



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA
MECÁNICA Y ELÉCTRICA**

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

“Análisis multivariable de espectros de fluorescencia
con fines de diagnóstico”

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA

PRESENTA:

Ing. Mújica Ascencio César

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. José Manuel De la Rosa Vázquez
Dr. Edgard Moreno García



MEXICO, D.F. DICIEMBRE 2009.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de E.S.I.M.E. ZAC. para examinar la tesis de grado titulada:

**“ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE ESPECTROS DE FLUORESCENCIA CON FINES
DE DIAGNÓSTICO”**

Presentada por el alumno:

MÚJICA

Apellido paterno

ASCENCIO

materno

CÉSAR

nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	2	5	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

José De La Rosa

DR. JOSE MANUEL DE LA ROSA VÁZQUEZ

Director de tesis

Edgard Moreno García

DR. EDGARD MORENO GARCÍA

Presidente

Alexandre Michtchenko

DR. ALEXANDRE MICHTCHENKO

Segundo Vocal

Edgard Moreno García

DR. EDGARD MORENO GARCÍA

Tercer Vocal

Karla Alejandra Espinoza Dueñas

DRA. KARLA ALEJANDRA ESPINOZA DUEÑAS

Secretario

Francisco Javier Gallegos Funes

DR. FRANCISCO JAVIER GALLEGOS FUNES

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Jaime Robles García
DR. JAIME ROBLES GARCÍA





CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, Distrito Federal el día 01 del mes de Diciembre del año 2009, el que suscribe César Mújica Ascencio alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Electrónica con número de registro A080251, adscrito a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESIME Unidad Zacatenco, manifiesta que los autores intelectuales del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. José Manuel De la Rosa Vázquez y del Dr. Edgard Moreno García ceden los derechos del trabajo intitulado Análisis multivariable de espectros de fluorescencia con fines de diagnóstico, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección jos_delarosa@yahoo.com.mx, mujicaac@mexico.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MÚJICA ASCENCIO CESAR
César Mújica Ascencio

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Para poder realizar esta tesis de la mejor manera posible fue necesario del apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer de todo corazón.

A Dios, por haberme estado día con día durante mi estancia en esta escuela y cuidarme de aquel trago amargo que viví en el inicio de este camino.

A mi familia que es el pilar de mi vida esto es también de ustedes, mis padres que siempre tienen una palabra de aliento para jamás darme por vencido y dar lo mejor de mí, no tienen idea de cuanto los quiero, gracias por esos momentos que serán por siempre inolvidables. Mi hermano quien además es mi amigo gracias por el apoyo y conocimientos que me brindaste sabes que cuando me necesites yo siempre estaré ahí apoyándote, te quiero hermano.

A mis asesores por haberme otorgado esa confianza para desarrollar esta tesis así como sus conocimientos y experiencias, también a cada uno de los profesores que me brindaron ideas y consejos para salir adelante ya sea tomando clases con ellos o simplemente en una plática.

A mis amigos de generación con quienes me apoye para despejar alguna duda en cuanto a trabajos y tareas pero sobre todo a la banda del cubículo con quienes estude a diario desde el propedéutico - lo logramos - juntos entramos y juntos salimos.

Hay mucho que les quisiera decir espero siempre poder contar con ustedes y no me cansare de decirles:

¡ ¡ GRACIAS ¡ ¡

M. en C. César Mújica Ascencio



INDICE

	Pág
Resumen	iii
Abstract	iii
Objetivo	iv
Justificación	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	viii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes y definición	2
1.2 Introducción al fenómeno de Fluorescencia	3
1.3 Clasificación de datos	5
1.3.1 Datos univariantes	5
1.3.2 Datos multivariantes	5
1.3.2a Datos Vectoriales	6
1.3.2b Datos Matriciales	6
1.3.2c Datos de orden superior	6
1.4 Calibración de datos obtenidos con espectroscopía de fluorescencia.	6
1.5 Organización de la tesis	8
Capítulo 2. Obtención de datos a través del espectrofluorómetro	11
2.1 Sistema experimental	12
2.2 Fluorescencia de jugos cítricos	13
2.3 Fluorescencia de anticongelantes	15
2.4 Fluorescencia de aceites	16
2.5 Adulteración de aceites.	17
2.6 Producción de Tesgüino	18
2.6.1 Análisis de Fluorescencia en la producción de Tesgüino	18
Capítulo 3. Diferentes tipos de análisis de datos	23
3.1 Técnicas del preprocesamiento de datos	24
3.1.1 Centrado	24
3.1.2 Suavizado	24



3.1.3	Derivada	25	
3.2	Regresión Lineal Múltiple (MLR)	26	
3.3	Mínimos Cuadrados Clásico (CLS)	26	
3.4	Mínimos Cuadrados Inverso (ILS)	28	
3.5	Regresión por Componentes Principales (PCR)	29	
3.5.1	Etapa de Análisis por Componentes Principales	29	
3.5.2	Etapa de Regresión de Componentes Principales	31	
3.6	Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales	31	
Capítulo 4. Resultados del análisis de datos			35
4.1	Análisis de anticongelantes	36	
4.1.1	Método CLS	37	
4.1.2	Método ILS	37	
4.1.3	Método PCA y PLSR	38	
4.2	Análisis de aceites	39	
4.1.1	Método CLS	39	
4.1.2	Método ILS	39	
4.1.3	Método PCA y PLSR	40	
4.3	Reconocimiento de Sustancias	41	
4.4	Identificación de componentes	43	
Capítulo 5. Conclusiones			45
Recomendaciones para trabajo a futuro			47
Apéndice A			48



RESUMEN

La quimiometría se relaciona con todos los procesos que transforman las señales de análisis y de datos complejos en información útil. En este trabajo, los métodos quimiométricos se aplican para determinar la concentración de uno o más componentes en una mezcla. La información procesada se encuentra en espectros de fluorescencia continua, emitida por diferentes sustancias tales como anticongelantes y aceites comestibles.

La medición de los espectros de fluorescencia se realizó con un equipo portátil conformado por un mini-espectrómetro de Ocean Optics, una fuente de luz (Led UV a 365nm, 200 mW), una fibra óptica bifurcada y una laptop. El espectrofluorómetro es útil para medir in vivo e in situ diversas sustancias en un intervalo de 350nm a 1000nm.

Se desarrolló un programa en el lenguaje gráfico G del ambiente de LabVIEW 8.2, para adquirir datos de espectros y aplicar varias técnicas quimiométricas. El programa calcula las concentraciones de los compuestos individuales presentes en una mezcla. Los resultados fueron comparados para determinar el método más eficaz. Para aceites comestibles, es posible averiguar el grado de adulteración del aceite de oliva con aceites de calidad menores.

ABSTRACT

Chemometrics is related to all those processes which transform analytical signals and complex data to useful information. In this work, chemometric methods are applied to identify concentration of each single compound in a mixture. The processed information is contained in steady-state fluorescence spectra, emitted by different substances such as antifreezes and edible oils.

The fluorescence spectra were measured with portable equipment based on a mini-spectrometer from Ocean Optics, a light source (Led UV at 365nm, 200 mW), a bifurcated fiber optic and a laptop. The spectrofluorometer is useful to measure in-vivo and in-situ diverse substances in a range from 350 nm to 1000 nm.

A program was written in the graphical language G of the LabVIEW 8.2, to acquire spectra data and to perform several chemometrics techniques. The program calculates the concentrations of individual compounds present in a mixture. The results were compared to determine the most effective method. For edible oils, it is possible to find out the extent of adulteration of olive oil with lesser quality oils.



OBJETIVO

Desarrollar un sistema capaz de obtener y analizar espectros de fluorescencia de una manera rápida y eficaz con el fin de identificar los componentes de una muestra líquida.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Implementar un espectrofluorómetro.
- Desarrollar técnicas quimiométricas para el análisis cualitativo y cuantitativo de espectros de fluorescencia de diferentes sustancias.
- Diseñar un algoritmo para la detección de los componentes en una mezcla líquida.



JUSTIFICACION

En la actualidad para la determinación de la composición de una sustancia existen diferentes técnicas. La mayoría de estas requiere de la toma de muestras para ser analizadas por medio de diferentes procesos, los cuales pueden ser ópticos (diferentes espectroscopias), químicos, etc. Estos métodos requieren normalmente tiempos largos y equipos de laboratorio costosos que difícilmente pueden ser usados en campo.

Los avances tecnológicos en la miniaturización de espectrómetros (los cuales poseen una alta sensibilidad, tiempos de análisis del orden de segundos y pueden ser conectadas a laptops sin mucho requerimiento de capacidades de computo), en la fabricación de LED's de alta potencia y bajo consumo, así como de la disponibilidad de fibras ópticas de alta calidad y versatilidad permiten ahora una gran reducción en el tamaño de los sistemas para la caracterización óptica de sustancias. Lo anterior permite la construcción de sistemas portátiles con amplias capacidades de aplicación tanto in-vivo como in-situ.

En este trabajo se aprovecha la propiedad de fluorescencia de los materiales para su identificación y la existencia de arreglos de fibras ópticas bifurcadas que permiten iluminar y observar dicha fluorescencia cuando se usa luz ultravioleta.

Así mismo se hace uso del análisis multivariable, aprovechando la capacidad de la laptop, para que además de la operación del sistema y la captura de información se realice la identificación y cuantificación de la composición del líquido bajo estudio.



INDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pág
Figura 1.1	Conocimientos que confluyen en la quimiometría y las aplicaciones de esta	1
Figura 1.2	Diagrama típico de Jablonski	4
Figura 1.3	Recta de calibrado.	7
Figura 1.4	Objetivo de la calibración.	8
Figura 2.1	Esquema del espectrofluorómetro usado en esta investigación	12
Figura 2.2	Interfaz con el usuario.	13
Figura 2.3a	Retrodispersión de la luz de de diferentes cítricos. (50 mW de excitación).	13
Figura 2.3b	Espectros de fluorescencia de diferentes cítricos. (50 mW de excitación).	13
Figura 2.4a	Retrodispersión de la luz de diferentes mezclas de cítricos. . .	14
Figura 2.4b	Espectros de fluorescencia de diferentes mezclas de cítricos.	14
Figura 2.5a	Saturación de la retrodispersión de la luz con de diferentes mezclas de cítricos (200 mW de excitación).	14
Figura 2.5b	Espectros de fluorescencia de diferentes mezclas de cítricos (200 mW de excitación).	14
Figura 2.6a	Saturación de la retrodispersión de la luz en diferentes mezclas de cítricos (200mW de excitación).	15
Figura 2.6b	Espectros de fluorescencia de diferentes mezclas de cítricos (200 mW de excitación).	15
Figura 2.7	Espectros de fluorescencia de cada anticongelante.	15
Figura 2.8	Espectros de fluorescencia de mezclas de anticongelantes con dos componentes.	16
Figura 2.9	Espectros de fluorescencia de mezcla de anticongelantes con tres componentes.	16
Figura 2.10	Espectros de fluorescencia de aceites de oliva extra vírgenes.	16
Figura 2.11	Espectros de fluorescencia de aceites comestibles refinados. .	16
Figura 2.12	Diferencia entre los espectros de fluorescencia de aceites de oliva, refinado y uno mezclado.	17
Figura 2.13	Mezcla entre aceite Rioliva y aceite Oleico.	17
Figura 2.14	Mezcla entre aceite Rioliva y aceite 1-2-3.	17
Figura 2.15a	Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de elaboración del tescüino calentado 0 - 2 horas.	19
Figura 2.15b	Fluorescencia del tescüino durante el proceso de calentado 0 - 2 horas.	19
Figura 2.16a	Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de elaboración del tescüino calentado 2 - 4 horas.	19
Figura 2.16b	Fluorescencia del tescüino durante el proceso de calentado 2 - 4 horas.	19



Figura 2.17a	Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de elaboración del tesgüino calentado 4 - 6 horas.	20
Figura 2.17b	Fluorescencia del tesgüino durante el proceso de calentado 4 – 6 horas.	20
Figura 2.18a	Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de colado y enfriamiento del tesgüino.	20
Figura 2.18b	Fluorescencia del tesgüino en el proceso de colado enfriamiento.	20
Figura 2.19	Comparación de las intensidades de fluorescencia a 500 nm durante el procesado del tesgüino con y sin ruido luminoso de fondo.	21
Figura 2.20	Variación de fluorescencia de Lp.	21
Figura 2.21	Variación de florescencia en Sc.	21
Figura 3.1	Centrado por columnas.	24
Figura 3.2	Suavizado de señales aplicando el filtro de Savitzki-Golay.	25
Figura 3.3	Uso de la derivación de una señal.	25
Figura 3.4	Representación gráfica del método CLS.	27
Figura 3.5	Representación gráfica del método ILS.	28
Figura 3.6	Notación de la descomposición de Componentes Principales	30
Figura 3.7	Obtención de Registros y Cargas.	30
Figura 3.8	Representación gráfica del método PLSR.	32
Figura 4.1	Interfaz con el Usuario (Métodos Multivariables).	36
Figura 4.2	Interfaz con el usuario para el reconocimiento de sustancias e identificación de componentes.	42
Figura 4.3	Sumatoria de cada espectro.	42



INDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pag
Tabla 2.1	Fluorescencia en los experimentos.	22
Tabla 4.1	Resultado de porcentajes en anticongelantes método CLS. . .	37
Tabla 4.2	Resultado de porcentajes en anticongelantes método ILS. . .	37
Tabla 4.3	Resultado de porcentajes en anticongelantes método PCR. . .	38
Tabla 4.4	Resultado de porcentajes en anticongelantes método PLSR. .	38
Tabla 4.5	Resultado de porcentajes en aceites método CLS.	39
Tabla 4.6	Resultado de porcentajes en aceites método ILS.	40
Tabla 4.7	Resultado de porcentajes en aceites método PCR.	40
Tabla 4.8	Resultado de porcentajes en aceites método PLSR.	41
Tabla 4.9	Características de algunos componentes y mezclas de aceites.	43



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN



1.1 Antecedentes y Definición

En 1972, Svante Wold introduce por vez primera el término quimiometría, el cual fue rápidamente aceptado por quienes trabajaban en la aplicación de las Matemáticas en la Química. En colaboración con Bruce Kowalski funda, en 1974, la Chemometrics Society, y en 1975 se alcanza un consenso para definir la quimiometría como [1.1]:

“Disciplina química que utiliza métodos y técnicas matemáticas, estadísticas y de lógica formal para diseñar y seleccionar procedimientos experimentales óptimos y extraer la máxima información relevante a partir del análisis de datos”.

La quimiometría trata, específicamente, de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos, más o menos complejos, en información. Los avances instrumentales, la automatización y la incorporación de las computadoras en el control de instrumentos y la adquisición de señales, permiten obtener gran cantidad de información analítica en tiempos muy cortos. Poder extraer la información útil contenida en esta gran cantidad de información, y ser capaz de interpretar los datos para que puedan ser utilizados y relacionados con el parámetro a interés, se convierte en una tarea compleja dado el gran volumen de datos. Esta problemática ha propiciado el desarrollo de métodos quimiométricos, basados en diferentes técnicas que permitan diseñar o seleccionar procedimientos para obtener la máxima información relevante de los datos analíticos [1.5].

Los tratamientos quimiométricos se encuentran en una clara expansión en su utilización. Hace unos años la capacidad de cálculo de las computadoras era un gran problema cuando se querían obtener resultados en un breve espacio de tiempo. Hoy en día este problema ha ido disminuyendo gracias a los grandes avances tecnológicos logrados en las PC's.

Uno de los primeros campos de aplicación de la quimiometría fue el estudio de datos medioambientales. La concientización a nivel mundial, iniciada sobre los años setenta, sobre la importancia del estudio de la contaminación del medio ambiente propició la realización de numerosas campañas y proyectos tanto a nivel local como nacional e internacional. El enorme volumen de datos generados en una campaña de estudio de la contaminación hizo necesario recurrir a disciplinas que, como la quimiometría, permitieran su análisis y la obtención de la información relevante en ellos contenida.

En la figura 1.1 se muestra la relación existente entre las diferentes áreas de conocimiento y las aplicaciones que se derivan de ellas por medio de la quimiometría.

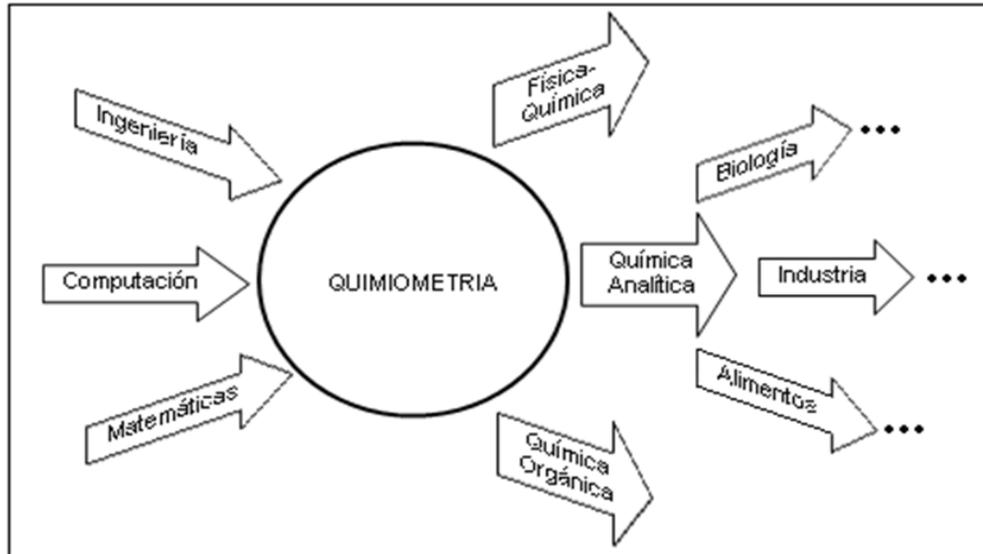


Figura 1.1 Conocimientos que confluyen en la quimiometría y las aplicaciones de esta.

Con la generación de la gran cantidad de datos cuando se hace un estudio de sustancias se pueden tener dos tipos de información:

- **Información cualitativa:** Conocer el número de especies y/o componentes que intervienen en un proceso, mezcla ó producto terminado.
- **Información cuantitativa:** Conocer la concentración de cada uno de los elementos.

1.2 Introducción al fenómeno de fluorescencia

La luminiscencia es la emisión de luz de una sustancia como consecuencia de la absorción de energía. Cuando se tiene un pequeño lapso de tiempo (menor a 10^{-8} segundos) entre la excitación y la emisión, el proceso es conocido como fluorescencia y esta cesa tan pronto como la fuente de excitación es removida. Para un tiempo de decaimiento mucho mas largo, el proceso es conocido como fosforescencia. Este proceso puede continuar un largo lapso de tiempo después de que la fuente de excitación es removida. El proceso que ocurre entre la absorción y emisión de la luz se puede ilustrar por medio de diagramas de Jablonski [1, 2]. En la figura 1 se muestra un diagrama típico de Jablonski, donde S0 designa el estado orbital base, S1 es el primer estado electrónico de energía y S2 es el segundo estado electrónico. Dentro de cada uno de estos niveles de energía los fluoróporos pueden existir en distintos niveles de energía vibracional, denotados como 0, 1, 2, etc.

