

Remplazando estos parámetros en el siguiente conjunto de ecuaciones obtenemos las constantes  $K_{pd}$ ,  $K_{id}$  y  $K_{dd}$  para implementar el algoritmo digital en la tarjeta de control, el tiempo de muestreo  $\tau_s$  fue de 1 segundo.

$$K_{pd} = k - \frac{k * \tau_s}{2T_i} \quad (22)$$

$$K_{pd} = 0.8972 - \frac{0.8972 * 1}{2 * 8} = 0.8411$$

$$K_{id} = \frac{k * \tau_s}{T_i} \quad (23)$$

$$K_{id} = \frac{0.8972 * 1}{8} = 0.112$$

$$K_{dd} = \frac{k * T_d}{\tau_s} \quad (24)$$

$$K_{dd} = \frac{0.8972 * 2}{1} = 1.798$$

A continuación, se presentan las respuestas del controlador implementado en el sistema físico, trabajando en tres diferentes puntos de operación. Ver

Figura 17,

Figura

18

y

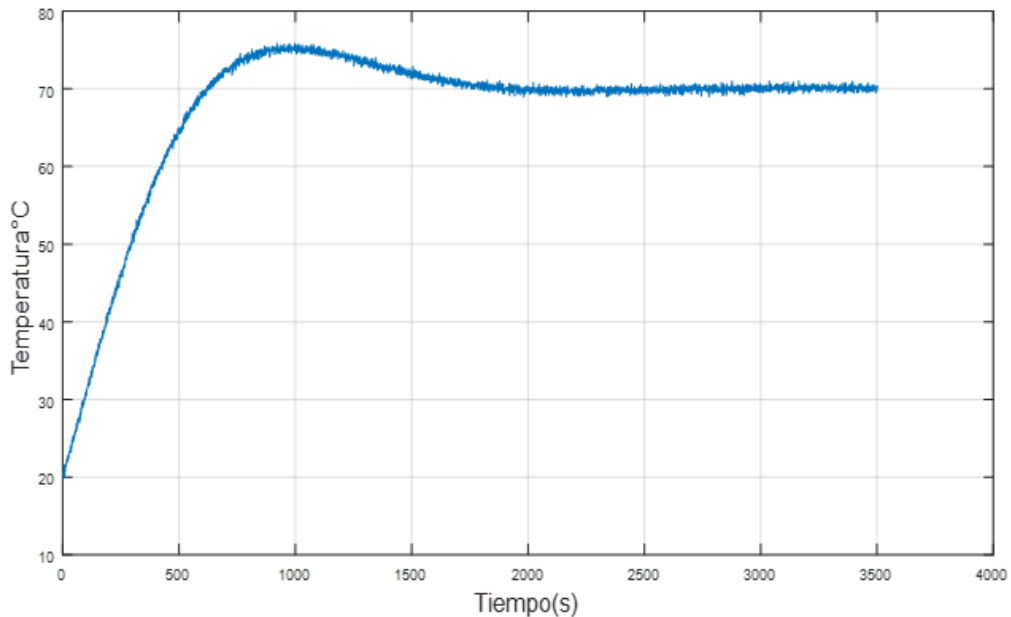
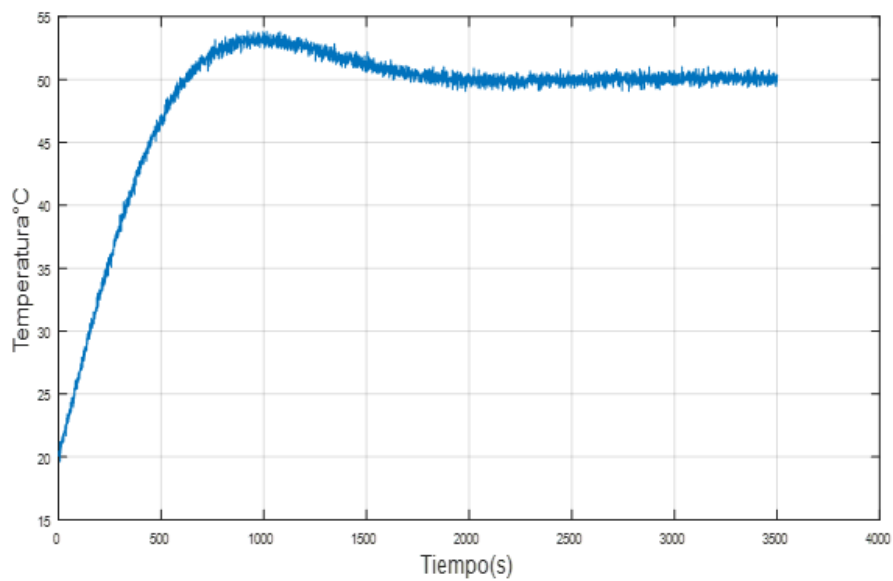


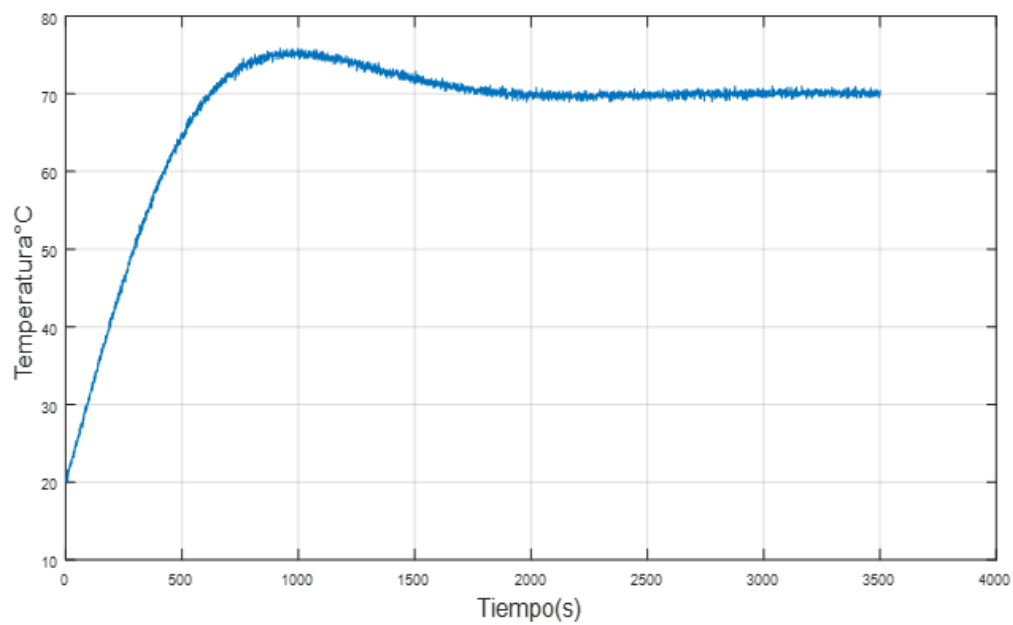
Figura 19.



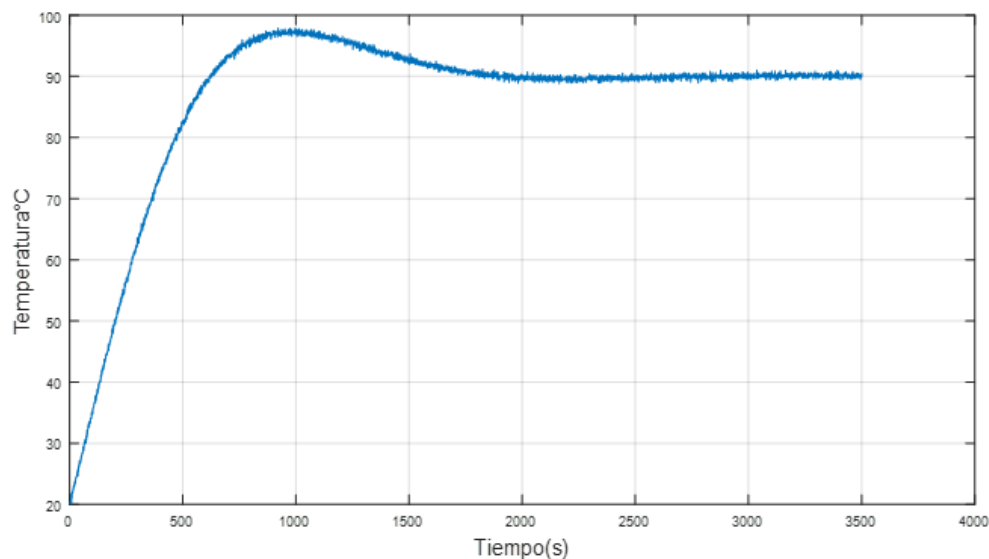
*Figura 17. Respuesta del sistema de control a 50°C*



*Figura 18. Respuesta del sistema de control a 70°C*



*Figura 19. Respuesta del sistema de control a 90°C*



- Una vez la temperatura deseada es alcanzada inmediatamente se acciona el motor paso a paso, el cual desplaza una jeringa de acero inoxidable desde arriba hacia abajo con el fin de extraer los compuestos volátiles desde el vial. En este paso se acciona por un tiempo determinado una electro-bomba y electroválvula de tres vías que permiten arrastrar todos los compuestos volátiles generados previamente hacia la entrada de la cámara de sensores.

## 5.2. Sistema de olfato electrónico

En este estudio se implementó una nariz electrónica llamada B-NOSE, desarrollada en la universidad de Pamplona (Daniel Rojas). Para realizar las diferentes medidas se configuró el modulo mediante el software Bnose en el apartado de adquisición de datos. Para todas las muestras se configuro el software de la forma que se muestra en la *Figura 20*, estos tiempos fueron escogidos mediante pruebas de sensibilidad y repuesta del sistema.

*Figura 20. Tiempos de concentración, adquisición y limpieza programados para cada medida.*

*Fuente (Rojas, 2010)*

Adicionalmente en se describen los 16 sensores gases de óxidos metálicos, Taguchis de la empresa FÍGARO sensor, que forman parte de la matriz de sensores.

*Tabla 10. Lista de los sensores que componen la matriz de sensores de la B-NOSE*

Sensor de gas FÍGARO Serie-8	Aplicación	Tipo de Gas sensible	Serie-8 Tipo	cantidad	Número del sensor
<b>TGS 826</b>	Detección de olores	Amoníaco y aminas	Tipo C	2	S1, S4
<b>TGS 831</b>	Detección de gas halocarburos (gases refrigerantes)	R-22, Monoclorodifluorometano	Tipo C	2	S2, S15
<b>TGS 821</b>	Detección de gas combustible	Hidrógeno	Tipo C	2	S3, S12
<b>TGS 842</b>	Detección de gas combustible	Metano Y gas natural	Tipo R	2	S5, S14
<b>TGS 880</b>	Control de cocción	humo de los alimentos (Alcohol, olor)	Tipo M	2	S6, S10
<b>TGS 825</b>	Detección de gas toxico	sulfuro de hidrógeno	Tipo C	2	S7

<b>TGS 813</b>	Detección de gas combustible	Hidrocarburos en general	Tipo R	1	S8
<b>TGS 800</b>	Control de calidad del aire	contaminantes del aire en general	Tipo R	1	S9
<b>TGHS 822</b>	Detección de vapores disolventes	Alcohol y orgánicos	Tipo R	1	S11
<b>TGS 832</b>	Detección de gas halocarburos (gases refrigerantes)	R-134 <sup>a</sup> 1,1,1,2-Tetrafluoroethane	Tipo C	1	S13
<b>TGS 830</b>	Detección de gas halocarburos (gases refrigerantes)	R-22 ,Monoclorodifluorometano	Tipo C	1	S16

*Fuente: (Daniel,2010)*

La conexión del equipo MECS con el equipo multisensorial se realizó a través de una tubería de ¼ de pulgada de aproximadamente 30 centímetros de longitud (Ver Figura 21). La recuperación de los sensores se realiza a partir del accionamiento de la electroválvula de tres vías, la cual es accionada nuevamente con el fin de suministrar aire del medio ambiente y hacer la limpieza del sistema de medida. Una segunda electroválvula fue ubicada en la salida de la cámara de sensores para ser utilizada como una segunda opción en la medición de los compuestos volátiles. La idea de ubicar esta electroválvula es para atrapar los compuestos dentro de la cámara de medida y hacer la medición (ver Figura 9). Con esta configuración fue posible obtener un conjunto de medidas repetitivas con diferentes rangos de temperatura y ciclos de adquisición de la muestra.

*Figura 21. Nariz electrónica B-NOSE acoplada al muestreador de espacio de cabeza estático*



### 5.3. Acondicionamiento de las muestras

Para el acondicionamiento de las muestras fue necesario preparar un conjunto de muestras, que se definieron como control negativo, control positivo y controles de especificidad.

#### 5.3.1. Preparación de los controles

##### 5.3.1. Control negativo.

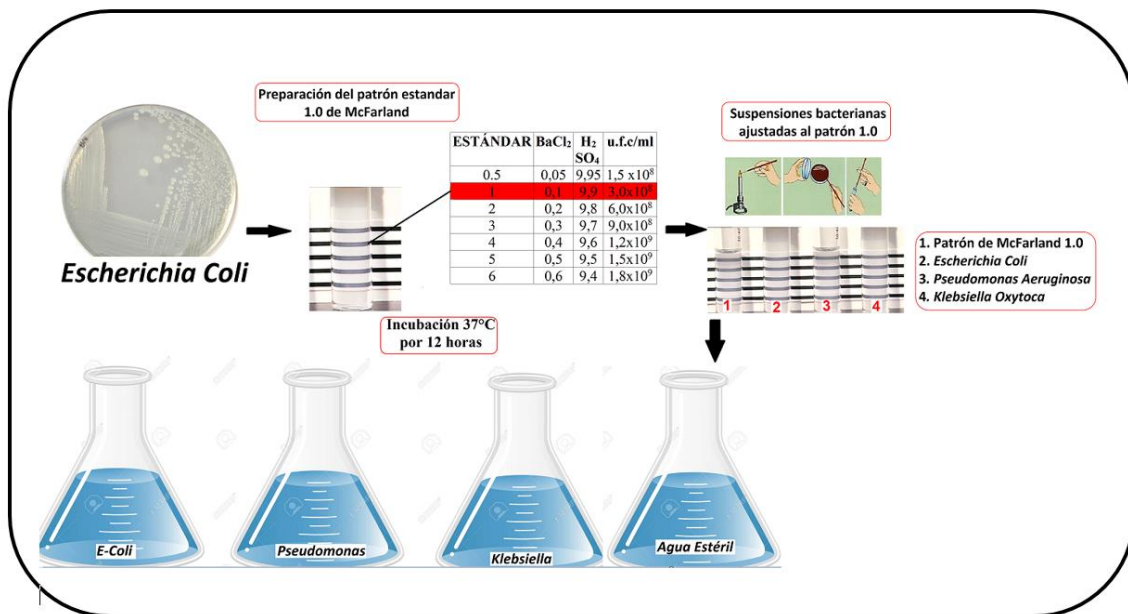
Consistió en una muestra de agua que fue llevada a una autoclave por un tiempo de 15 minutos a una temperatura de 121,1 °C, este procedimiento se hizo con el fin de obtener una muestra estéril que esté libre de cualquier microorganismo.

##### 5.3.2. Control positivo y de especificidad.

Para la preparación de los controles positivos y de especificidad se definió una concentración bacteriana de  $3 \times 10^8$  bacterias/mililitro correspondiente al patrón N° 1.0 de la escala de McFarland, estos estándares son usados como una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana, ajustando la turbidez de suspensiones bacterianas hasta que el número de bacterias llegue a la concentración deseada. (Zapata et al., 2015).