Las transiciones entre estados se representan con líneas verticales. La absorción de la luz ocurre en tiempos del orden de 10^{-15} s. Un fluoróforo es excitado a algún estado alto de energía vibracional, S1 ó S2, y rápidamente decae al nivel vibracional más bajo de S1. A este proceso se le llama conversión interna y generalmente ocurre en 10^{-12} s o menos. Debido a que los tiempos de fluorescencia son típicamente cercanos a 10^{-8} s la conversión interna termina antes de la emisión. La emisión de fluorescencia se produce a partir del estado de energía vibracional más bajo de S1.

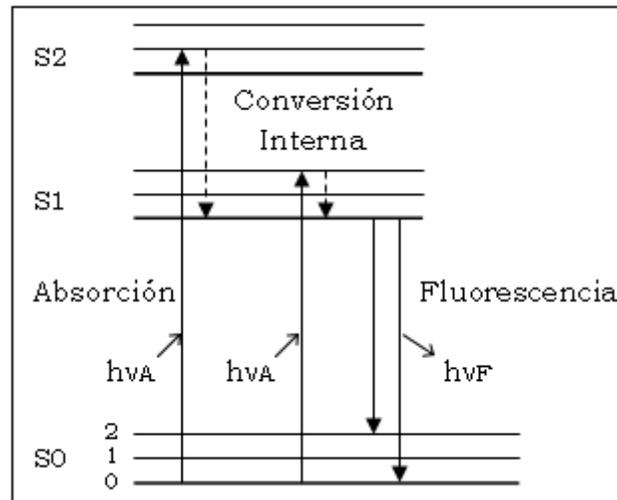


Figura 1.2 Diagrama típico de Jablonski

Examinando el diagrama de Jablonski de la figura 1.2 se puede observar que la energía de emisión es menor que la energía de absorción, por lo tanto la fluorescencia ocurre a bajas energías o grandes longitudes de onda. Estas pérdidas de energía entre la excitación y la emisión fueron observadas primeramente por Stokes [1.2, 1.3].

Las características más importantes de un fluoróforo son su rendimiento cuántico y el tiempo de vida de su fluorescencia. El rendimiento cuántico es el número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos. Substancias con alto rendimiento cuántico, aproximado a uno, muestran emisiones brillantes.

La fracción de fluoróforos que decaen a través de la emisión y por lo tanto el rendimiento cuántico esta dada por [1.2, 1.3]:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.1)$$

Donde Γ es la razón de decaimiento de fluoróforos por emisión espontánea y k_{nr} es la razón de decaimiento que no produce radiación y esta asociada a las pérdidas de energía de Stokes. El tiempo de vida τ de un fluoróforo se define



como el tiempo promedio entre su excitación y su regreso al estado base, cuando la excitación óptica es una función δ (impulso) y se puede expresar como:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.2)$$

Al tiempo de vida de un fluoròporo en ausencia del decaimiento sin radiación se le llama tiempo de vida natural o intrínscico y esta dado por la siguiente relación:

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} \quad (1.3)$$

1.3 Clasificación de datos

Los métodos de calibración pueden tener una base totalmente empírica o bien estar soportados por una base teórica que explica el fenómeno, físico o químico, responsable de la señal analítica (por ejemplo la ley de Lambert-Beer en espectrofotometría de absorción). Se han propuesto diversas clasificaciones de los métodos de calibración pero la mas típica se divide en datos univariantes y datos multivariantes [1.4].

1.3.1 Datos univariantes

El tipo más sencillo de datos en química es de naturaleza univariable, es decir, medidas en las que únicamente se obtiene un valor numérico, un escalar. Esta situación se da en muchos casos, por ejemplo, en las medidas de pH o en las medidas espectrofotométricas realizadas a una sola longitud de onda. El método matemático utilizado en la extracción de la información analítica es la estadística univariable y la regresión lineal univariable.

La aplicación de estos métodos supone que la respuesta instrumental es consecuencia de la presencia de un solo componente químico, es decir, que no hay interferencias ni contribuciones diferentes al ruido de fondo en la señal instrumental. La relación entre la señal y la concentración del componente se reduce, generalmente, a una línea recta, siendo necesario realizar una separación previa de los componentes interferentes y eliminar el ruido de fondo antes de realizar la calibración.

1.3.2 Datos multivariantes

Los datos multivariantes se clasifican en: vectoriales, matriciales y de orden superior.



1.3.2a Datos vectoriales

Un instrumento de medición proporciona un vector de datos (por ejemplo un espectro de fluorescencia) al analizar cada muestra.

En este caso no es necesario modelar explícitamente las interferencias ni el ruido de fondo antes de extraer la información química relevante, aunque es necesario que los patrones sean de la misma naturaleza que las muestras estudiadas. Cuando el problema contiene interferencias no presentes en los patrones, los métodos de calibración multivariable tampoco darán resultados satisfactorios, pero sí permitirán la detección de estas interferencias. Los métodos matemáticos utilizados son los derivados del análisis multivariable de los datos y de la estadística multivariable.

1.3.2b Datos matriciales

Es este caso, para cada muestra analizada se obtiene una matriz de datos. En esta matriz se consideran dos direcciones, las filas y las columnas, que corresponden, generalmente, a dos tipos diferentes de medida. Este es el caso que se da cuando se combinan las medidas de emisión fluorescente a diferentes longitudes de onda de excitación; o cuando se efectúa un seguimiento de respuesta de tipo multivariable con el tiempo, pH o concentración.

1.3.2c Datos de orden superior

La extensión de los conceptos anteriores nos lleva hacia los instrumentos de orden superior y los datos obtenidos con ellos. No hay límite en el máximo orden de los datos que pueden ser obtenidos. Los instrumentos modernos de espectroscopia de fluorescencia pueden proporcionar la variación de los espectros excitación-emisión con el tiempo, produciendo una estructura tridimensional de datos por muestra. Una ventaja añadida al utilizar instrumentos de orden superior es el aumento de la sensibilidad.

1.4 Calibración de datos obtenidos con espectroscopía de fluorescencia

En la quimiometría, la calibración consiste en encontrar líneas rectas a partir de un modelo o de datos experimentales. Cada recta relaciona una concentración c de algún elemento en una mezcla. Se deben tener bien definidos los parámetros con los que se va a trabajar, así como los intervalos de trabajo. En esta tesis se medirán espectros de fluorescencia de diversas sustancias para su posterior estudio. Utilizamos la ecuación de Beer-Lambert reducida a la siguiente expresión [1.5] para una sola longitud de onda:

$$r = Sc \quad . . . (1.4)$$

Donde:

- r = es la fluorescencia de un componente
- S = es el coeficiente de fluorescencia del componente
- c = es la concentración del componente

En general la ley de Beer-Lambert reducida permite la determinación de concentraciones de disoluciones, a partir de una recta de calibrado obtenida. Por ejemplo se puede medir la fluorescencia de disoluciones patrón de componentes, con sus concentraciones conocidas.

La recta de calibrado se construye representando algún parámetro, como la fluorescencia en el eje de las ordenadas y las concentraciones en el eje de las abscisas. Para cada concentración c_x de algún elemento en la mezcla existe una cantidad determinada de fluorescencia r_x es decir la fluorescencia es única para cada concentración, ver figura 1.3, cabe señalar que en nuestro caso la concentración máxima que se pudo detectar es de aproximadamente 97.5% y la mínima 2.5%.

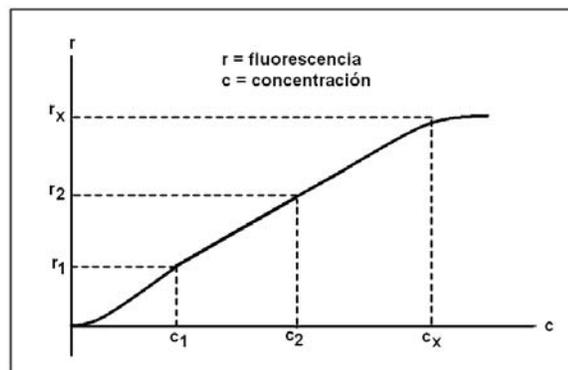


Figura 1.3 Recta de calibrado

Para múltiples componentes y para un intervalo de longitud de onda definido la ecuación (1.4) se puede generalizar de la siguiente manera:

$$r_x = \sum_{m=1}^{\infty} S_{xm} c_m \quad . . . (1.5)$$

es decir:

$$\begin{aligned} r_1 &= S_{11}C_1 + S_{12}C_2 + \dots + S_{1m}C_m \\ r_2 &= S_{21}C_1 + S_{22}C_2 + \dots + S_{2m}C_m \\ r_3 &= S_{31}C_1 + S_{32}C_2 + \dots + S_{3m}C_m \\ &\dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\ r_x &= S_{x1}C_1 + S_{x2}C_2 + \dots + S_{xm}C_m \end{aligned}$$

El objetivo de la ecuación 1.5 es tener bien definidos los parámetros con los que se va a trabajar. Para los objetivos de esta tesis, las matrices de cada uno de los componentes (S_{xm}) y la matriz del espectro de la mezcla (r_x) todo estos para poder encontrar la relación entre la concentración de un componente y su fluorescencia ver figura 1.4.

También se debe determinar el área de trabajo, por ejemplo si la fluorescencia se presenta en un intervalo de 450 a 640nm se pueden tomar solamente los datos que se encuentran dentro de este intervalo. En el capítulo 3 se describen los métodos de preprocesamiento de datos que se utilizan para hacer el cálculo requerido.

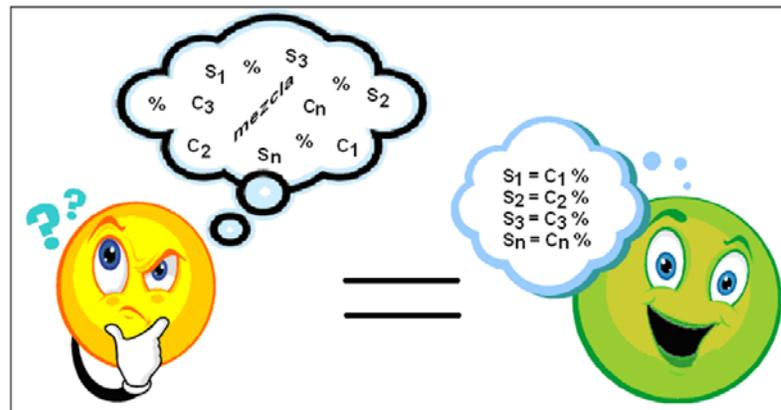


Figura 1.4 Objetivo de la calibración

1.5 Organización de la tesis

- Capítulo 1. Introducción.

En este capítulo se presenta la definición de la quimiometría, sus objetivos, y la relación existente con diferentes áreas del conocimiento. También se presenta una descripción de los tipos de datos que se pueden presentar en una medición y la información que representan. Finalmente se presenta la ecuación básica para el análisis de datos que se trabajan en esta tesis.

- Capítulo 2. Obtención de datos a través del espectrofluorómetro.

En este capítulo se muestra y se describe el arreglo experimental utilizado para la realización de mediciones de fluorescencia así como la interfaz con el usuario. Se presentan mediciones en diferentes sustancias y se van encontrando sus características. Se revisan también algunos problemas que se presentan en el manejo de las mismas.



- **Capítulo 3. Diferentes tipos de análisis de datos.**

Se presentan algunos métodos de pre-tratamiento de datos que permiten la discriminación de datos poco relevantes, también se describen cuatro métodos multivariados que ayudan a calcular la concentración (previamente conocida por el usuario durante el proceso de calibración) de un componente en una mezcla.

- **Capítulo 4. Resultados del análisis de datos.**

En este capítulo se analizan y comparan los resultados obtenidos por los métodos multivariados para determinar cual es el más recomendable. También se propone una posible solución en el reconocimiento de espectros así como en la identificación de componentes de una mezcla.

- **Capítulo 5. Conclusiones**

Se presentan las conclusiones generales de esta tesis, los problemas que se presentaron durante su desarrollo y los posibles trabajos futuros.

REFERENCIAS

- [1.1] T. Morer “La Quimiometría en el análisis de datos medioambientales”, Universidad Ramón Llull. Barcelona España, 2003.
- [1.2] Lakowicz Joseph R., “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Klumer Academic/Plenum Publishers, 2nd Edition USA, 1999.
- [1.3] Gore Michael G., “Spectrophotometry and Spectrofluorimetry”, Oxford University Press, 2nd Edition UK, 2000.
- [1.2] S. Macho, “Metodologías Analíticas basado en Espectroscopía de Infrarrojo y Calibración Multivariados. Aplicación a la Industria Petroquímica”, Tesis 2002.
- [1.3] R. Kramer, “Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis”, Marcel Dekker Edition, 1998.
- [1.4] A. Smilde, R Bro, “Multi-way Analysis Applications in Chemical Sciences”, Wiley England Edition, England, 2004.
- [1.5] J. Amigo, “Desarrollo y Aplicación de Métodos Quimiométricos Multidimensionales al Estudio de Sistemas Enzimáticos”, Barcelona España Tesis 2007.



- [1.6] J. Ferré, “Calibración multivariante en análisis cuantitativo. El modelo directo”, Universidad Rovira i Virgili.
- [1.7] J. Ferré, “Calibración multivariante en análisis cuantitativo. El modelo indirecto”, Universidad Rovira i Virgili.
- [1.8] N. Ramanujam, “Fluorescence Spectroscopy In Vivo”, Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2000
- [1.9] R. Brereton, “Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant”, Wiley England Edition, England 2003.



Capítulo 2

Obtención de datos
a través de un
espectrofluorómetro

2.1 Sistema Experimental

El equipo que se utilizó para la realización de las mediciones de fluorescencia se muestra en la figura 2.1:

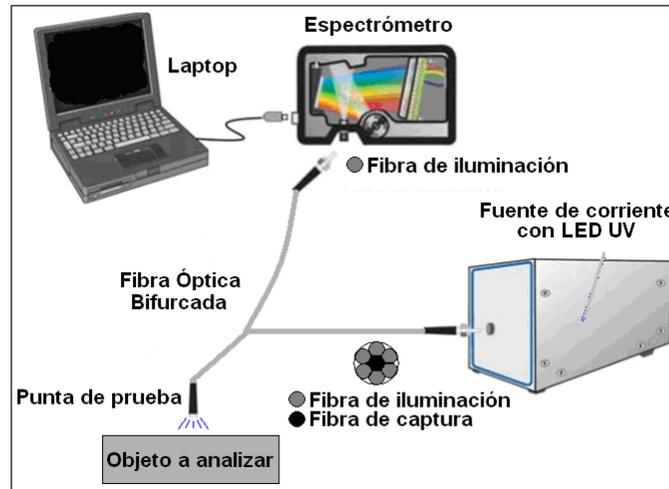


Figura 2.1 Esquema del espectrofluorómetro usado en esta investigación.

Para la excitación de las muestras objeto de este estudio se utilizó luz ultravioleta producida por un LED NCSU033A de la compañía Nichia que emite a 365nm en un intervalo de potencia de 4 a 200 mW. El LED se polariza con una fuente de corriente variable de 10 a 500 mA.

La luz es transmitida al objeto a analizar por medio de uno de los brazos de una fibra óptica bifurcada (R200-UV/VIS de Ocean Optics) compuesta por 6 canales de 200 μm cada uno. El otro brazo está compuesto de 1 canal también de 200 μm que se usa para capturar la fluorescencia emitida por la muestra y ser transportada a un espectrómetro.

Se utilizaron dos espectrómetros de la firma Ocean Optics: el primero es el HR4000CG-UV-NIR el cual trabaja de 200 a 1100 nm, tiene una resolución de 0.75 nm y alcanza una intensidad máxima de 16000 cuentas; el segundo es el USB4000-VIS-NIR el cual trabaja de 325 a 1000 nm, con una resolución de 1.5 nm y alcanza una intensidad máxima de 65000 cuentas.

Ambos equipos cuentan con un puerto USB para comunicarse con una computadora. Se desarrolló un programa en el lenguaje gráfico G del ambiente de LabVIEW versión 8.2. Este programa captura y almacena los espectros medidos. Su panel frontal (interfaz con el usuario) se muestra en la figura 2.2.

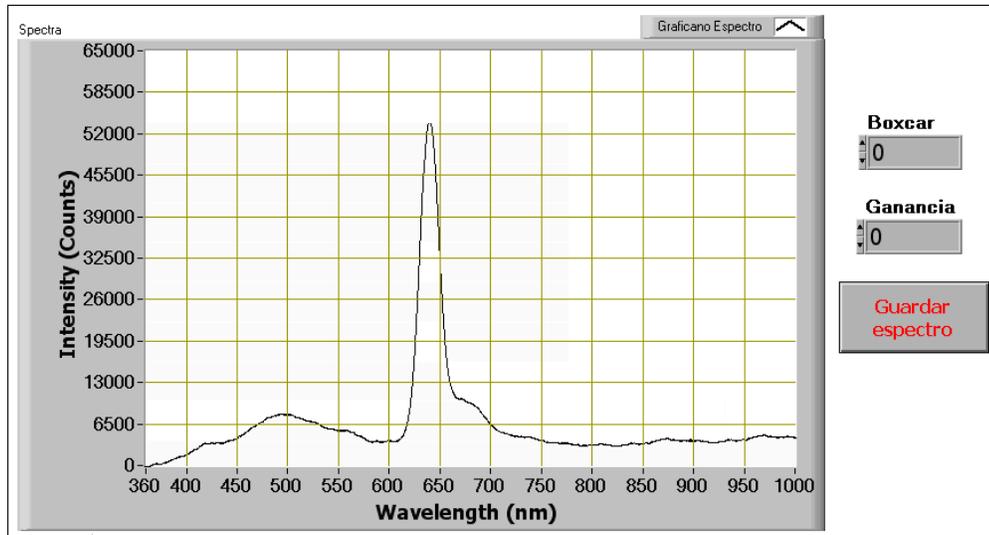


Figura 2.2 Interfaz con el usuario

En el panel de la figura 2.2 existen un área de graficado del espectro de fluorescencia medido, también tiene 2 controles uno llamado “BOXCAR” que se utiliza para atenuar el ruido de la señal y otro de “GANANCIA” que sirve para ajustar la grafica cuando la fluorescencia es débil. El botón de “GUARDAR ESPECTRO” permite abrir un cuadro de dialogo para guardar el archivo generado en extensiones .TXT o .XLS.

2.2 Fluorescencia de Jugos Cítricos

Para estas mediciones se utilizaron cuatro tipos de cítricos: naranja, limón, mandarina y toronja de los cuales se tomaron espectros de cada uno de ellos. En la figura 2.3a se puede apreciar la retrodispersión de luz por cada uno de los diferentes jugos, a las longitudes de emisión del LED. En la figura 2.3b se muestran los espectros de fluorescencia de cada cítrico. La potencia de irradiación usada en estas mediciones es de 50 mW.