Para la preparación de las muestras, primero se preparó el patrón de turbidez de McFarland N° 1.0, para ello se usó un tubo de ensayo con tapa rosca de 10 ml (esterilizado) el cual se le añadió 9.9 ml de ácido sulfúrico al 1% y 0.1 ml de solución acuosa de cloruro de bario 1%, produciendo un precipitado de sulfato de bario suspendido el cual causa una turbidez en la solución. La solución preparada se tomó como base para preparar las concentraciones de *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *K. Oxytoca*.

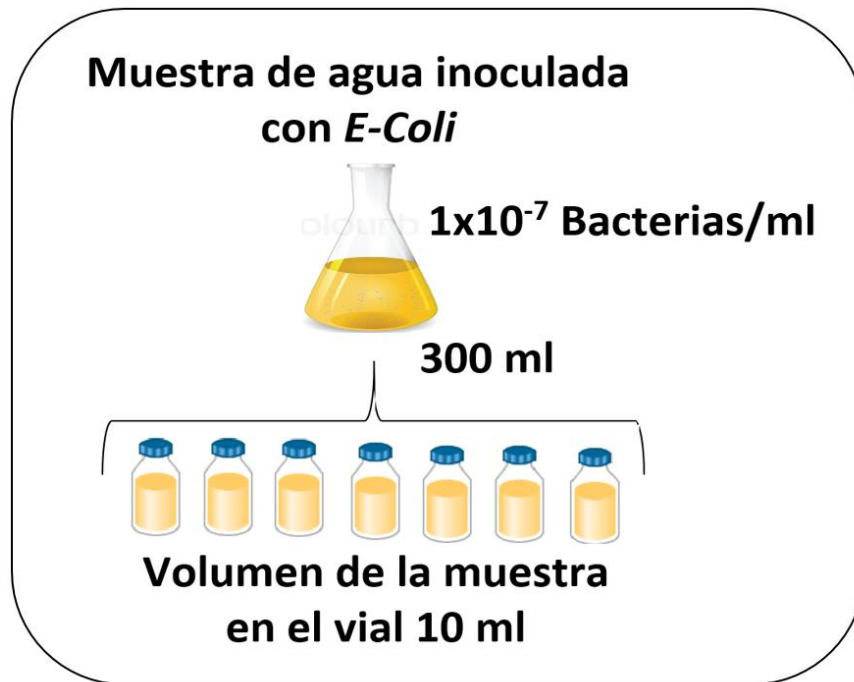
Figura 22. Metodología para la inoculación e incubación de las muestras.



**Control positivo:** Para la preparación del control positivo se usó una placa de Petri con una siembra por agotamiento de *Escherichia coli* (cepa ATCC 25922), en un medio de cultivo sólido llamado agar nutritivo (ver Figura 22). A partir de estas siembras se preparó una suspensión bacteriana a una concentración de  $3 \times 10^8$  bacterias/mililitro, usando como referencia para ello el patrón N° 1.0 de la escala de McFarland. Posteriormente, esta suspensión bacteriana fue diluida 30 veces en agua estéril para obtener 300 ml, con una concentración final de  $1 \times 10^7$  bacterias/ml. Finalizada la dilución, las muestras fueron incubadas durante 12 horas a 37°C con el objetivo de mejorar el enriquecimiento de los compuestos generados.

Una vez inoculadas e incubadas las muestras, se acondicionaron 10 ml de esta en los viales como se observa en la Figura 23.

Figura 23. Acondicionamiento de la muestra en los viales



**Controles de especificidad:** Con el fin de estimar la especificidad de la detección, se prepararon volúmenes de 300 ml con una concentración final estimada de  $1 \times 10^7$  bacterias/ml de las bacterias *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klebsiella Oxytoca* (ATCC 49131). La preparación de estos controles siguió la misma metodología que fue empleada para preparar el control positivo. *K. Oxytoca*, al igual que *E. Coli* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, por lo que ambas especies pertenecen al grupo de las bacterias coliformes. *E. Coli* está clasificada como coliforme fecal, mientras que *K oxytoxa* no se incluye en este grupo.

#### 5.4. Realización de las medidas.

En esta investigación se planteó una metodología para la determinación rápida de la contaminación bacteriana del agua proveniente de las plantas de agua potabilizadora, en conjunto se evaluaron algunos parámetros analíticos tomados como referencia para validar la técnica propuesta e implementada entre ellos la especificidad, selectividad y sensibilidad. La metodología se dividió en tres etapas:

##### 5.4.1 Primera etapa.

La primera etapa consistió en analizar muestras de agua estéril y muestras inoculadas (ver metodología de la Figura 22) con *Escherichia Coli*, modificando la temperatura de

incubación en los viales (50°C, 70°C y 90°C), esto se hizo con el objetivo de verificar la temperatura óptima a la cual el olfato electrónico acoplado al equipo de extracción conseguía discriminar entre el control negativo y la muestra con el analito (*E. coli*).

En la *Tabla 11* , se encuentran los parámetros usados para analizar las muestras de agua y *E-Coli*.

*Tabla 11. Parámetros usados para la discriminación de las muestras*

<b>Parámetros del muestreador de espacio de cabeza.</b>	
<i>Volumen de la muestra.</i>	10 ml
<i>Tiempo de calentamiento</i>	15 minutos
<i>Temperatura de incubación de los viales.</i>	50°C, 70°C y 90°C
<b>Parámetros del muestreo B-NOSE</b>	
<i>Tiempo de concentración.</i>	5 minutos
<i>Tiempo de captura</i>	10 minutos
<i>Tiempo de limpieza</i>	10 inutos

#### **5.4.2. Segunda etapa**

Una vez finalizada la etapa 1 y de acuerdo con los resultados obtenidos, se escogió la temperatura óptima de mejor clasificación del agua estéril y *E. coli* (50°C) para realizar pruebas de especificidad/selectividad del método propuesto. En la especificidad se buscó evaluar la capacidad del olfato electrónico acoplado al equipo de extracción para diferenciar el analito de interés, en este caso *E. coli*, que es una bacteria indicadora de contaminación fecal en aguas (control positivo), de otros analitos que son similares y pueden tender a la confusión. Por esta razón para ello se escogieron como controles de especificidad a *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria Gram (-) de importancia en aguas y *Klebsiella oxytoca* otra bacteria Gram (-), perteneciente a la misma familia de *E. coli*, la Enterobacteriaceae, y que es clasificada dentro del grupo de los coliformes totales, a



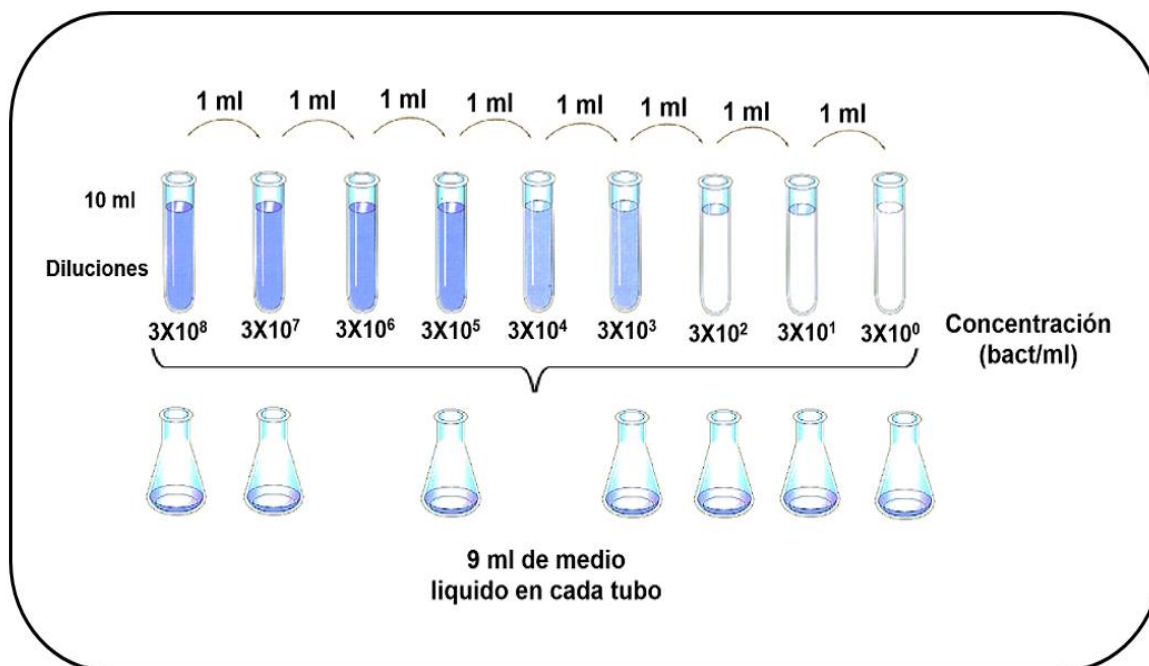
diferencia de *E. coli* que conforma el de los coliformes fecales. Los resultados obtenidos fueron comparados con la muestra sin contaminación bacteriana, agua estéril (control negativo). Luego de obtener los resultados se evaluó la capacidad del método para producir resultados exactos clasificando las tres especies bacterianas y el agua estéril.

Para realizar el análisis de las muestras se usaron los mismos parámetros descritos en la *Tabla 11*, con la salvedad de que se usó una única temperatura: 50°C.

### 5.4.3. Tercera etapa

Para evaluar la sensibilidad del método, se realizan diluciones del control positivo para disminuir progresivamente la población bacteriana en suspensión, con el fin de estimar la población bacteriana más pequeña que el sistema es capaz de detectar. Es decir, con esto se busca determinar la capacidad para detectar la bacteria (*E. Coli*) en bajas concentraciones.

*Figura 24. Procedimiento llevado a cabo para la dilución del control positivo.*



Fuente: (Autores)

La técnica de dilución consistió en la preparación (inoculación) de una serie de tubos que contenían 9 ml de agua estéril, se transfirió 1 ml de la suspensión bacteriana con *E-coli* de un tubo al siguiente, iniciando el procedimiento a partir del tubo que contenía una concentración de  $3 \times 10^8$  bacterias/ml. Un esquema general del procedimiento de diluciones secuenciales se encuentra representado en la Figura 24. Entre cada dilución y otra, se debía mezclar bien el contenido de los tubos. Con el fin de disponer de suficiente volumen de las diluciones de control positivo, se procedió a inocular 291 ml de agua estéril, con los 9 ml de la suspensión de *E. Coli*, recién preparada. De esta manera se prepararon 300 ml del control positivo a diferentes concentraciones (Nota: en otras palabras, la suspensión McFarland 1.0 fue diluida 30 veces, cambiando la concentración como se muestra en la *Tabla 12* ). Finalizada la dilución se llevaron las muestras a la incubadora durante 12 horas a  $37^\circ\text{C}$  con el objetivo de mejorar el enriquecimiento de los compuestos generados.

*Tabla 12. Concentraciones iniciales y finales después de la incubación.*

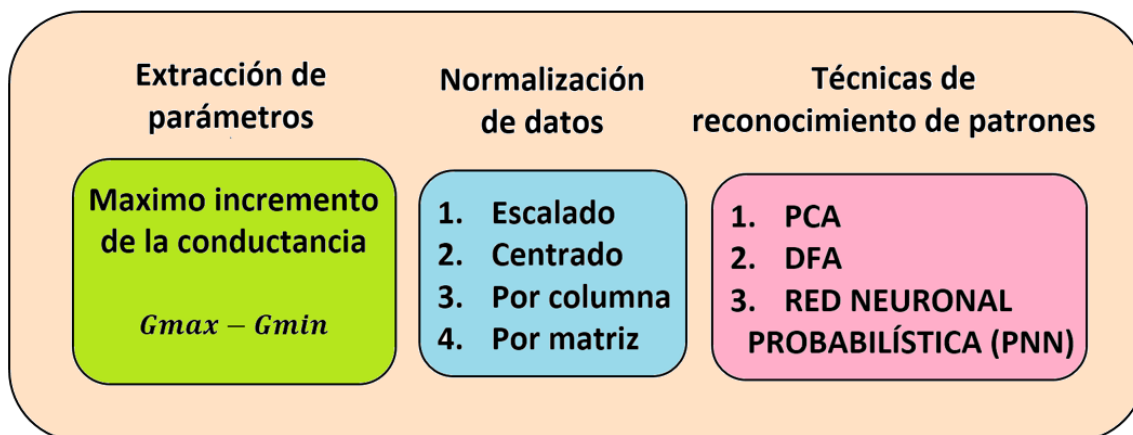
<b>Concentración inicial (Bacterias/ml)</b>	<b>Concentración final después de la dilución (Bacterias/ml)</b>
$3 \times 10^8$	$1 \times 10^7$
$3 \times 10^7$	$1 \times 10^6$
$3 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
$3 \times 10^5$	$1 \times 10^4$
$3 \times 10^4$	$1 \times 10^3$
$3 \times 10^3$	100
$3 \times 10^2$	10
$3 \times 10^1$	1.0
$3 \times 10^0$	0.1

El procedimiento explicado anteriormente se realizó con el agua proveniente de las plantas de tratamiento de agua potable de los municipios de Pamplona y Toledo.

### **5.5. Adquisición de medidas, análisis y procesado de datos.**

La matriz de sensores que hacen parte de la cámara de medición, transforman las reacciones químicas en señales eléctricas. Las señales adquiridas son tratadas por métodos de pre-procesado de datos, en los cuales se puede distinguir dos etapas: Extracción de parámetros, normalización de datos. (Moreno et al., 2009)

En este trabajo se ha considerado usar el parámetro de máximo incremento de la conductancia ( $G_{max}-G_{min}$ ) para extraer los parámetros de cada sensor, donde  $G_{max}$  es el valor de la respuesta máxima del sensor ante la reacción con el compuesto y  $G_{min}$  es el valor de línea base y/o el valor del estado estacionario del sensor, adicionalmente se usó el parámetro de incremento en la conductancia.



Una vez que se han extraído los parámetros de los sensores, es necesario escalarlos para que puedan ser utilizados por los algoritmos de reconocimiento de patrones. Existen diversos tipos de escalado: lineales, logarítmicos, de variables o de medidas. Cabe resaltar que para esta investigación se probaron 4 tipos de normalizado: Auto Escalado, Centrado, por columna y por matriz. Los datos obtenidos de la etapa anterior, son finalmente analizados por técnicas de reconocimiento de patrones (PCA y DFA) e inteligencia artificial (PNN) para la toma de decisiones, clasificación e identificación de las muestras.

## 5.6. Validación del sistema

Para la validación de la metodología implementada, se tomaron muestras de agua provenientes de las plantas de tratamiento de agua potable de los Municipios de Pamplona (Figura 26) y Toledo (Figura 25). Para la recolección de las muestras se usaron recipientes previamente esterilizados con capacidad de 1 L. Las operaciones unitarias para realizar la captación de las muestras de agua fueron: Entrada de la planta (Canaleta parshall), después de la sedimentación, salida de la planta y agua de grifo, conservándolas a 4 °C para su posterior análisis.

Las muestras recolectadas se dividieron en dos grupos: el primer grupo hace referencia a las muestras que fueron analizadas en los laboratorios de microbiología de la Universidad de Pamplona mediante el método de filtración por membrana y el segundo grupo

corresponde a las muestras analizadas por el MECS acoplado a un SDOE. Estos dos métodos se implementaron para identificar y cuantificar la concentración de *E-coli*, presentes en las muestras recolectadas. Con esta validación lo que se buscó fue que el sistema en general sea similar o aproximado a los demás métodos.