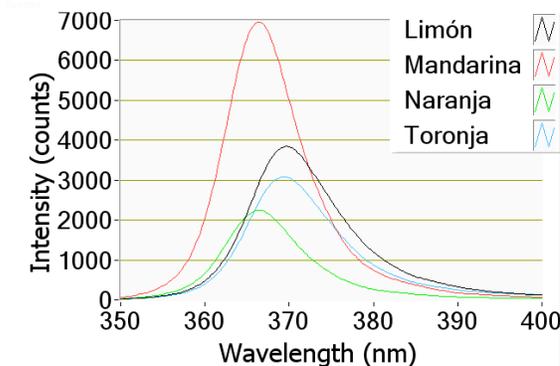


Figura 2.3a Retrodispersión de la luz de de diferentes cítricos. (50 mW de excitación).

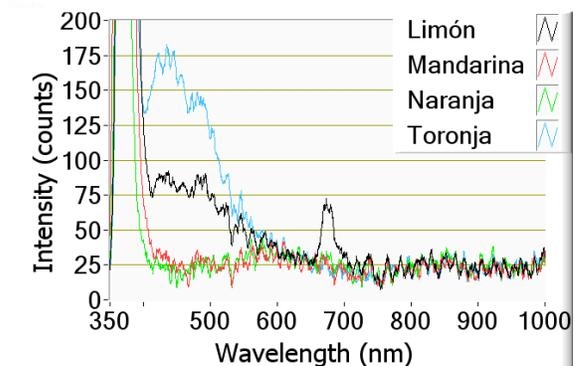


Figura 2.3b Espectros de fluorescencia de diferentes cítricos.(50 mW de excitación).

Se realizaron mezclas entre dos y tres jugos para observar el comportamiento de la fluorescencia emitida por las mezclas, en la figura 2.4b se observa que la fluorescencia de las mezclas casi se perdió, por lo que se tuvo que aumentar la potencia de excitación a 200 mW. Como resultado ocurre la saturación de los fotodiodos del espectrómetro que miden la retrodispersión de luz de cada mezcla. (350 a 375 en la figura 2.5a). En la figura 2.5b si se aprecia la fluorescencia de las mezclas. En las figuras 2.6a y 2.6b se muestran la retrodispersión de los espectros y de fluorescencia medidos en mezclas de tres jugos cítricos respectivamente.

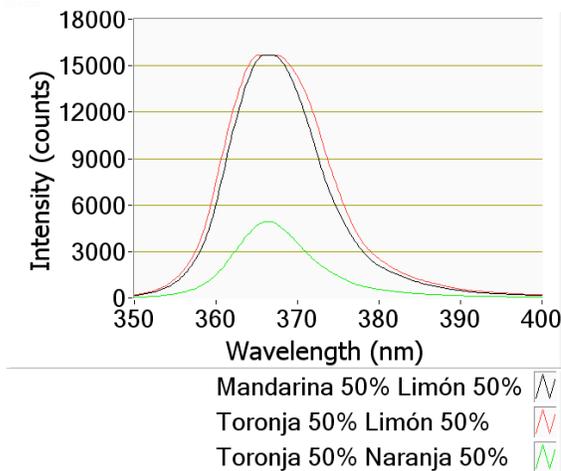


Figura 2.4a Retrodispersión de la luz de diferentes mezclas de cítricos.

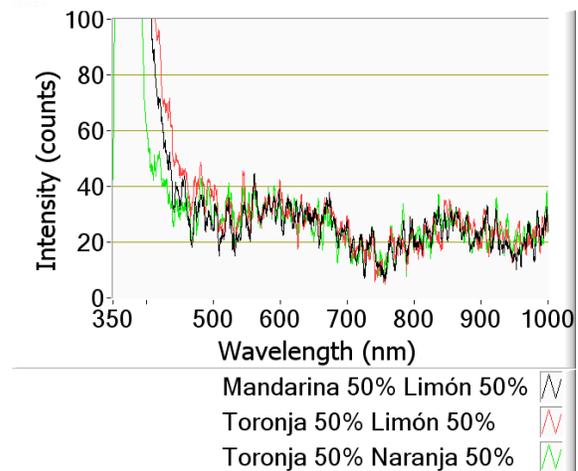


Figura 2.4b Espectros de fluorescencia de diferentes mezcla de cítricos.

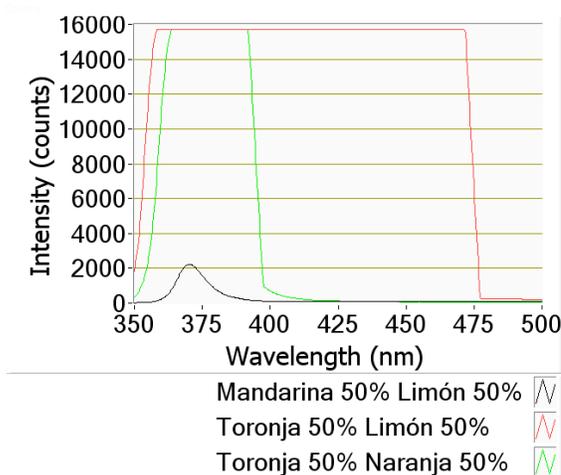


Figura 2.5a Saturación de la retrodispersión de la luz con de diferentes mezclas de cítricos (200 mW de excitación).

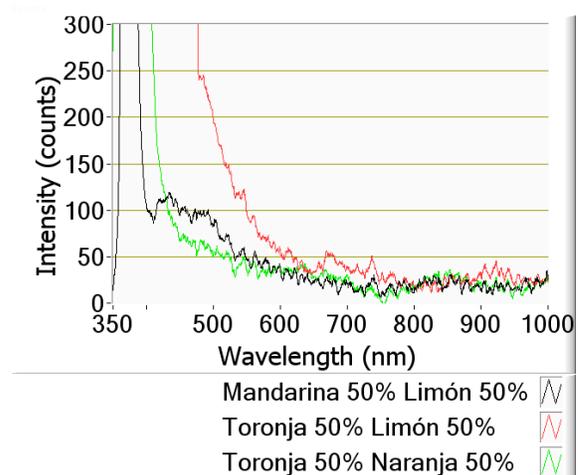
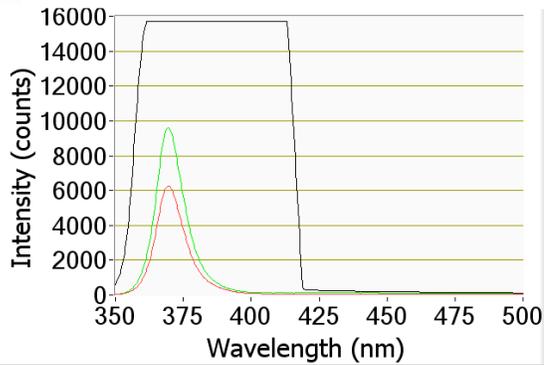
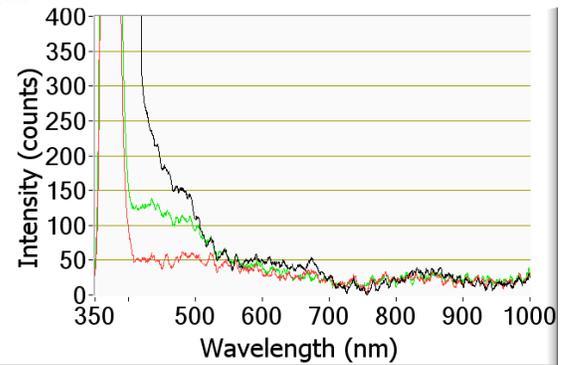


Figura 2.5b Espectros de fluorescencia de diferentes mezclas de cítricos (200 mW de excitación).



Limón 33% Naranja 33% Mandarina 33%
Mandarina 25% Limón 25% Naranja 50%
Mandarina 25% Naranja 25% Toronja 50%

Figura 2.6a Saturación de la retrodispersión de la luz en diferentes mezclas de cítricos (200mW de excitación).



Limón 33% Naranja 33% Mandarina 33%
Mandarina 25% Limón 25% Naranja 50%
Mandarna 25% Naranja 25% Toronja 50%

Figura 2.6b Espectros de fluorescencia de diferentes mezclas de cítricos (200 mW de excitación).

2.3 Fluorescencia de Anticongelantes

Para estas mediciones se utilizaron tres tipos de anticongelantes, dos de ellos fueron de la marca Bardahl (B) y uno de la marca Roshfrans (R).

En estas mediciones se observó que los espectros son similares, es decir la fluorescencia se presenta a la misma longitud de onda (520 nm) pero con intensidad diferente, ver figura 2.7. Cabe señalar que el color de los anticongelantes es diferente, uno color naranja, otro verde oscuro y el tercero verde claro.

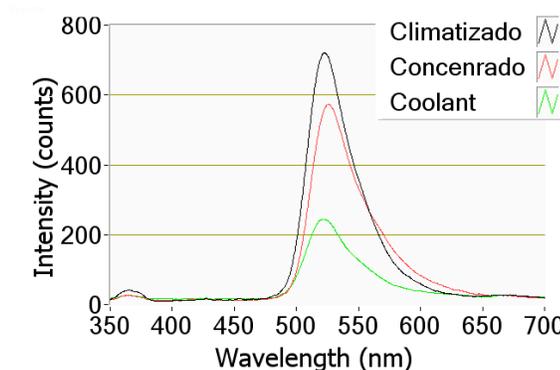


Figura 2.7 Espectros de fluorescencia de cada anticongelante.

De la misma manera se realizaron diferentes mezclas entre dos y tres componentes. Como se observa en la figura 2.8 y 2.9 solo aumenta o disminuye la intensidad a la misma longitud de onda (520 nm).