*Figura 25. Estructura de la PTAP del municipio de Toledo.*



*Figura 26. Estructura de la PTAP del municipio de Pamplona*



## CAPITULO 6:

# ANÁLISIS Y RESULTADOS

### 6.1. Primera etapa (Pruebas del sistema con muestras de agua estéril y *Escherichia coli* a diferentes temperaturas)

Una vez establecida la metodología a seguir, se realizaron pruebas de agua estéril y *E-coli* a diferentes temperaturas (50, 70 y 90 °C), con el fin de comprobar la capacidad que tiene el SDOE para discriminar entre las dos clases de muestra. Para este análisis se realizaron 10 repeticiones por cada tipo de muestra, y se seleccionaron dos componentes principales para realizar las gráficas.

En la Figura 27 y Figura 28, se observa una buena discriminación de los clusters de Agua estéril y E-coli a 90°C usando PCA (97.1 % de varianza) y con mayor acierto en la clasificación usando la técnica DFA (100% de acierto).

*Figura 27. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 90°C.*

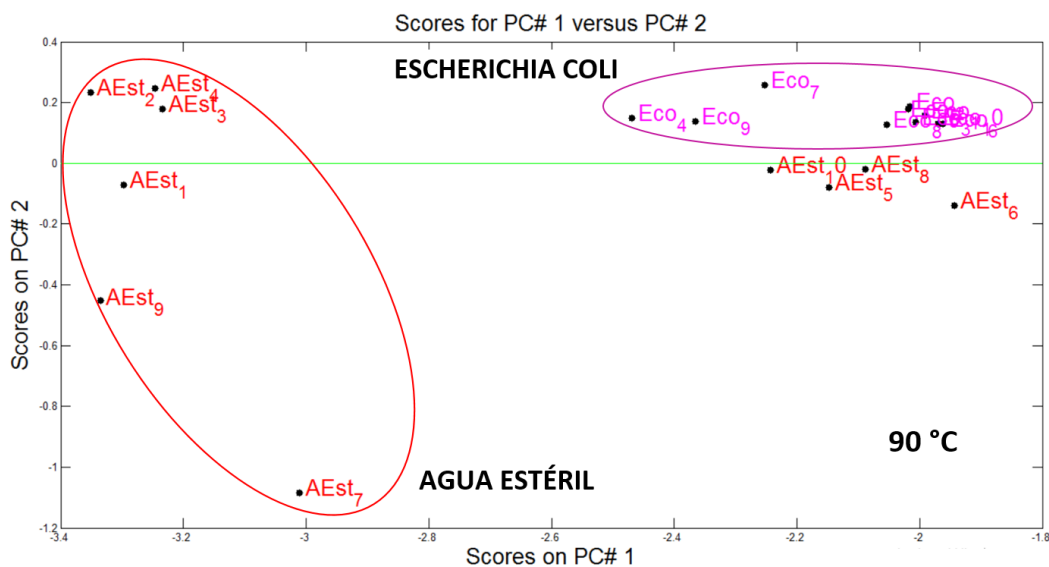
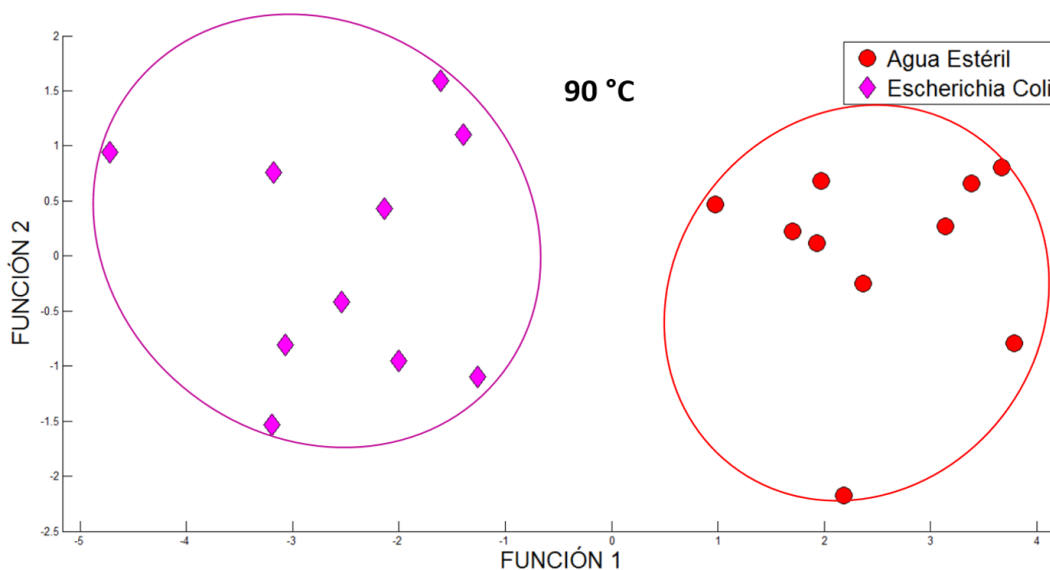


Figura 28. Resultados con análisis de funcionamiento de discriminantes (DFA) de Agua estéril y *Escherichia Coli* a 90°C



En La Figura 29, corresponde a los resultados obtenidos usando PCA (98.3% de varianza), en ella se observa una buena discriminación entre las muestras contaminadas con E-Coli y el control negativo, sin embargo existe una superposición de dos ensayos de agua estéril en el clusters de las muestras de E-Coli. La Figura 30 muestra la diferenciación de clusters por DFA con un 100% de acierto.

Figura 29. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y *Escherichia Coli* a 70°C.

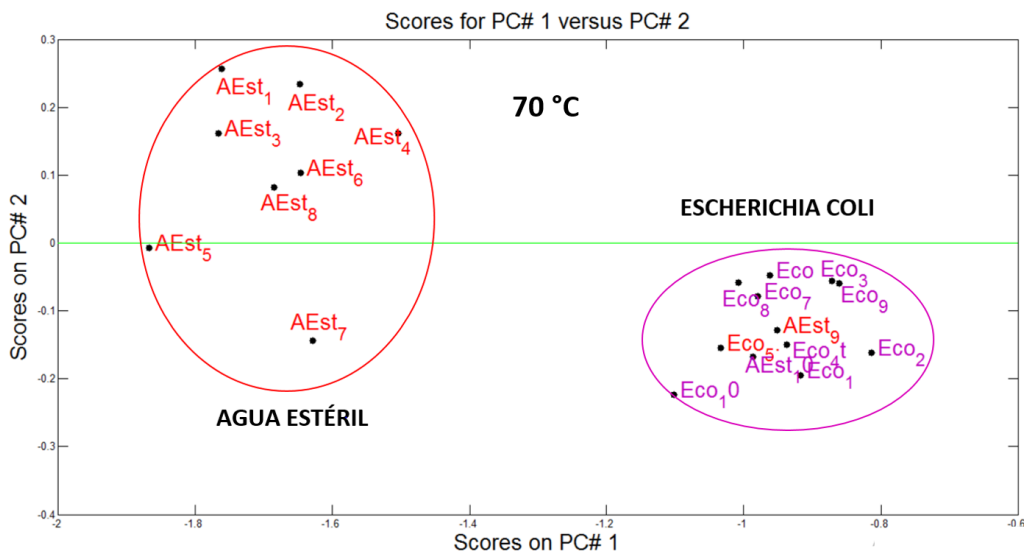
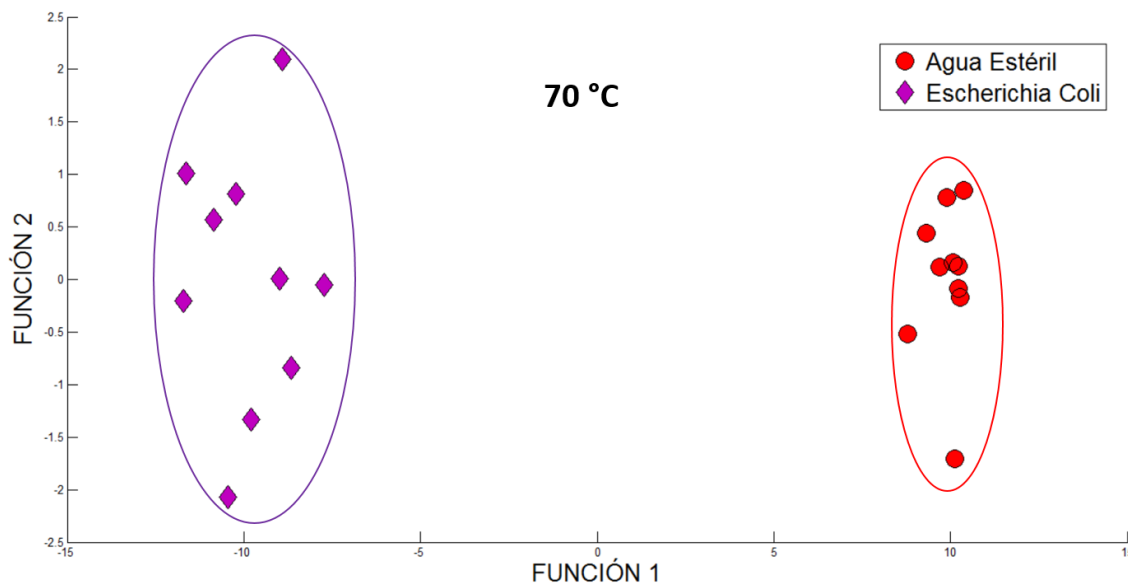


Figura 30. Resultados con análisis de funcionamiento de discriminantes (DFA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 70°C.



En los resultados obtenidos en la Figura 31, con el método PCA se puede observar claramente la diferencia entre los dos grupos de medidas con un porcentaje de varianza del 98.7%. Usando el método de DFA se discriminan claramente los clusters de E-Coli y agua estéril, con una varianza del 100%. Figura 32.

Figura 31. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y Escherichia Coli a 50°C.

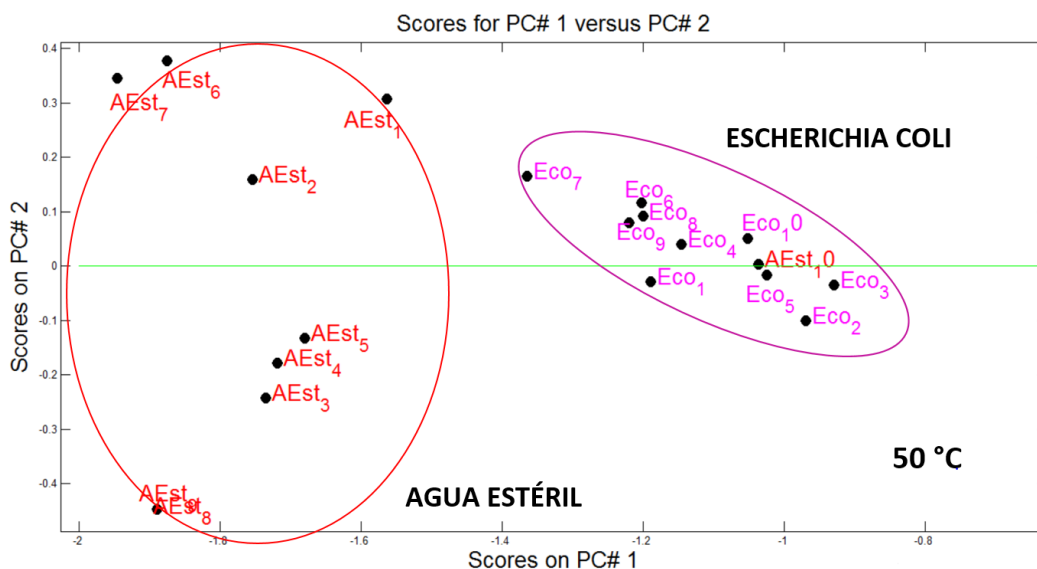
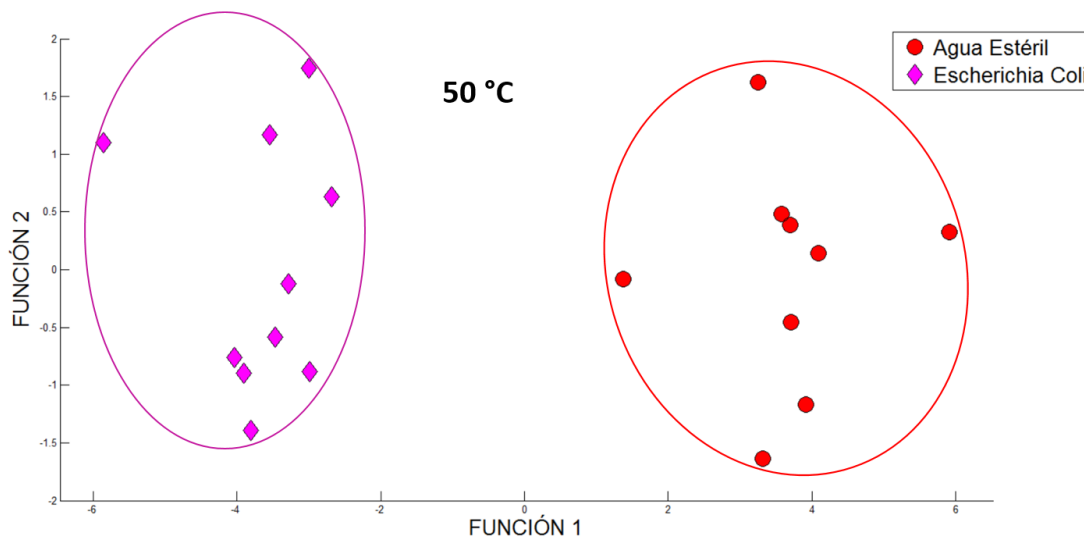


Figura 32. Resultados con análisis de funcionamiento de discriminantes (DFA) de Agua estéril y *Escherichia Coli* a 50°C

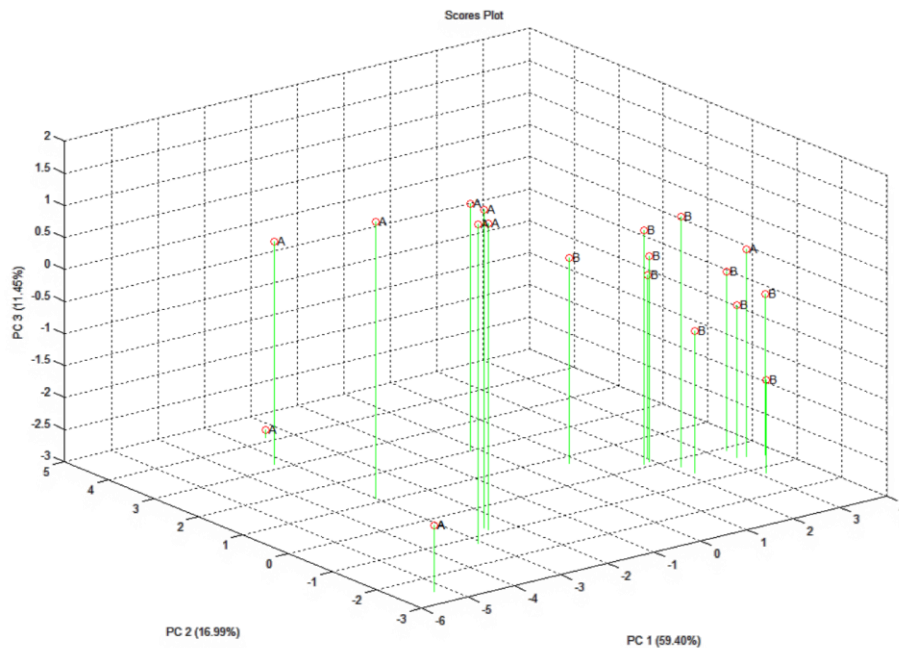


Cuando se realiza un análisis PCA normalmente se seleccionan los dos primeros PC's ya que la más importante variación (varianza) del conjunto de datos se encuentra localizada en los primeros componentes principales. En la respuesta de una nariz electrónica se desea que con tan solo 2 PC's a partir de las variables originales (sensores), los datos obtenidos tengan una alta discriminación entre clusters o categorías. Por tal motivo, al seleccionar una mayor cantidad o información de los PC's, no se garantiza necesariamente que los resultados vayan a ser mejores.