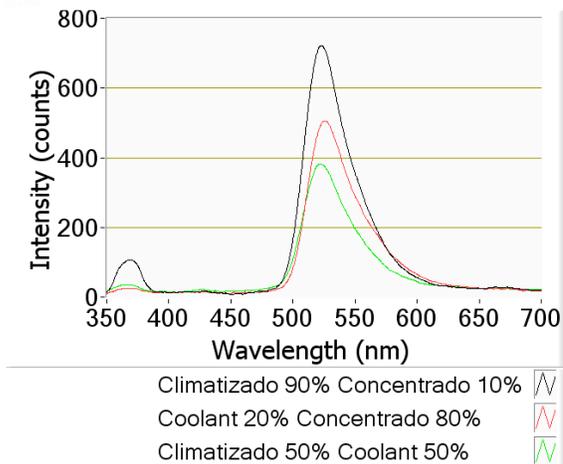


Figura 2.8 Espectros de fluorescencia de mezclas de anticongelantes con dos componentes.

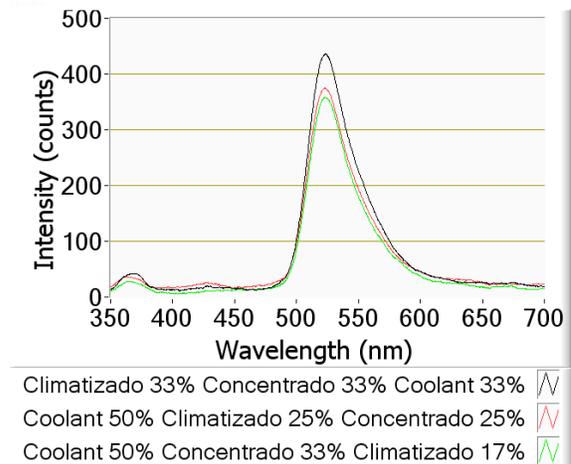


Figura 2.9 Espectros de fluorescencia de mezcla de anticongelantes con tres componentes.

2.4 Fluorescencia de Aceites

Para estas mediciones se utilizaron tres aceites puros de oliva extra vírgenes. Sus espectros de fluorescencia se muestran en la figura 2.10. Estos aceites muestran como características principales dos picos, uno alrededor de 520 nm y el otro de mucha mayor intensidad en 680 nm. También se realizaron mediciones de fluorescencia en aceites refinados no de oliva, sus espectros se muestran en la figura 2.11. Cabe señalar que todos los aceites son refinados pero los extra vírgenes son obtenidos del primer proceso y los que llamamos “refinados” se obtienen de las siguientes exprimidas del fruto.

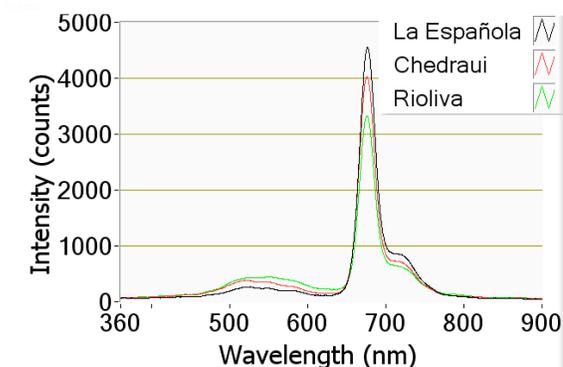


Figura 2.10 Espectros de fluorescencia de aceites de oliva extra vírgenes.

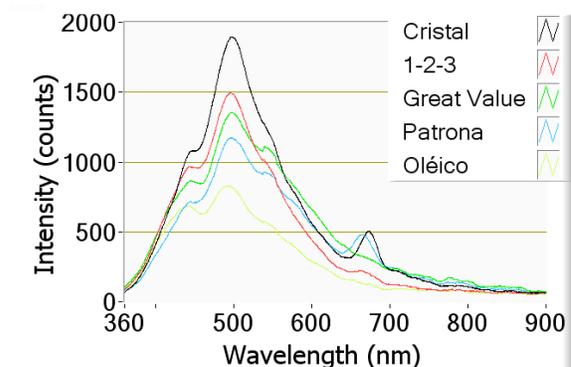


Figura 2.11 Espectros de fluorescencia de aceites comestibles refinados.

Se puede observar que a diferencia de los aceites de oliva extra virgen, los aceites refinados no de oliva tienen su mayor intensidad en 520 nm y en algunos casos el pico en 680 nm es mínimo e incluso nulo. El aceite de Oliva “Carbonell”

menciona en su etiqueta que esta compuesto por una mezcla de aceites puros y refinado. La figura 2.12 presenta la diferencia entre los espectros de fluorescencia de un aceite de oliva extra virgen (La española), de un aceite compuesto (Carbonell) y uno refinado (Cristal).

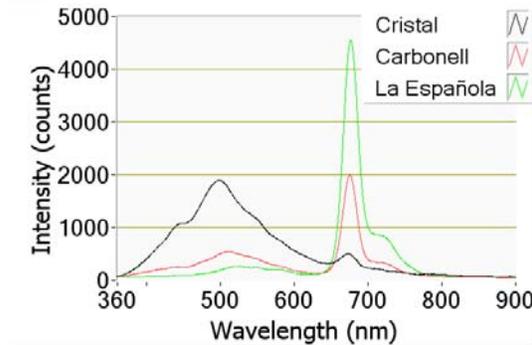


Figura 2.12 Diferencia entre los espectros de fluorescencia de aceites de oliva, refinado y uno mezclado.

2.5 Adulteración de aceites.

El aceite de oliva es muy apreciado por su sabor y aroma y cada vez más aumenta el interés por sus propiedades nutricionales y gastronómicas, esto hace que tenga un mayor precio en el mercado que el que tienen otros aceites del tipo vegetal. Por lo anterior, es una tentación la adulteración del aceite de oliva con aceites de precios más bajos como los de maíz, soya, girasol, orujo, etc [2.5].

Para analizar dicha adulteración se seleccionó un aceite de oliva extra virgen (Rioliva) y dos aceites comestibles refinados (Oleico y 123) y se realizaron mezclas entre ellos, sus espectros de fluorescencia se muestran en las figuras 2.13 y 2.14.

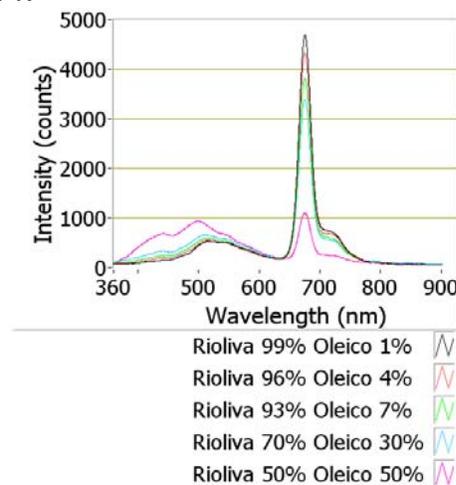


Figura 2.13 Mezcla entre aceite Rioliva y aceite Oleico.

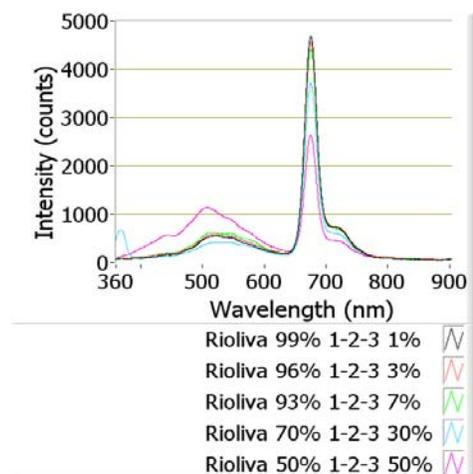


Figura 2.14 Mezcla entre aceite Rioliva y aceite 1-2-3.



En las figuras 2.13 y 2.14 se aprecia que el cambio espectral del aceite Rioliva al aumentar la concentración del aceite comestible refinado, es decir, su pico característico a 680 nm va disminuyendo en cuanto a intensidad y el pico a 520 nm aumenta, por lo que es posible detectar el porcentaje de adulteración del aceite de oliva.

2.6 Producción de Tesgüino

El Tegüino, tesgüino o tejuino es una bebida refrescante hecha a base de maíz germinado, con ste al fermentarse se produce licor y lo vuelve una bebida alcohólica de amplio consumo en el norte y occidente del país. Es una de las bebidas preferidas en las celebraciones familiares, religiosas, deportivas y en las llamadas tesgüinadas que son los eventos más importantes en la vida de algunos grupos indígenas como los tarahumaras, en los que se toman decisiones políticas o económicas, o con lo que se remunera el trabajo comunitario.

Diluida con agua esta bebida es ingerida por lactantes y niños, y constituye un complemento importante de su dieta. Los procedimientos para elaborar tesgüino varían entre grupos étnicos, por lo que puede considerarse que existen varias modalidades de tesgüino, que reciben diferentes nombres de acuerdo con los productos vegetales utilizados en su elaboración.

Se puede preparar con granos de maíz, con jugo de cañas de maíz, con frutas como las bayas de madroño, duraznos, granos de trigo, granos de sorgo o jugo de hojas de maguey. El más común, sin embargo, es el tesgüino que se hace con granos de maíz germinados.

En algunos de los estados del país, donde los grupos indígenas preparan tesgüino, la población mestiza elabora una modalidad de dicha bebida, denominada tejuino. Esta es una bebida refrescante preparada con nixtamal o con granos de maíz germinados y molidos, azúcar y piloncillo. Es una bebida con bajo contenido alcohólico que es consumida como refresco, alimento o diurético, y a la que frecuentemente se le adiciona sal, nieve y jugo de limón [2.6].

2.6.1 Análisis de fluorescencia en la producción de Tesgüino

Se realizaron mediciones de fluorescencia durante la elaboración del Tesgüino en colaboración con el Departamento de Alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. El procedimiento que se utiliza en este laboratorio para producir Tesgüino es el siguiente:

1. Se pone a germinar el maíz (en este caso el de color “morado”) hasta que tenga sus primeras raíces y se muele quedando un polvo fino.
2. Se pone a calentar agua hasta que empiece la ebullición y se le añade el maíz molido.

3. Se deja calentar la mezcla unas 8 hrs. y se le va agregando el agua que se evapora.
4. A las 6 o 7 horas de cocción se cuela la mezcla.
5. A las 8 horas se retira la bebida del fuego y se mete en un recipiente con hielo para matar cualquier microorganismo que haya quedado.

Al principio de la elaboración se tiene una mezcla color café medio y durante el procedimiento va cambiando de color hasta tener un color morado. Se realizaron cada hora mediciones de los espectros de retrodispersión y fluorescencia durante el proceso de elaboración del Tescüino. Los espectros medidos se muestran en las figuras 2.15, 2.16, 2.17 y 2.18, donde se puede observar que la Retrodispersión y la fluorescencia cambian con el tiempo.

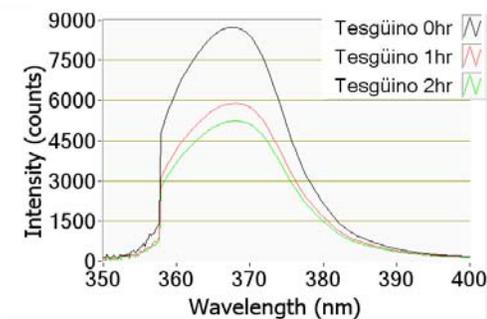


Figura 2.15a Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de elaboración del tescüino calentado 0 - 2 horas.

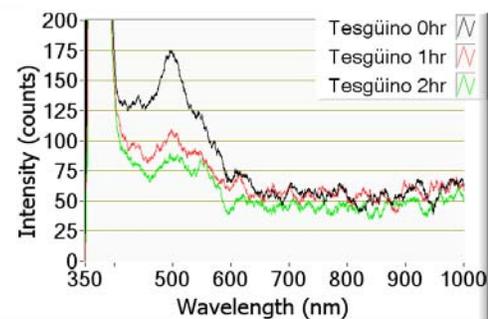


Figura 2.15b Fluorescencia del tescüino durante el proceso de calentado 0 - 2 horas.

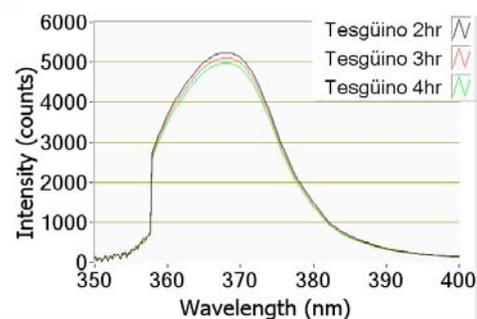


Figura 2.16a Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de elaboración el tescüino calentado 2 - 4 horas.

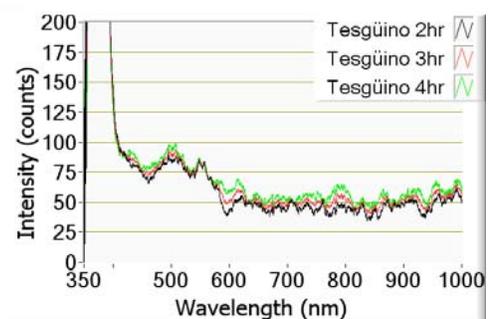


Figura 2.16b Fluorescencia del tescüino durante el proceso de calentado 2 - 4 horas.

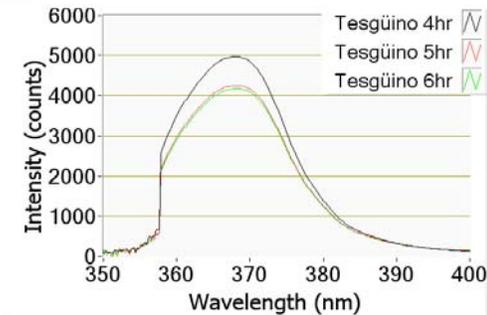


Figura 2.17a Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de elaboración del tesgüino calentado 4 - 6 horas.

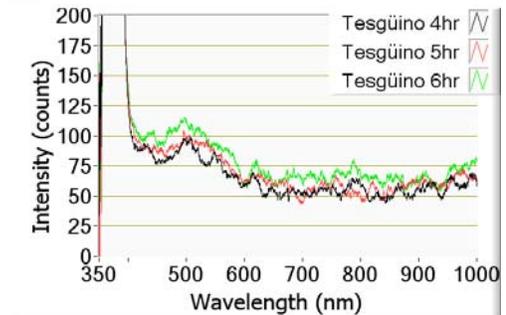


Figura 2.17b Fluorescencia del tesgüino durante el proceso de calentado 4 - 6 horas.

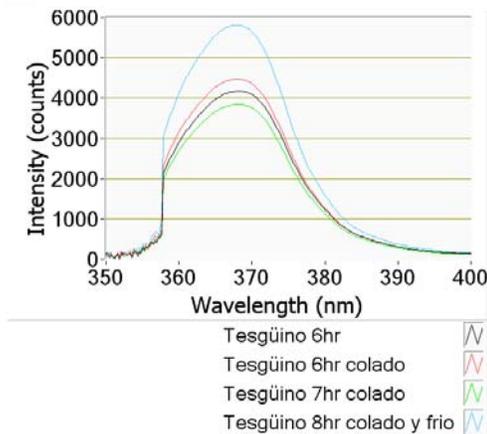


Figura 2.18b Fluorescencia del tesgüino en el proceso de colado y enfriamiento.

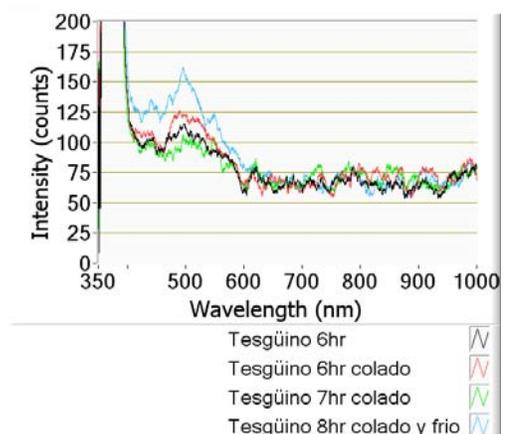


Figura 2.18a Retrodispersión de la luz de excitación en el proceso de colado y enfriamiento del tesgüino.

En la figura 2.15b en la hora 0 se observa la mayor intensidad de la fluorescencia obtenida durante todo el proceso, la cual decae con el tiempo. En la figura 2.18b se observa que al final del proceso al enfriar la bebida, la fluorescencia crece a un valor similar al de la hora cero.

Se realizaron otros dos experimentos con el fin de observar los efectos del ruido luminoso de fondo: en el primero se dejó el recipiente de cocción (construido de vidrio Pyrex) al descubierto y en el segundo se cubrió con papel aluminio y se observó que la fluorescencia, a 500nm, en función del tiempo se comporta en forma similar aunque con intensidades diferentes mayores, ver figura 2.19. Al final (a las 8hrs), en el experimento 1 no se enfrió la bebida, por lo que aquí las lecturas no son comparables.

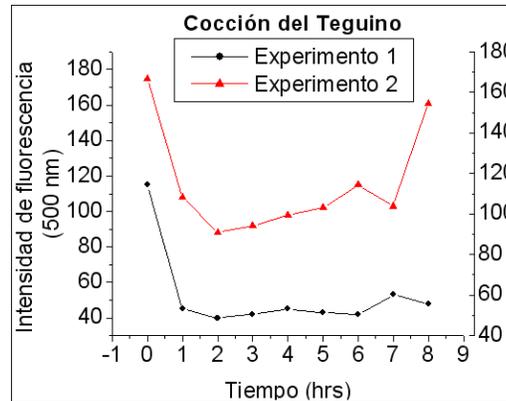


Figura 2.19 Comparación de las intensidades de fluorescencia a 500 nm durante el procesado del tesgüino con y sin ruido luminoso de fondo.

Uno de los objetivos propios de la investigación realizada por el grupo de la ENCB era observar el comportamiento de dos sustancias una el *Sacharomyces cerevisiae* (Sc) y la otra el *Lactobacilus Plantarum* (Lp), el primero es una levadura que produce alcohol etílico y el otro es un ácido que produce un ácido láctico. De las sustancias anteriores también se hicieron mediciones de fluorescencia, para ello se tomo una muestra y se analizaba cada 6 horas hasta llegar a 54 horas, esto se hizo para los 2 experimentos y los resultados, para la fluorescencia a 500 nm, se muestran en las figuras 2.20 y 2.21. En la tabla 2.1 se muestran los valores graficados junto con el valor de T (Testigo) el cual indica el valor de fluorescencia de una muestra de tesgüino la cual no se sometió al proceso de fermentación con el objetivo de observar el cambio producción de las sustancias ya mencionadas.

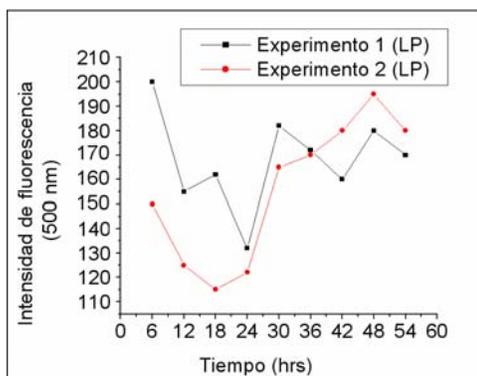


Figura 2.20 Variación de fluorescencia de Lp.