En la Figura 33 se observa que usando más 3 PC's el resultado en la discriminación de los datos sigue siendo el mismo.

Figura 33. Resultados con análisis de tres componentes principales (PCA) de Agua estéril y *Escherichia Coli* a 50°C.





En la Tabla 13, se muestra un resumen de los métodos de procesado y normalizado usados para el procesado de datos de las muestras a las diferentes temperaturas.

*Tabla 13. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril y Escherichia coli a diferentes temperaturas.*

<b>Temperatura : 90°C</b>				
<b>Método procesado</b>	<b>Método normalizado</b>			
	<b>Centrado (%)</b>	<b>Auto-Escalado (%)</b>	<b>Por columna (%)</b>	<b>Por matriz (%)</b>
<b>PCA</b>	86.5	84.6	97.5	97.1
<b>DFA</b>	100	100	100	100
<b>Red neuronal PNN</b>	80	100	100	100
<b>Red neuronal PNN con Leave one out</b>	0	85	75	90

<b>Temperatura : 70°C</b>				
<b>PCA</b>	90.5	77.07	97.3	98.3
<b>DFA</b>	100	100	100	100
<b>Red neuronal PNN</b>	90	100	100	95
<b>Red neuronal PNN con Leave one out</b>	0	95	75	90
<b>Temperatura : 50°C</b>				
<b>PCA</b>	80.8	76.3	97.5	98.7
<b>DFA</b>	100	100	100	100
<b>Red neuronal PNN</b>	90	100	100	100
<b>Red neuronal PNN con Leave one out</b>	0	80	80	90

Anteriormente se mencionó que se evaluó el porcentaje de clasificación mediante las técnicas de PCA y DFA, sin embargo, para obtener una mayor confiabilidad de los datos, se trabajó con una red neuronal probabilística generando un porcentaje de acierto del 100%, adicionalmente para evaluar el desempeño de la red neuronal, en términos de precisión, eficiencia y fiabilidad se utilizó el método interactivo de validación cruzada “leave one out” que consiste en generar los modelos computando todas las muestras menos la que se utiliza para validar. Se obtuvo un 90% de desempeño para las tres temperaturas.

El efecto de la temperatura de la muestra juega un papel importante en la repetibilidad de los resultados de medición y la discriminación de los analitos que se estudian. Según investigaciones (Roussel, 1999) explican que a temperaturas altas se puede mejorar el enriquecimiento de los VOC's aumentado su concentración para ser extraídos y analizados, mejorando la sensibilidad de los sensores y los resultados. En algunas ocasiones se presenta un gran inconveniente y es que dependiendo del origen la muestra a temperaturas mayores, esta puede descomponerse provocando resultados poco favorables. En este estudio, de acorde a los resultados obtenidos se evidenció que la mejor discriminación de los analitos mejoró a temperaturas bajas, en este caso la temperatura optima de clasificación escogida fue 50°C.

## **6.2. Segunda etapa (Pruebas del sistema con muestras de agua estéril, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Klebsiella oxytoca)**

En la segunda etapa se analizaron muestras de agua estéril, y tres especies bacterianas, con el objeto de evaluar la especificidad del método propuesto.

En la Figura 34 hasta la Figura 37, se observa que a los 10 segundos correspondientes a la línea base (aire ambiente) de la señales de los sensores, la muestra tanto de agua estéril como contaminada las cuales son inyectadas en ese preciso instante, hace que las respuestas de los sensores presenten una variación debido a la exposición del analito. Comparando las respuestas de la Figura 35 y Figura 36, se ilustra que existe una diferencia significativa debido a que la sensibilidad en la mayoría de los sensores es más alta (casi dos niveles de magnitud) en el momento de detectar la bacteria *E-coli*.

Figura 34. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de Agua estéril.

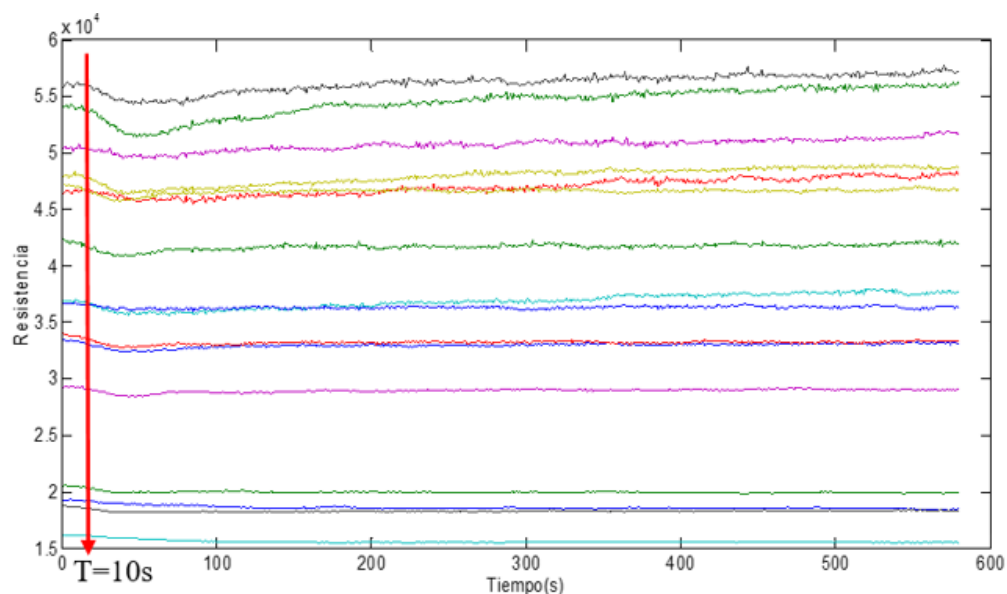


Figura 35. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de *Escherichia coli*

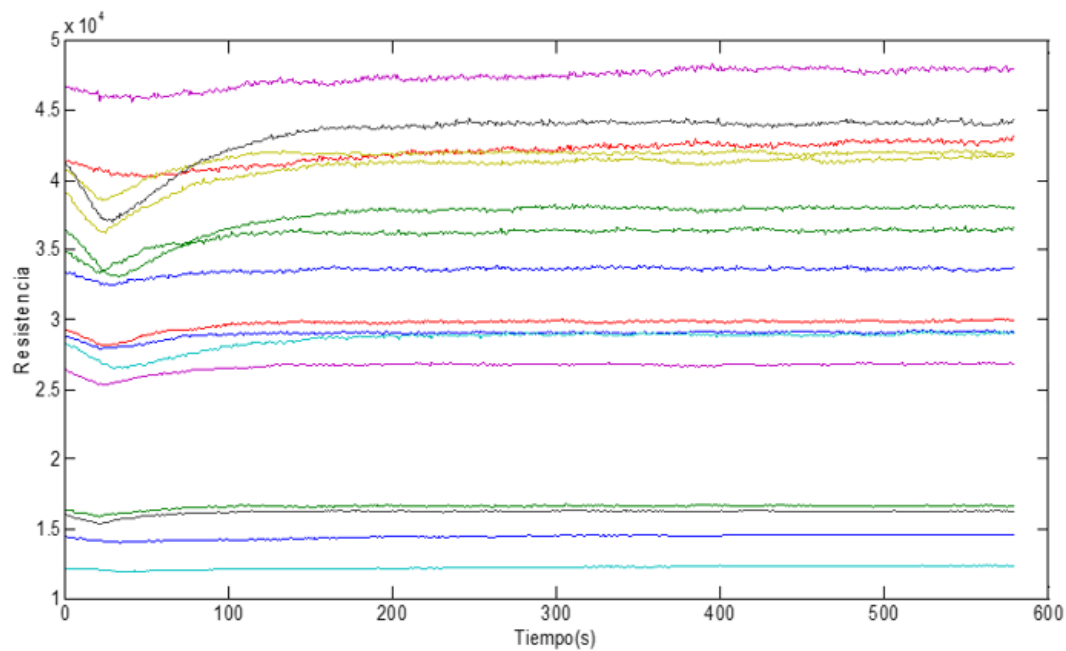


Figura 36. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de *Pseudomonas aeruginosa*.

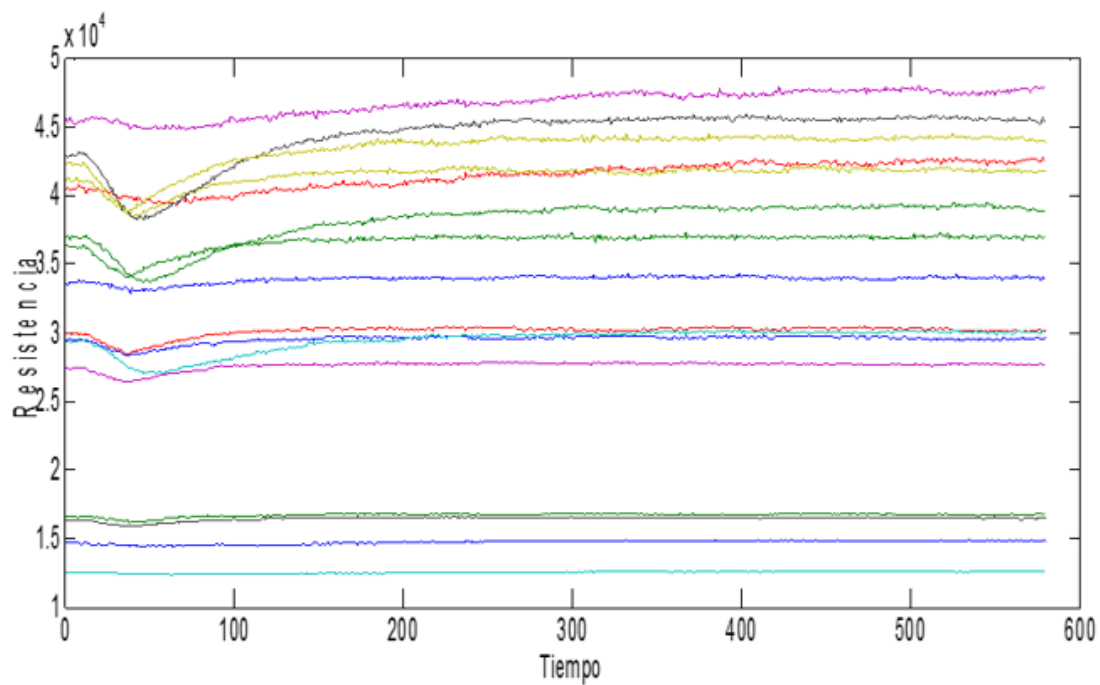
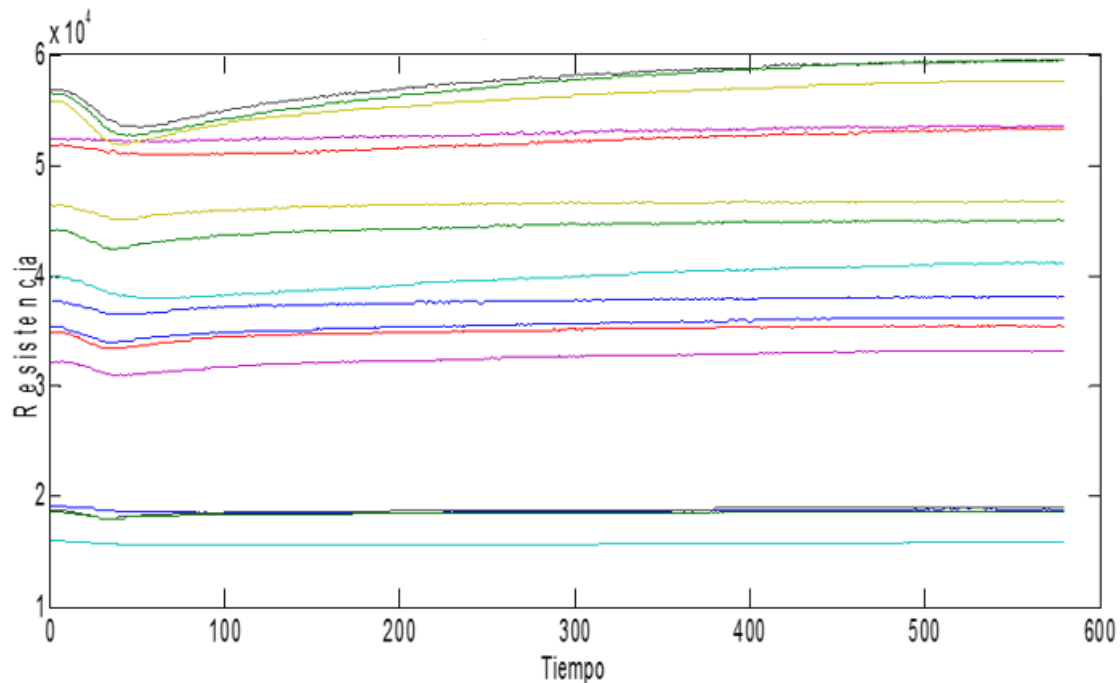


Figura 37. Respuestas eléctricas de los sensores para la muestra de *Klebsiella oxytoca*



Se consideró el caso donde todas las muestras de las tres especies bacterianas y agua estéril se combinaron en un solo conjunto de datos. En la Figura 38, se observa una buena discriminación de los clusters entre las diferentes categorías usando PCA (97.9% de varianza). La característica más llamativa es que se observa una separación entre las tres categorías y agua estéril cuando se usa DFA (Figura 39) obteniéndose una precisión de clasificación del 100%. El análisis PCA también revela, que las respuestas del olfato electrónico para las muestras de E-Coli, no parecen ser tan diferentes de las muestras de Pseudomonas y Klebsiella, algunos trabajos han identificado cierto grado de especificidad en términos de compuestos orgánicos volátiles característicos para cada tipo de bacteria que son comunes en las especies de interés debido a vías metabólicas compartidas, sin embargo, es difícil determinar la razón de este comportamiento, hacerlo implicaría realizar la caracterización de los VOC's resultantes de los productos metabólicos de las cepas de *E. coli*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* con técnicas analíticas (como GC / MS).

Para mejorar y obtener una buena reproducibilidad de los perfiles de los VOC's y para que este tipo de análisis estadístico sea más eficiente en cuanto a la identificación de bacterias, se deben tener en cuenta ciertos parámetros como el medio de cultivo escogido para que las bacterias crezcan (dependiendo el medio cambian los COV's), técnica de muestreo, volumen de la muestra, tiempo y temperatura de incubación.

Figura 38. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* a 50°C.

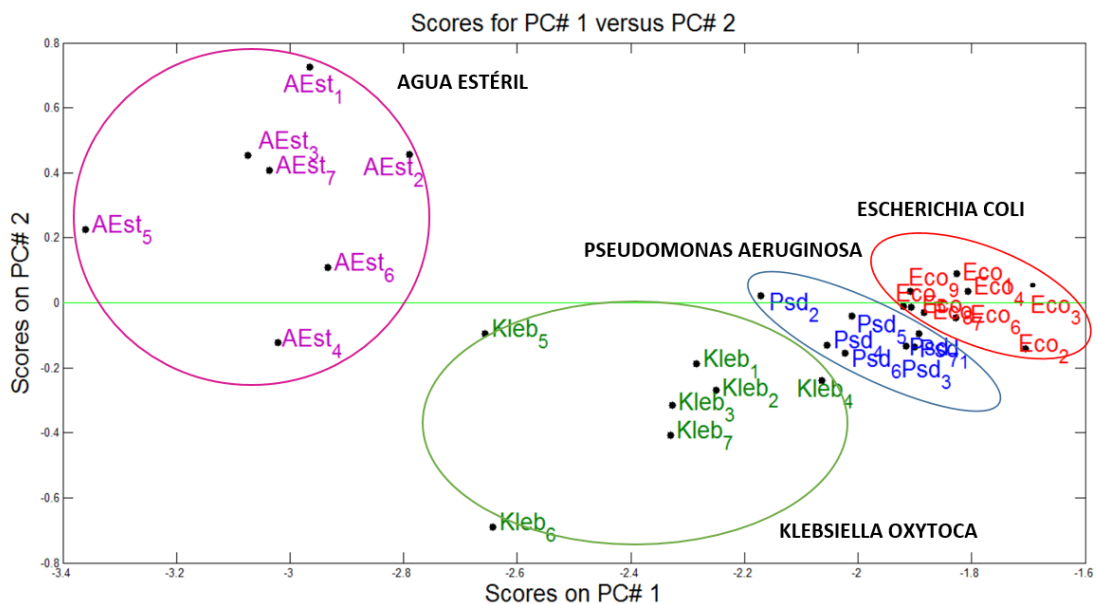
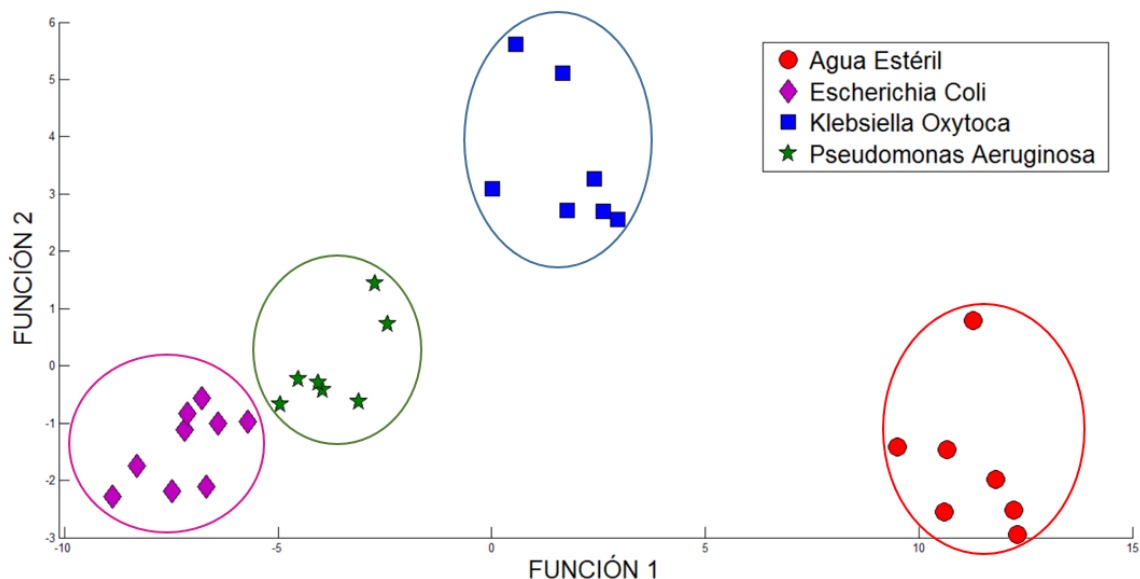


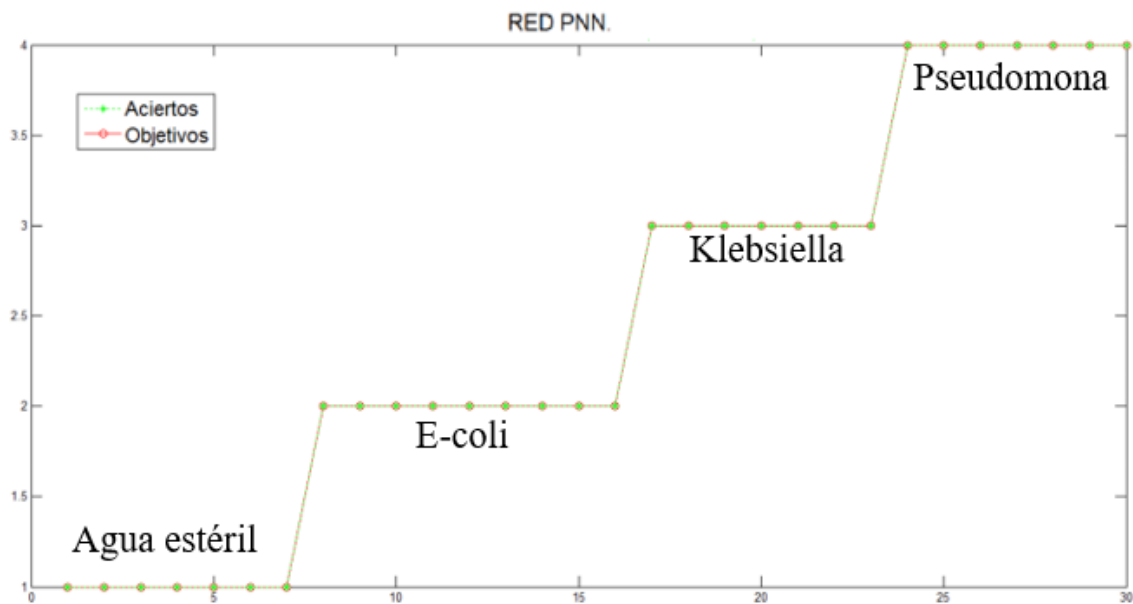
Figura 39. Resultados con análisis de componentes principales (DFA) de Agua estéril, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* a 50°C.



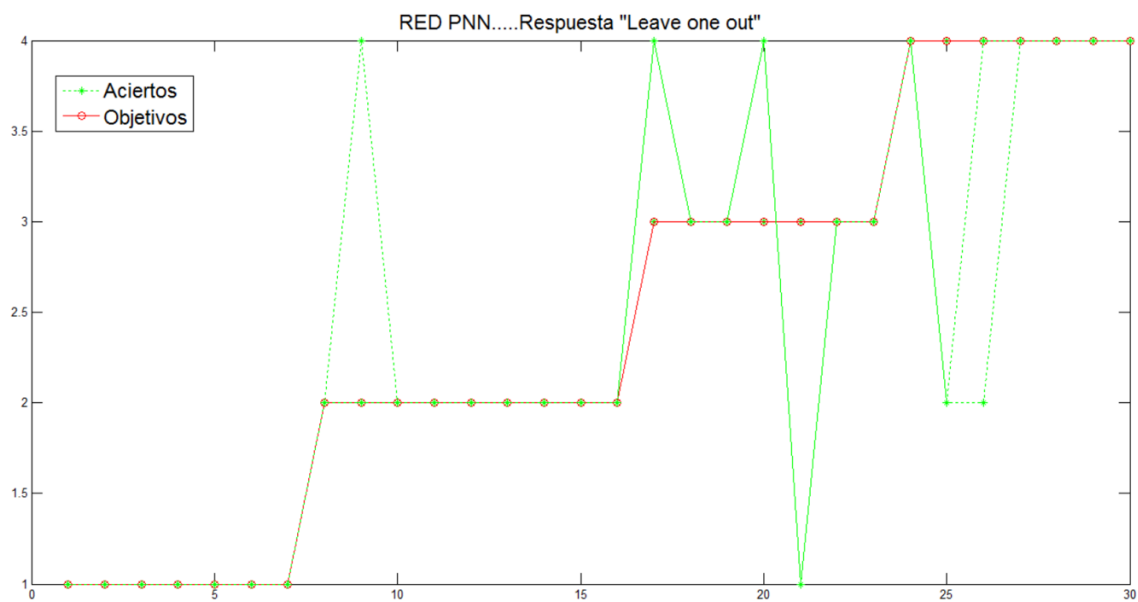
A través de la red PNN se obtuvo un porcentaje de clasificación de 100 % de acierto y también se puede apreciar la diferencia entre los dos tipos de categorías (Figura 40). Las líneas de color verde corresponden a la respuesta de la red y la línea sólida (color rojo) corresponde a los objetivos (targets). Empleando el entrenamiento leave-one-out se obtiene

un porcentaje de acierto en la clasificación del 86.6% tanto para la red PNN. (ver Figura 41)

*Figura 40. Resultados obtenidos usando una red neurona PNN para la clasificación de Agua estéril, E-coli, Klebsiella y Pseudomonas a 50°C.*



*Figura 41. Resultados obtenidos usando una red neurona PNN con Leave-one-out, para la clasificación de Agua estéril, E-coli, Pseudomonas y Klebsiella a 50°C.*



De acuerdo a la Figura 38 y Figura 39 se observa que el conjunto de medidas está conformado por un total de 30 muestras, de las cuales 7 corresponden a agua estéril, 7 a *Pseudomonas aeruginosa*, 7 a *Klebsiella oxytoca* y 9 a *Escherichia coli* (tamaño de la red 30 datos por 16 sensores), adicionalmente se configuro el sistema como se muestra en *Tabla 11*. Como primer método de pre-procesado de datos se aplicó normalización por centrado. Posterior a esta normalización se realizó un análisis por PCA y DFA con normalización por columna, el cual se obtuvieron los mejores resultados de clasificación como se muestra en la *Tabla 14*.

*Tabla 14. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Klebsiella oxytoca.*

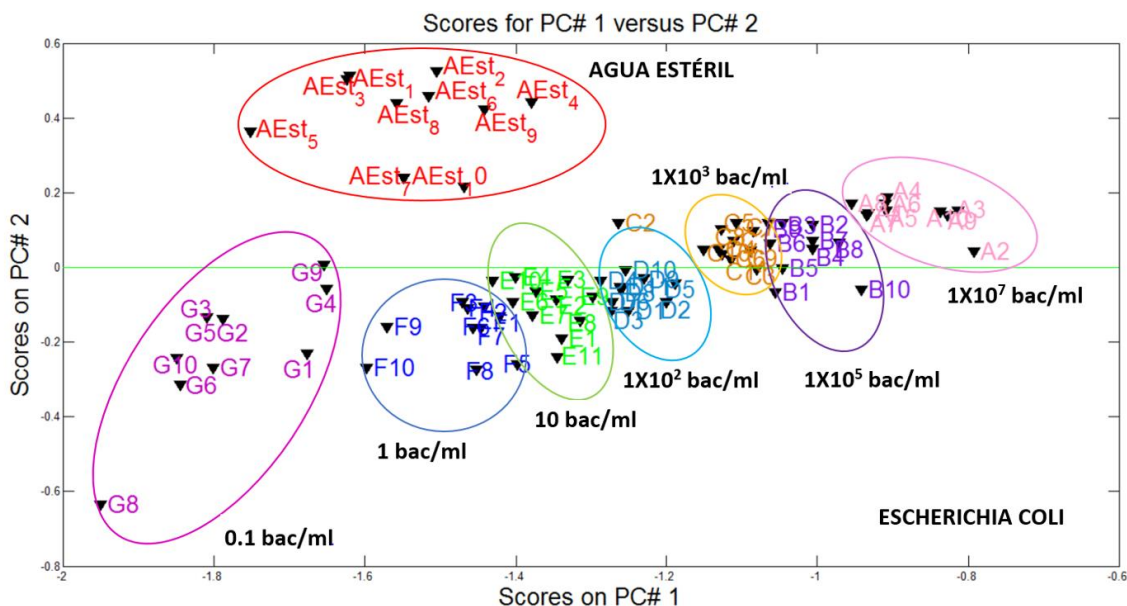
Método procesado	Método normalizado			
	Centrado (%)	Auto-Escalado (%)	Por columna (%)	Por matriz (%)
PCA	84.1	73.7	97.6	97.9
DFA	100	100	100	100
Red neuronal PNN	100	100	100	100
Red neuronal PNN con Leave one out	30	83.3	86.6	80

### 6.3. Tercera etapa (Pruebas del sistema para evaluar la sensibilidad del método, disminuyendo progresivamente la población bacteriana)

Para evaluar la sensibilidad del método se analizaron muestras de agua estéril y muestras inoculadas con *Escherichia coli* a diferentes concentraciones (ver metodología) con el objeto de comprobar la capacidad del sistema de discriminar entre muestras contaminadas y no contaminadas, adicionalmente evaluó la capacidad de discernir entre las diferentes concentraciones las muestras inoculadas.

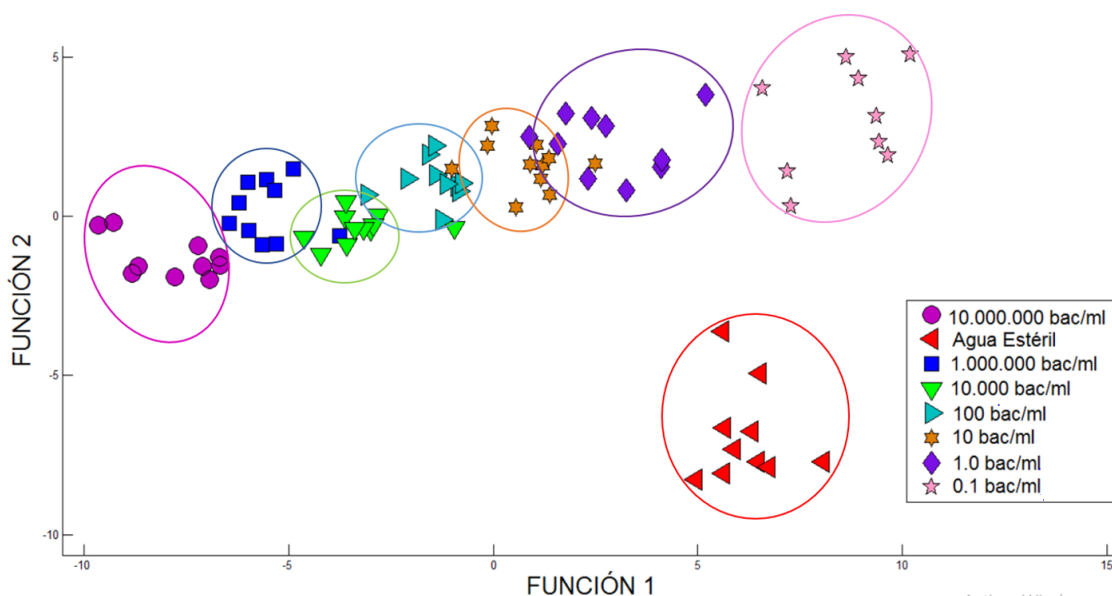
*Figura 42. Resultados con análisis de componentes principales (PCA) de Agua estéril y diferentes concentraciones de E-coli*





El análisis de componentes principales discrimina de manera eficaz entre los dos grupos de estudio (agua estéril-agua inoculada con *E-coli*). En la Figura 42, se observa claramente la separación de las dos clases, quedando en la parte superior las muestras libres de cualquier contaminante y en la parte inferior las muestras con *E-coli*. Si observamos detalladamente la parte inferior de la gráfica se puede percibir la clasificación de manera correcta de los siete grupos pertenecientes a las diferentes concentraciones. La varianza total capturada fue del 98.03%.

Figura 43. Resultados con análisis de componentes principales (DFA) de Agua estéril y diferentes concentraciones de *E-coli*



Evaluando los resultados obtenidos con el análisis DFA (Figura 43), se evidencia cierto solapamiento en algunas muestras, específicamente a bajas concentraciones, pero se pueden identificar los clusters correspondientes a las clases de estudio. La varianza total capturada fue del 91.5%.

Con los resultados obtenidos, se evidencia el buen funcionamiento del sistema, ya que la importancia de uso radica en que sin necesidad de dar a conocer previamente la clase a la cual pertenece la muestra, ésta la agrupa en el clúster correspondiente.

*Tabla 15. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril y concentraciones de Escherichia coli.*

<b>Método procesado</b>	<b>Método normalizado</b>			
	<b>Centrado (%)</b>	<b>Auto-Escalado (%)</b>	<b>Por columna (%)</b>	<b>Por matriz (%)</b>
<b>PCA</b>	78.4	71.8	97.6	98.03
<b>DFA</b>	91.5	91.5	91.5	91.5
<b>Red neuronal</b>	37.3	100	100	100
<b>PNN</b>				
<b>Red neuronal PNN con Leave one out</b>	0	60.4	73.5	79.5

La Tabla 15, muestra que los mejores resultados de clasificación se obtuvieron por el método de normalizado por matriz, seguido del normalizado por columna. Respecto a la red neuronal PNN implementada el porcentaje de acierto fue de 100% y empleando entrenamiento leave one out se obtiene un porcentaje de acierto en la clasificación del 79.5%.

De acuerdo a los datos obtenidos el sistema fue capaz de diferenciar entre muestras de agua estéril y muestras con *E-coli* a diferentes concentraciones, comprobando el buen funcionamiento del sistema y la metodología planteada. A demás se demostró la buena repetibilidad y selectividad de los sensores.

#### **6.4. Validación del sistema**

Para la validación del sistema como se explicó en la metodología, se tomaron muestras de agua de la entrada de la planta, después del sedimentador, salida de la planta y agua de grifo. Las muestras recolectadas se analizaron en paralelo con el método de filtración por membrana hecho en el laboratorio de microbiología y las muestras analizadas por el sistema desarrollado.

Cabe resaltar que para las muestras de las dos plantas se realizó el procedimiento de las diluciones descrito en la Figura 24, con el fin de entrenar el sistema de olfato electrónico para cada tipo de agua proveniente de las PTAP, adicionalmente se evaluó de acuerdo al comportamiento de las gráficas la dependencia de ciertos factores que a la hora de obtener los resultados podían variar como por ejemplo, fuente hídrica de extracción, cantidad de unidades operaciones en la planta, tipo de agua, hora de toma de muestra.

#### 6.4.1. Comparación entre las muestras recolectadas en la planta, agua estéril y muestras contaminadas con *E-coli*.

En la Figura 44 se puede evidenciar la separación de las diferentes clases. En la parte izquierda del grafico se encuentran las muestras que están libres de contaminantes (agua estéril y agua de grifo), las muestras con presencia de E-coli se agruparon en la parte derecha del grafico indicando que hay presencia de esta. La Figura 45, presenta un comportamiento igual que el de la Figura 44, excepto que se incluyó un tipo de muestra de mas (agua de salida) la cual se agrupo en las muestras que no contenían contaminantes.

Figura 44. Comparación entre las muestras de la planta, agua estéril y *E-coli*.  
Planta Empopamplona

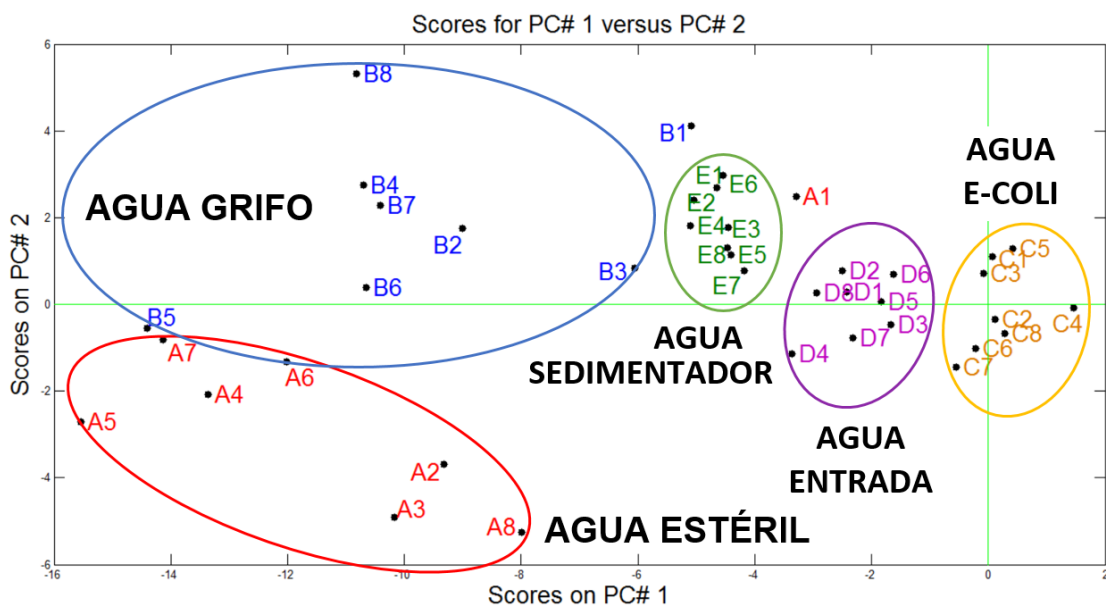
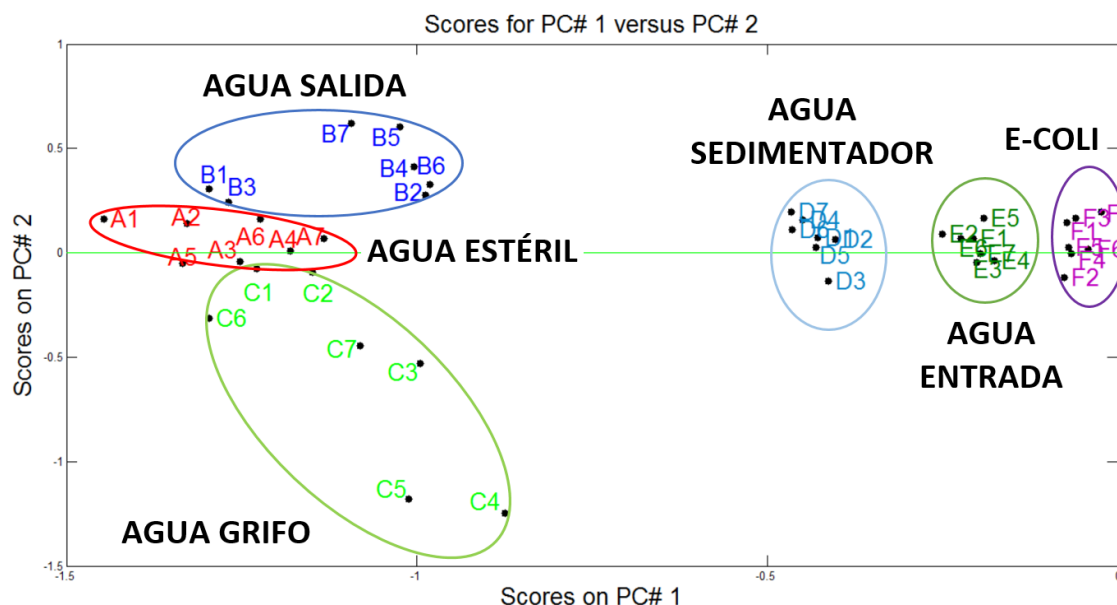


Figura 45. Comparación entre las muestras de la planta, agua estéril y *E-coli*.  
Planta de Toledo



#### 6.4.2. Comparación entre las muestras recolectadas en la planta, agua estéril y muestras contaminadas con *E-coli* a diferentes concentraciones.

Como se mencionó anteriormente, usando el método de diluciones se prepararon las concentraciones de las muestras de agua de las dos plantas. Este procedimiento se hizo con el fin de entrenar y tener una base de datos de cada tipo de PTAP. En esta parte se trabajó con concentraciones bajas desde 100 hasta 0.001 bacterias/ml, este último dato, es el valor permisible que la normatividad colombiana permite en el agua potable apta para el consumo humano.

En esta etapa la señal proveniente de los sensores se extrajo mediante el parámetro de incremento de la conductancia, aplicando diferentes tipos de normalizado, obteniéndose los mejores resultados con la normalización por matriz, como se indica en la Tabla 16 y Tabla 18.

##### 6.4.2.1. Planta de Empopamplona del municipio de Pamplona.

Tabla 16. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril, concentraciones de *Escherichia coli* y muestras de la planta de Empopamplona

Método procesado	Método normalizado			
	Centrado (%)	Auto-Escalado (%)	Por columna (%)	Por matriz (%)

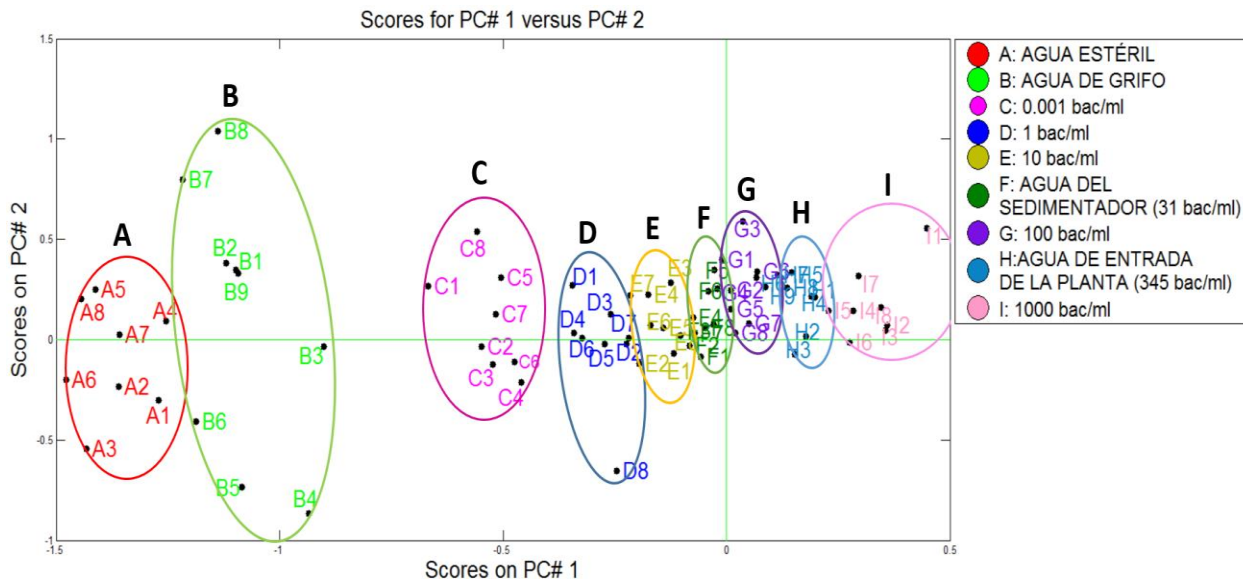
<b>PCA</b>	80.17	70.7	70.7	80.4
<b>DFA</b>	90.5	95.9	95.9	95.9
<b>Red neuronal</b>	24.3	100	100	100
<b>PNN</b>				
<b>Red neuronal PNN con Leave one out</b>	0	50	50	66.2

Para realizar las gráficas del PCA (Figura 46) y DFA (Figura 47) se usaron los datos de las muestras del entrenamiento procesadas previamente (A, C, D, E, G, I) y las muestras de agua provenientes de la planta de Empopamplona (B, F y G), esta comparación se realizó con el propósito de evaluar la capacidad que tiene el sistema de discriminar las muestras de la planta una vez ya haya una data de entrenamiento.

El análisis de componentes principales muestra como las medidas presentaron una buena agrupación con un porcentaje de clasificación del 80.4%, adicionalmente se evidencia la separación de las muestras contaminadas con la presencia de *E-coli* y las muestras libres de esta. En cuanto a las muestras de agua de grifo se agruparon en la parte izquierda del grafico cerca al agua estéril, lo que nos indica que no hay presencia *Escherichia coli*. Si seguimos analizando detalladamente la Figura 46, las muestras del sedimentador y el agua de entrada se agruparon dentro de las medidas de las concentraciones inoculadas por la bacteria.

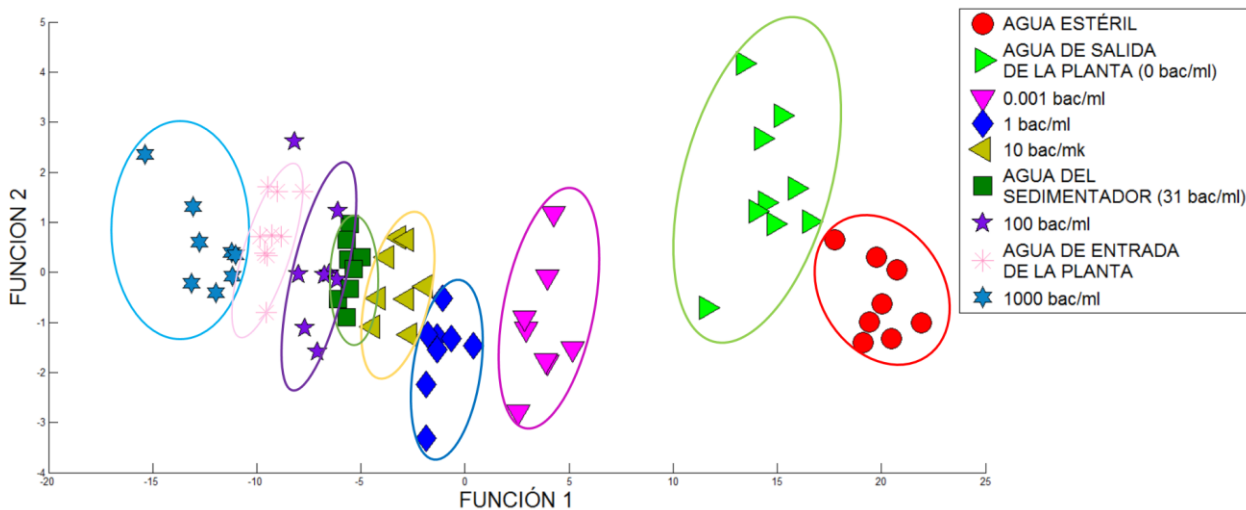
Las medidas del agua tomadas del sedimentador se agruparon en un rango de concentración de 10 a 100 bacterias/ml, mientras que el clúster que contiene las muestras del agua de entrada de la planta se agruparon en el rango de concentración de 100 a 1000 bacterias/ml.

*Figura 46. Resultado del análisis con PCA del conjunto de medidas de las muestras entrenamiento vs muestras extraídas de la planta Empopamplona.*



Usando el método de DFA se discriminan claramente los clusters pertenecientes a cada tipo de muestra, con una varianza del 95.9% (Figura 47). Así mismo se logra evidenciar que las muestras del agua del sedimentador tienden a solaparse dentro del clúster de la concentración de 100 bac/ml, lo que nos da una noción que valor de la concentración de *Escherichia coli* en el agua del sedimentador se acerca más a concentración de 100 bac/ml.

Figura 47. Resultado del análisis con DFA del conjunto de medidas de las muestras entrenamiento vs muestras extraídas de la planta Empopamplona.



Para evaluar este resultado se comparó con los resultados obtenidos en el laboratorio de microbiología.

La detección, identificación y cuantificación de la contaminación bacteriana de las muestras tomadas en la planta se analizaron usando el método de filtración por membrana.

*Tabla 17. Análisis microbiológico usando el método de filtración por membrana. PTAP de Pamplona*

<b>Análisis</b>	<b>Agua de la entrada de la planta</b>	<b>Agua del sedimentador</b>	<b>Agua de salida de la planta</b>	<b>Agua tomada del grifo</b>	<b>Norma</b>
<b>Coliformes totales</b>	552 UFC/100 cm <sup>3</sup>	146 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>
<b>Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)</b>	345 UFC/100 cm <sup>3</sup>	31 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>
<b>Biota acompañante</b>	UFC/100 cm <sup>3</sup>	28 UFC/100 cm <sup>3</sup>	4 UFC/100 cm <sup>3</sup>	8 UFC/100 cm <sup>3</sup>	
<b><i>Pseudomonas</i></b>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>
<b>Aerobios mesófilos</b>	576 UFC/100 cm <sup>3</sup>	201 UFC/100 cm <sup>3</sup>	4 UFC/100 cm <sup>3</sup>	9 UFC/100 cm <sup>3</sup>	100 UFC/ml máx.

De acuerdo con los requisitos microbiológicos exigidos por el decreto 475 (calidad de agua para consume humano), se consideran como muestras contaminadas con *E. coli* aquellas que superan el valor del indicador tomado como límite de aceptabilidad (1 bacteria/100 ml de agua). La información presentada en la Tabla 17, el análisis microbiológico de las muestras del agua de entrada de la planta y el agua tomada del sedimentador resultaron contaminadas con *E. coli* a una concentración de 345 bac/ml y 31 bac/ml. En cuanto al agua de la salida de la planta y el agua de grifo no presentaron presencia de la bacteria, indicando la eficiencia del proceso de tratamiento.

En la información presentada en la Tabla 17 y la Figura 46, los resultados microbiológicos usando los dos métodos, presentan coherencia y similitud, este comportamiento permite evaluar la eficiencia, la selectividad, sensibilidad del método propuesto.

#### **6.4.2.2.Planta del municipio de Toledo.**

*Tabla 18. Resumen de los métodos de procesado y normalizado usados en las muestras de agua estéril, concentraciones de Escherichia coli y muestras de la planta de Toledo*

Método procesado	Método normalizado			
	Centrado (%)	Auto-Escalado (%)	Por columna (%)	Por matriz (%)
PCA	77.9	67.8	85.9	90.2
DFA	80.5	80.5	80.5	80.5
Red neuronal	71.4	100	100	100
PNN				
Red neuronal PNN con Leave one out	0	40	25.7	61.4

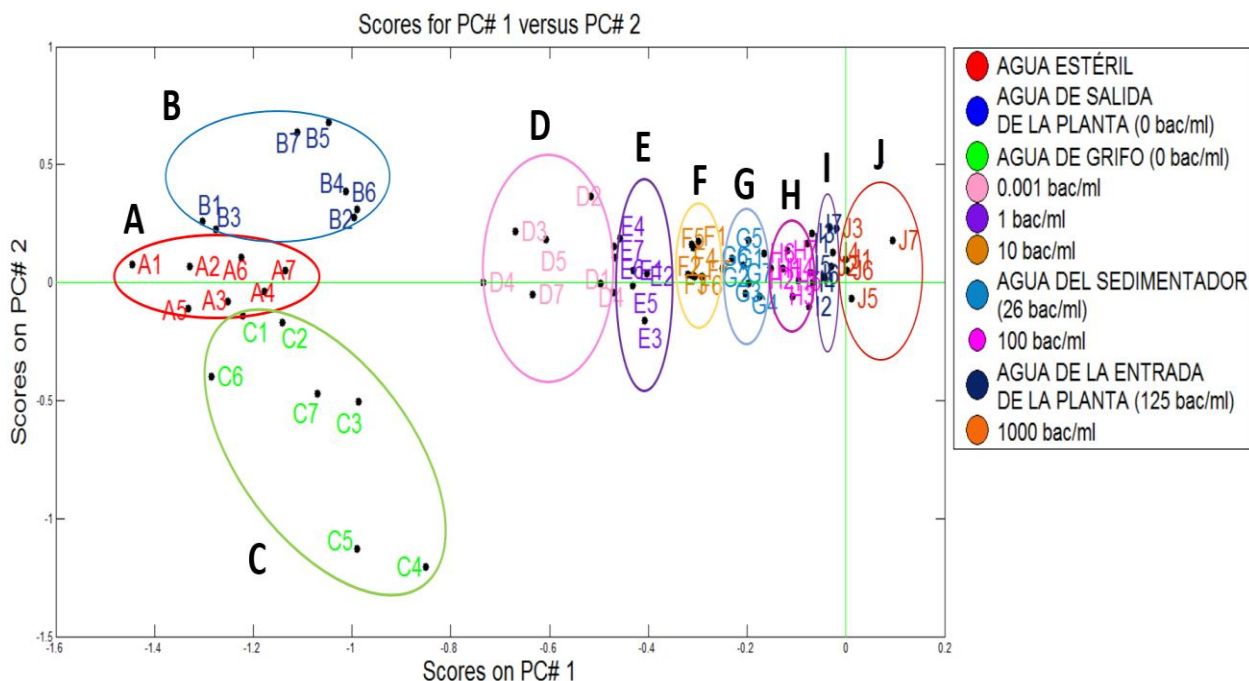
Para realizar las gráficas del PCA () se usaron los datos de las muestras del entrenamiento procesadas previamente (A, D, E, F, H, J) y las muestras de agua provenientes de la planta de Toledo (B, C, G, I), esta comparación se hizo para verificar la discriminación de las muestras de la planta respecto a la data de entrenamiento.

En la Figura 48, se observa una buena discriminación de los clusters 90.2%, adicionalmente se evidencia la separación de las muestras contaminadas con la presencia de E-coli y las muestras libres de esta. La planta del municipio de Toledo presenta un comportamiento igual que la planta de Pamplona, ya que las muestras de agua de grifo y en este caso se incluyó una muestra de salida de la planta se agruparon en la parte izquierda del grafico cerca al agua estéril, lo que nos indica que no hay presencia Escherichia coli. En la parte derecha de la gráfica las muestras del sedimentador y el agua de entrada se agruparon dentro de las medidas de las concentraciones inoculadas por la bacteria.

Las medidas del agua tomadas del sedimentador se agruparon en un rango de concentración de 10 a 100 bacterias/ml, mientras que el clúster que contiene las muestras del agua de entrada de la planta se agruparon en el rango de concentración de 100 a 1000 bacterias/ml.

*Figura 48. Resultado del análisis con PCA del conjunto de medidas de las muestras entrenamiento vs muestras extraídas de la planta de Toledo*





La Tabla 19, muestra los resultados obtenidos de las muestras recolectadas en planta de Toledo, el análisis se realizó en los laboratorios de microbiología pertenecientes a la Universidad de Pamplona

*Tabla 19. Análisis microbiológico usando el método de filtración por membrana. PTAP de Toledo.*

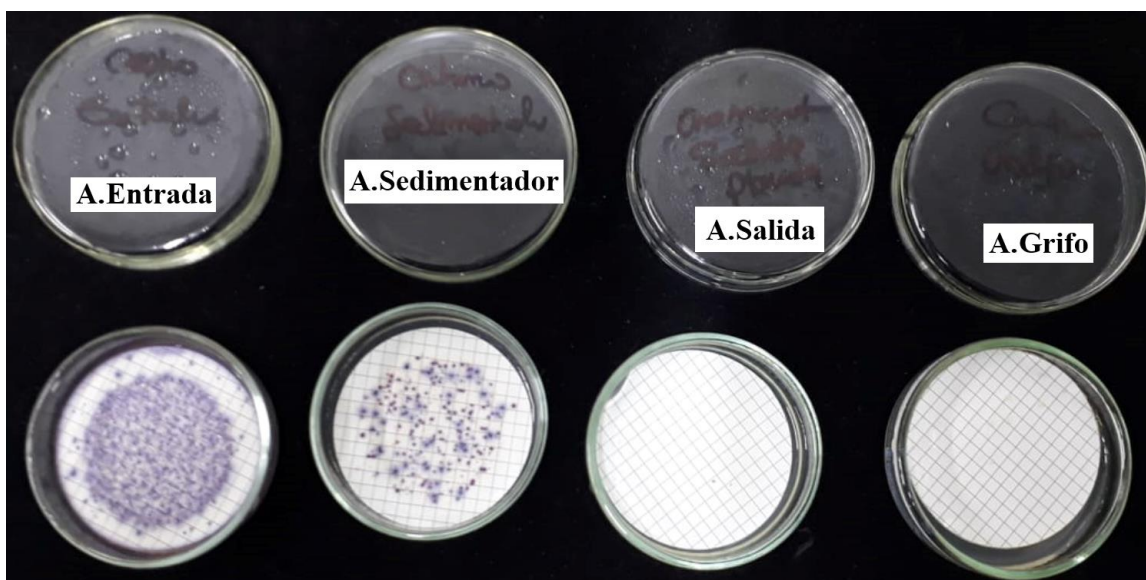
Análisis	Agua de la entrada de la planta	Agua del sedimentador	Agua de salida de la planta	Agua tomada del grifo	Norma
<b>Coliformes totales</b>	324 UFC/100 cm <sup>3</sup>	88 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>
<b>Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)</b>	125 UFC/100 cm <sup>3</sup>	26 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>
<b>Biota acompañante</b>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	12 UFC/100 cm <sup>3</sup>	2 UFC/100 cm <sup>3</sup>	4 UFC/100 cm <sup>3</sup>	
<b><i>Pseudomonas</i></b>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>
<b>Aerobios mesófilos</b>	332 UFC/100 cm <sup>3</sup>	105 UFC/100 cm <sup>3</sup>	2 UFC/100 cm <sup>3</sup>	6 UFC/100 cm <sup>3</sup>	100 UFC/ml máx.

La Tabla 19 y la Figura 48, presenta los resultados de la concentración de *Escherichia coli* presente en el agua proveniente de la PTAP de Toledo. Los dos métodos implementados muestran similitud en cuanto a la capacidad de detección, identificación y una aproximación en rangos de concentración. Por ejemplo, las muestras de agua de salida y agua de grifo en el método propuesto se agrupan en la categoría de muestras libres (parte izquierda del gráfico) de contaminantes bacterianos (*E. coli*), quedando ubicadas junto a las muestras de agua estéril, el método por filtración de membrana arroja una concentración de 0 bacterias/ml para estos tipos de muestras.

En cuanto a la categoría de las muestras de agua contaminada, el método convencional efectuado detectó que la muestra proveniente de la entrada de la planta contenía 125UFC/100cm<sup>3</sup> y el agua de grifo 26 UFC/100cm<sup>3</sup>. En nuestra investigación el método propuesto logró ubicar las dos clases en los rangos de concentración correspondiente a los valores obtenidos en el método de validación. Las medidas del agua tomadas del sedimentador se agruparon en un rango de concentración de 10 a 100 bacterias/ml, mientras que el clúster que contiene las muestras del agua de entrada de la planta se agruparon en el rango de concentración de 100 a 1000 bacterias/ml.

De acuerdo a lo observado en las dos plantas se puede apreciar que el método propuesto tiene un grado de repetibilidad y reproducibilidad en las medidas, ya que se aplicó el mismo procedimiento para las dos plantas, las mismas condiciones de operación y los resultados obtenidos siguen el mismo comportamiento. En la Figura 49, se observa las imágenes de los resultados de agua de la PTAP de Toledo, obtenidos en el laboratorio

Figura 49. Recuento de *E. coli* en las muestras de la PTAP de Toledo



## **CONCLUSIONES**

En este trabajo se diseñó e implementó un muestreador de espacio de cabeza estático (MECS) con el objetivo de aumentar la concentración de la muestra y aprovechar la mayor cantidad de VOC's que producen las especies bacterianas durante su crecimiento (incubación). El MECS fue acoplado a un sistema de olfato electrónico que consiste en 16 sensores de gases químicos. Debido a que la composición química de cada sensor en el conjunto es diferente, cada uno responde de una manera única dentro del conjunto, las respuestas generadas se digitalizan y, a partir de ellas, se extraen las características relevantes. Con el desarrollo del método propuesto fue posible determinar de forma rápida, bajo costo y portabilidad la contaminación bacteriana en muestras de agua, para evaluar su calidad para el consumo humano.

Pese a que algunos sensores de gases no presentaron una buena sensibilidad en el momento de la detección de las muestras de agua contaminada por *E-coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y agua estéril, se pudo observar en los resultados la discriminación de las medidas usando PCA, que hubo diferencias notables entre categorías y que la contribución de las variables originales ante la presencia de los compuestos volátiles fue destacada. Cabe resaltar que para mejorar la sensibilidad se podría escoger los sensores que mejor respondieron y diseñar una cámara de sensores con un volumen muerto pequeño.

De acuerdo a las mediciones realizadas entre las muestras de agua estéril y E-Coli a diferentes temperaturas se demostró el buen desempeño y la repetibilidad de las medidas del más del 90% de precisión en la clasificación y discriminación de las especies usando PCA y DFA. De acuerdo a los resultados obtenidos y estudios de la literatura, se tomó como temperatura óptima de incubación 50°C durante un tiempo de 15 minutos, sin embargo, para corroborar la elección de la temperatura y obtener una mayor confiabilidad de los datos, se trabajó con una red neuronal probabilística generando un porcentaje de acierto del 100%, adicionalmente para evaluar el desempeño de la red neuronal, en términos de precisión, eficiencia y fiabilidad se utilizó el método interactivo de validación cruzada leave one out con un desempeño del 90%.

El objetivo a corto plazo podría ser que el método propuesto coincida con la sensibilidad y la especificidad de los métodos convencionales usados para la identificación y clasificación de bacterias. Cabe resaltar que en este estudio se alcanzó a evaluar la especificidad del método evaluando la capacidad del olfato electrónico acoplado a al equipo de extracción para diferenciar un analito de interés, en este caso *E. coli*, que es una bacteria indicadora de contaminación fecal en aguas (control positivo), de otros analitos que son similares y pueden tender a la confusión. Por esta razón para ello se escogieron como controles de especificidad a *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria Gram (-) de importancia en aguas y *Klebsiella oxytoca* otra bacteria Gram (-), perteneciente a la misma familia de *E. coli*. Los resultados obtenidos muestran una buena discriminación usando PCA (97.9% de varianza)

y una precisión en la clasificación del 100% con DFA. A través de la red PNN se obtuvo un porcentaje de clasificación del 100% y usando el método de validación cruzada el porcentaje de acierto fue del 86.6%, lo que nos indica que el método propuesto es una herramienta capaz de discriminar entre si los diferentes tipos de bacterias y adicionalmente del agua estéril.

El sistema y la metodología propuesta permitió discriminar las muestras contaminadas con *Escherichia Coli* a diferentes concentraciones, llegando a un rango de detección de 0.01bac/ml, adicionalmente logró identificar el rango de concentración de bacterias presentes en el agua proveniente de las plantas de tratamiento de aguas de los municipios de Toledo y Pamplona. Los resultados obtenidos sirven como guía para evaluar eficiencia de la planta a nivel de remoción de contaminantes y evaluar la calidad del agua, siendo una herramienta muy prometedora por su bajo costo, portabilidad, con sensibilidad alta y de fácil manipulación.

## **REFERENCIAS**

Organizacion mundial de la salud (2003). Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1: Recomendaciones. Tercera edición. Recuperado: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf)

Gardner J., Craven M., Dow C., & Hines E. (1998). The prediction of bacteria type and culture growth phase by an electronic nose with a multi-layer perceptron network, *Measurement Science and Technology*, 9(1), 120–127. doi: 10.1088/0957-0233/9/1/016.

McEntegart C., Penrose W., Strathmann S., & Stetter J. (2000). Detection and discrimination of coliform bacteria with gas sensor arrays, *Sensors and Actuators B: Chemical* 70 (1-3), 170–176. doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00561-X

Lakshmanan R., Guntupalli R., Hu J., Petrenko V., Barbaree J., & Chin B. (2007). Detection of Salmonella typhimurium in fat free milk using a phage immobilized magnetoelastic sensor, *Sens. Actuators B: Chem.* 126(2), 544–550. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.04.003>

Siripatrawan U. (2008) Self-organizing algorithm for classification of packaged fresh vegetable potentially contaminated with foodborne pathogens, *Sensors and Actuators B: Chemical* 128(2), 435–441. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.06.030>

Green G., Chan A., Dan H., & Lin M. (2011). Using a metal oxide sensor (MOS)-based electronic nose for discrimination of bacteria based on individual colonies in suspension, *Sensors and Actuators B: Chemical* 152 (1) 21–28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.09.062>

Krishnamurthy N., Supreetha B., Deccaraman M., & Vijayashree N. (2012). E-Nose System to Detect E-Coli in Drinking Water of Udupi District. *International Journal of Engineering Research and Development* 1(12) 58-64.

Núñez c., E. Sberveglieri V., & Pulvirenti A. (2013). Detection of Microorganisms in Water and different Food Matrix by Electronic Nose. *Seventh International Conference on Sensing Technology: Current Status and Future Trends III. Smart Sensors, Measurement and Instrumentation*, vol 11, 243-258. Springer, Cham.

Geoffrey C., Chan A., & Lin M. (2014). Robust identification of bacteria based on repeated odor measurements from individual bacteria colonies. *Sensors and Actuators B* 190, 16– 24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.001>

Durán, C. M. (2005). Diseño y optimización de los subsistemas de un sistema de olfato electrónico para aplicaciones agroalimentarias e industriales (tesis doctoral). Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España. Recuperado de <https://www.tdx.cat/handle/10803/8451>.

Herrero J., Lozano J., Santos J., & Suarez J. (2016). On-line classification of pollutants in water using wireless portable electronic noses. *Chemosphere* 152 107e116. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.106

Sauer S., & Kliem M. (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 8(1) 74–82. doi: 10.1038/nrmicro2243.

Gomez, O.G., (2015). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Revista Chilena infectol*, 31(5): 577–586. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469391/>

Rios S., Agudelo R., & Gutierrez L. (2017). Patógenos e Indicadores microbiológicos da qualidade da água pro consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 35(2), 236-247. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.

Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. (22 junio 2007). por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. [resolucion 2115]/ recuperado de [http://www.minambiente.gov.co/images/gestionintegraldelrecursohidrico/pdf/legislaci%3b3n\\_del\\_agua/resoluci%3b3n\\_2115.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/gestionintegraldelrecursohidrico/pdf/legislaci%3b3n_del_agua/resoluci%3b3n_2115.pdf).

Hurtado. Genny. (2016). Evaluación de los procesos de operación de la planta de tratamiento para potabilización de agua Villasantana ubicada en la ciudad de Pereira, Risaralda. (Trabajo de grado de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/52540/1/42154752.2016.pdf>.

Chulluncuy, N. (2011). Tratamiento de agua para consumo humano. *Revista de Ingeniería Industrial*, 29, 153-170. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/3374/337428495008.pdf>.

Ministerio de salud pública. (10 de marzo 1998). Normas técnicas de calidad del agua potable. [Decreto 475]. Recuperado de [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/DECRETO%200475%20DE%201998.PDF](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/DECRETO%200475%20DE%201998.PDF)

APHA-AWWA-WPCF. (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. American Public Health Association-American Water Works Association-Water Pollution Control Federation. Ediciones Díaz Santos, S.A. 17ª Ed. Madrid. España.

[Recuento de Coliformes Totales Filtración a través de membrana], (s.f.). Recuperado de [http://coli.usal.es/Web/demo\\_fundacua/demo2/FiltraMembColiT\\_auto.html](http://coli.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/FiltraMembColiT_auto.html).

Vergine P., Salerno C., Barca E., Berardi G., & Pollice A. (2017). Identification of the faecal indicator *Escherichia coli* in wastewater through the  $\beta$ -D-glucuronidase activity: comparison between two enumeration methods, membrane filtration with TBX agar, and Colilert®-18. *Journal of Water & Health*, 15(2), 209-217. doi: <https://doi.org/10.2166/wh.2016.119>.

Newton W., Morino Y., & Snell E. (1965). Properties of crystalline tryptophanase, *J. Biol. Chem.* 240, 1211-1218.

Lough F., Perry J., Stanforth S., & Dean J. (2017). Detection of exogenous VOCs as a novel in vitro diagnostic technique for the detection of pathogenic bacteria. *Trends in Analytical Chemistry*, 87, 71-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.004>

Schulz S., & Dickschat J. (2006). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural product reports*, 24(4), 814-42. doi: 10.1039/b507392h

Núñez M., Thompson O., Dowell F., & Jr V. (1983). Norleucine-tyrosine broth for rapid identification of *Clostridium difficile* by gas-liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(2), 382-385. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833488>.

Turton L., Drucker D., & Ganguli L. (1983). Effect of glucose concentration in the growth medium upon neutral and acidic fermentation end-products of *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sporogenes* and *Peptostreptococcus anaerobius*. *Journal of Medical Microbiology*, 16 (1), 61-67. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6822993>.

Robacker D., Lauzon C., Patt J., Margara F., & Sacchetti P. (2009). Attraction of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to bacteria: Effects of culturing medium on odour volátiles. *Journal of Applied Entomology*, 133, 155-163. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01364.x>.

Tait E., Perry J., Stanforth S., & Dean J. (2014). Identification of Volatile Organic Compounds Produced by Bacteria Using HS-SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 52, 363-373. doi:10.1093/chromsci/bmt042

Lemfac M., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., & Piechulla B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, 42. doi:10.1093/nar/gkt1250.

Nilsson T., Larsen T., Montanarella L., Madsena J. (1996). Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods*, 25 (3), 245-255. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00093-3](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00093-3).

Sawoszczuk T., Cholewińska J., & Meléndez J. (2015). Optimization of headspace solid phase microextraction for the analysis of microbial volatile organic compounds emitted by fungi: Application to historical objects. *Journal of Chromatography A*, 1409, 30-45. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.059>.

Bean H., Dimandja J., & Hill J. (2012). Bacterial volatile discovery using solid phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 901, 41-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.038>

Boots A., Smolinska A., Berkel J., Fijten R., Stobberingh E., Boumans M., Moonen1 E., Wouters E., Dallinga J., & Schooten F. (2014). Identification of microorganisms based on headspace analysis of volatile organic compounds by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Breath Research*, 8, 12 pp. doi:10.1088/1752-7155/8/2/027106.

[El Blog de Cromatografía con las novedades, técnicas y métodos más actuales para su proceso de separación]. (s.f.). Recuperado de <http://blog.cromlab.es/muestreo-por-espacio-de-cabeza-headspace-sampling-hs/>.

Peñalver A. (2016). Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. (Trabajo de grado de doctorado). Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/handle/10803/8988>.

Rios J. (2017). Nuevos desarrollos metodológicos en SPME. (Trabajo de grado de doctorado). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Madrid, España. Recuperado de: <https://eprints.ucm.es/42933/> .

Gardner J., Shin H., Hines E., & Dow C. (2000). An electronic nose system for monitoring the quality of potable water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 69(3), Issue 3, 336-341. doi: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00482-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00482-2).

Quicazán M., Díaz A., & Zuluaga C. (2011). la nariz electrónica, una novedosa herramienta para el control de procesos y calidad en la industria agroalimentaria. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 18(2), 209-217. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v18n2/v18n2a12.pdf>.



Correa E., Barreiro P., Ruiz A., & Chamorro C.(s.f). Nariz electronica ¿herramienta para la calidad en la industria agrolimentaria?. Recuperado de: <http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/01297.pdf>.

Lozano J., García A., García C., Aleixandre M., Santos J., & Horrillo M. (2014). Reconocimiento de patrones basado en redes neuronales y análisis de componentes independientes para narices electrónicas. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/228805712/download>.

Schulz S., & Dickschat J. Bacterial volatiles: The smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4), 814–842. doi: 10.1039/b507392h.

Aleixandre m., Lozano J., Santos J., Suarez J., & Herrero J. Detection of Pollutants in Water Using a Wireless Network of Electronic Noses. *Chemical engineering transactions*, 54, 157-162. doi: <http://doi.org/10.3303/CET1654027>.

Siripatrawan U., Linz J., & Harte B. (2004). Rapid Method for Prediction of Escherichia coli Numbers Using an Electronic Sensor Array and an Artificial Neural Network. *Journal of Food Protection*, 67(8), 1604–1609. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15330522>.

Gibson T., Prosser O., Hulbert, J., Marshall R., Corcoran P., Lowery P., & Heron, S. (1997). Detection and simultaneous identification of microorganisms from headspace samples using an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 44(1-3), 413–422. doi:10.1016/s0925-4005(97)00235-9.

McEntegart C., Penrose W., Strathmann S., & Stetter J. (2000). Detection and discrimination of coliform bacteria with gas sensor arrays. *Sensors and Actuators B*, 70, 170–176. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00561-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00561-X).

Canhoto O., & Magan N. (2003). Potential for detection of microorganisms and heavy metals in potable water using electronic nose technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5-6), 751–754. doi:10.1016/s0956-5663(03)00019-8

Canhoto O., & Magan N. (2005). Electronic nose technology for the detection of microbial and chemical contamination of potable water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 106(1), 3–6. doi:10.1016/j.snb.2004.05.029.

Bastos C., & Magan N. (2006). Potential of an electronic nose for the early detection and differentiation between *Streptomyces* in potable water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116(1-2), 151–155. doi:10.1016/j.snb.2005.11.073.

Nayak K., Supreetha B., Deccaraman M., & Nayak4V. (2012). E-Nose System to Detect E-Coli in Drinking Water of Udupi District. *International Journal of Engineering Research and Development* 1(12), 58-64. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/E-Nose-System-to-Detect-EColi-in-Drinking-Water-of-Nayak>.

Gong J., Chen Q.; Lian M.; Liu N.; Stevenson, R.; Adamic, F. Micromachined Nanocrystalline Silver Doped SnO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>S Sensor. *Sens. Actuat. B* 2006, 114, 32-39.  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.04.035>

Duran, C. Gualdrón, O. (2014) “Nariz electrónica para determinar el índice de madurez del tomate de árbol (Cyphomandra Betacea Sendt ) Electronic Nose to Determine the Maturity Index of the Tree Tomato,” *Revista Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 15(3).

Harper W. (2001). The strengths and weaknesses of the electronic nose. *Advances in experimental medicine and biology*, 488, 59-71. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11548160>.

Wilson A., & Baietto M. (2009). Applications and Advances in Electronic-Nose Technologies. *Sensors*, 9, 5099-5148. oi:10.3390/s90705099.

Gualdrón O. (2006). Desarrollo de diferentes métodos de selección de variables para sistemas Multisensoriales. (Tesis doctoral). Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España. Recuperado de [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8473/Tesis\\_Oscar\\_Gualdrón.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8473/Tesis_Oscar_Gualdrón.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Rubio J., Stein J., Hernández J., Ávila F., Meléndez A. (2015). Sistema sensor para el monitoreo ambiental basado en redes Neuronales. *Revista de Ingeniería Investigación y Tecnología*, 17(2), 211-222. doi: <https://doi.org/10.1016/j.riit.2016.06.006>.

Ludermir T., & Yamazaki A. Neural networks for odor recognition in artificial noses. *Proceedings of the International Joint Conference on Neural Networks*, 1. doi:10.1109/IJCNN.2003.1223317

Matich D. (2001). *Redes Neuronales: Conceptos Básicos y Aplicaciones*. Universidad Tecnológica Nacional. Recuperado de [https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/orientadora1/monograis/matich-redesneuronales.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/orientadora1/monograis/matich-redesneuronales.pdf).

Campo F., Rodríguez A., Valiente R., Morales O., Durán A. & García A. (s.f.). Aplicación de técnicas de pre-procesamiento para una nariz electrónica de laboratorio basada en sensores MOS. Conference: XVI Convención de Ingeniería Eléctrica (CIE2015), At Villa Clara, Cuba, 97 - 903. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/316014507\\_Aplicacion\\_de\\_tecnicas\\_de\\_pre-procesamiento\\_para\\_una\\_nariz\\_electronica\\_de\\_laboratorio\\_basada\\_en\\_sensores\\_MOS\\_](https://www.researchgate.net/publication/316014507_Aplicacion_de_tecnicas_de_pre-procesamiento_para_una_nariz_electronica_de_laboratorio_basada_en_sensores_MOS_)

Application\_of\_preprocessing\_techniques\_for\_a\_laboratory\_Electronic\_Nose\_based\_on\_MOS\_senso.

Sánchez L., Osorio G. (2008). Introducción a kernel ACP y otros métodos espectrales aplicados al aprendizaje no supervisado. *Revista Colombiana de Estadística*, 31(1), 19–40. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/5007111\\_Introduccion\\_a\\_kernel\\_ACP\\_y\\_otros\\_metodos\\_espectrales\\_aplicados\\_al\\_aprendizaje\\_no\\_supervisado](https://www.researchgate.net/publication/5007111_Introduccion_a_kernel_ACP_y_otros_metodos_espectrales_aplicados_al_aprendizaje_no_supervisado).

S.f. Herramientas de extracción de información: Redes Neuronales. Capítulo 2, 37-111. Recuperado de [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1455/3.CAPITULO\\_2.pdf?sequence=5&isAllowed=y](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1455/3.CAPITULO_2.pdf?sequence=5&isAllowed=y).

Arshak K., Moore E., Lyons G., Harris J., & Clifford S. (2004). A review of gas sensors employed in electronic nose applications, *Sensors Rev.* 24 (2), 181–198.

Adhikari B., Majumdar S. Polymers in sensor applications, *Progress in Polymer Science*, 29 (7), 699–766. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.03.002>.

Pearce T. (1997). Computational parallels between the biological olfactory pathway and its analogue 'The Electronic Nose': part II. Sensor-based machine olfaction, *Biosystems*, 41(2), 69–90. doi: 10.1016/S0303-2647(96)01660-7.

Roussel S., Forsberg G., Grenier P., & Bellon-Maurel V.(1999). Optimisation of electronic nose measurements. Part II: influence of experimental parameters, *Journal of Food Engineering*, 39(1), 9–15. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00137-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00137-X)

Esbensen K., Wagner C.(2014). Theory of sampling (TOS) versus measurement uncertainty (MU) – A call for integration, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 57, 93-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.007>.

Boeker P. (2014). On 'Electronic Nose' methodology. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204(1), 2-17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.07.087>.

Vida L. (2009). Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra. (Tesis doctoral). Universidad de Alicante, Alicante. Recuperado de [https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/11458/1/Tesis\\_Vidal.pdf](https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/11458/1/Tesis_Vidal.pdf).

Hodgins D. (1997). The electronic nose: Sensor array-based instruments that emulate the human nose, in: R. Marsili (Editor), *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marcel Dekker Inc, pp. 331–371.

Mielle P. (1996). Electronic noses: towards the objective instrumental characterization

of food aroma. *Trends Food Sci. Technol*, 7, 432–438. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(96\)10045-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(96)10045-5).

Burlachenko J., Kruglenko I., Snopok B., & Persaud K. (2016). Sample handling for electronic nose technology: State of the art and future trends. *Trends in Analytical Chemistry*, 82, 222–236. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.007>.

Mielle P., & Marquis F. (1999). An alternative way to improve the sensitivity of electronic Olfactometers. *Sensors Actuat. B Chem.* 58 (1-3), 526–535. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00158-6).

Robbins G., Wang S., & Stuart J. (1993). Using the static headspace method to determine Henry's law constants. *Analytical Chemistry*, 65 (21), 3113–3118. Doi: [10.1021/ac00069a026](https://doi.org/10.1021/ac00069a026).

Ouoba S., Cherblanc F., Koulidiati, J., & Bénet C. (2015). A new experimental method to determine the Henry's law constant of a volatile organic compound adsorbed in soil, *J. Chem.* 2015 <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/479327>> Article ID 479327.

Vázquez A. (s.f.). Caracterización y evaluación de compuestos orgánicos volátiles presentes en especies vegetales de las familias apiaceae, asteraceae, lamiaceae y verbenaceae por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y su relación con la aceptabilidad sensorial de aquellas de uso alimenticio. (Tesis doctoral). Recuperado de <http://pa.bibdigital.uccor.edu.ar/1460/1/Vazquez.FR11.pdf>.