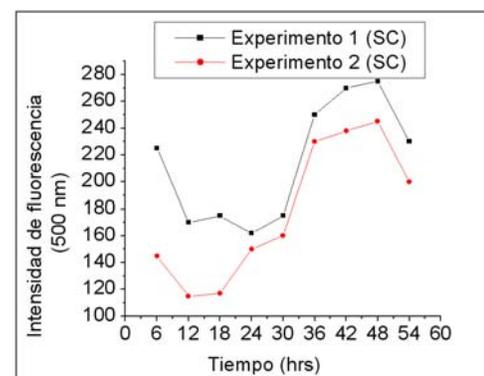


Figura 2.21 Variación de fluorescencia en Sc.

**Tabla 2.1** Fluorescencia en los experimentos.

Intensidad de fluorescencia (cuentas) Pico a 500 nm Fermentación Tescüino				
HORAS	SC (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>)		LP (<i>Lactobacillus Plantarum</i>)	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
6	145	225	150	200
	T(142)	T(200)	T(142)	T(200)
12	115	170	125	155
	T(142)	T(200)	T(142)	T(200)
18	117	175	115	162
	T(142)	T(200)	T(142)	T(200)
24	150	162	122	132
	T(142)	T(200)	T(142)	T(200)
30	160	175	165	182
	T(142)	T(200)	T(142)	T(200)
36	230	250	170	172
	T(142)	T(200)	T(142)	T(200)
42	238	270	180	160
	T(142)	T(190)	T(142)	T(190)
48	245	275	195	180
	T(142)	T(190)	T(142)	T(190)
54	200	230	180	170
	T(142)	T(200)	T(142)	T(200)

REFERENCIAS

- [2.1] D. Escolar, M^a R. Haro, J. Ayuso, “La Justificación del Perfil de los Espectros de Fluorescencia de los Aceites de Oliva Virgen”, Facultad de Ciencias de Cádiz España, 2003.
- [2.2] M. Oliveras, “La Justificación del Perfil de los Espectros de Fluorescencia de los Aceites de Oliva Virgen”, Universidad de Granada, Tesis 2005
- [2.3] E. Rey, B. Neptali, “Control de la Calidad del Aceite de Oliva Extra Virgen por Espectrofotometría Ultravioleta”, Revista de Química 2004
- [2.4] D. Escolar, M^a R. Haro, J. Ayuso, “Caracterización de Aceites de Oliva Comerciales Mediante la Banda de los Pigmentos Clorofílicos que quedan tras el Tratamiento con Tierras Decolorantes”, Facultad de Ciencias de Cádiz España, 2001.
- [2.5] F. Peña, J. Morrón, “Detección de Adulteraciones en Aceites de Oliva Vírgenes con Espectroscopía de Infrarrojo Cercano”, Universidad de Córdoba España, 2004.
- [2.6] <http://www.guadalajaraguadalajara.com/paginas.php?id=90>
- [2.7] <http://www.eltejuino.com.mx/>



Capítulo 3

Diferentes tipos de análisis de datos multivariables

3.1 Técnicas del preprocesamiento de datos

El preprocesamiento de las señales medidas es uno de los primeros pasos que se lleva a cabo en el análisis de datos multivariables. Consiste en manipulaciones matemáticas que se aplican a las señales medidas antes de realizar cualquier otro tipo de análisis. El proceso de preprocesamiento trata de anular o, al menos reducir, fuentes de variabilidad en la señal, de carácter aleatorio (como el ruido). En las siguientes líneas se describen tres técnicas de preprocesamiento [3.5].

3.1.1 Centrado

El centrado de una variable consiste en la sustracción del valor medio a todos sus elementos, es un tipo de normalización como se muestra en la figura 3.1 (B). En el caso de los datos espectrales el centrado consiste en restar al espectro de cada una de las muestras el espectro medio. Este preprocesamiento pone de relieve las diferencias entre espectros, al haber eliminado la tendencia común figura 3.1(A) (el espectro medio). Se utiliza tanto en la técnica de análisis por componentes principales (PCA), regresión por componentes principales (PCR) ó por regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR).

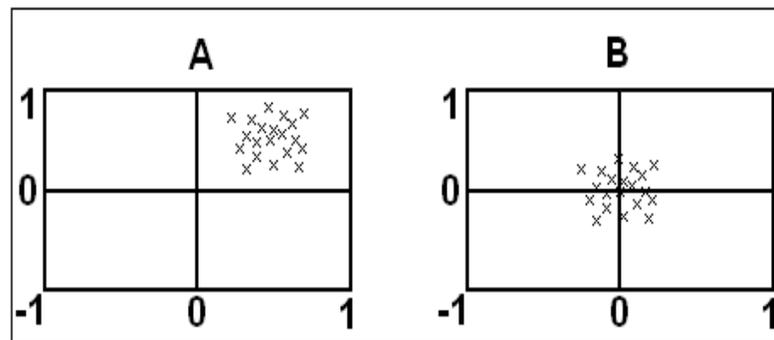


Figura 3.1 Centrado por columnas. [3.5]

3.1.2 Suavizado

Promediar espectros puede no ser suficiente para disminuir el ruido de alta frecuencia en aquellos casos en que la relación señal/ruido es pequeña, por lo que es necesario aplicar algoritmos sobre los espectros que le minimicen. Para esto se puede utilizar el filtro de Savitzky-Golay ó la transformada de Fourier, la figura 3.2 muestra como actúa el suavizado de un espectro aplicando el filtro de Savitzky-Golay [3.5].

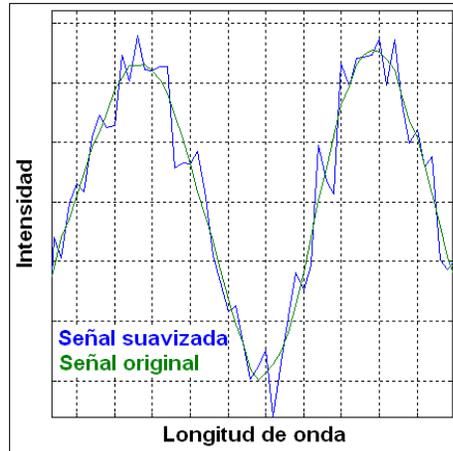


Figura 3.2 Suavizado de señales aplicando el filtro de Savitzki-Golay. [3.5]

3.1.3 Derivada.

La derivada es uno de los preprocesamientos más utilizados en espectroscopia por su capacidad de disminuir variaciones de línea base, como las debidas a la turbidez de las muestras o a la presencia de burbujas de aire. La utilización de la primera derivada elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, es decir, desplazamientos de la línea base. La segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda. No es común el uso de derivadas de orden superior. Uno de los métodos más utilizados para el cálculo de las derivadas es el propuesto por Savitzky-Golay [3.5]. Debido a que el uso de este preprocesamiento espectral disminuye siempre la relación señal/ruido se tiene que ser cauteloso en su utilización, en la figura 3.3 se muestra un ejemplo de la aplicación de la derivada en un espectro.

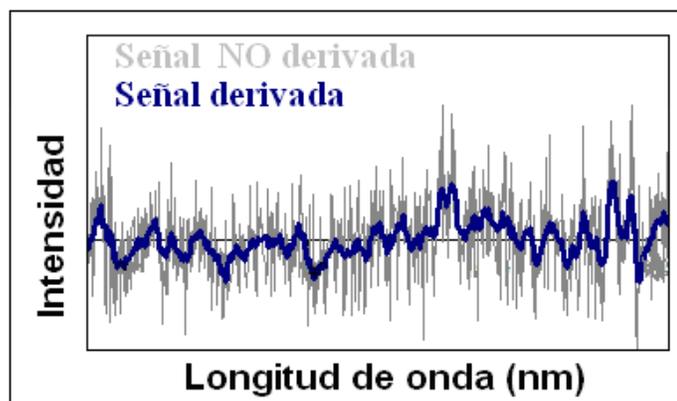


Figura 3.3 Uso de la derivación de una señal. [3.5]

3.2 Regresión Lineal Múltiple (MLR)

El método de regresión lineal múltiple, utilizado cuando se estudia la posible relación entre varias variables independientes (predictoras o explicativas) y otras variables dependientes (criterio, respuestas, etc), se aplica al caso en que la variable de respuesta es de tipo numérico. Como por ejemplo, en el estudio de la velocidad en una carrera de atletismo se deben de considerar muchos aspectos como por ejemplo la edad, condición física, tamaño de la persona e incluso el sexo del individuo [3.2].

Aunque hay que tener cuidado al establecer las variables. En el ejemplo anterior no por el hecho de ser hombre se es más veloz que todas las mujeres o viceversa. Los Modelos de Regresión establecen una relación entre las variables y esa podría ser solo una variable independiente de identificación.

Un modelo de regresión lineal múltiple con p variables predictoras basado en n observaciones esta en general dado por [3.13]:

$$\gamma_i = \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip} + e_i \quad \dots (3.1)$$

para $i = 1, 2, 3, \dots, n$

En nuestro estudio se puede relacionar la ecuación 3.1 con la Ley de Beer Lambert reducida de la ecuación 1.1, γ_i representa el espectro de la mezcla, los factores β son las concentraciones y x_i corresponden a los espectros individuales de cada componente.

En forma matricial la ecuación 3.1 se puede representar como :

$$Y = X\beta + e \quad \dots (3.2)$$

$$\begin{bmatrix} \gamma_1 \\ \gamma_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \gamma_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{2p} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{np} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \beta_p \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ e_n \end{bmatrix}$$

3.3 Mínimos Cuadrados Clásico (CLS)

Este método utiliza la Regresión Lineal Múltiple en la clásica ley de espectroscopia de Beer-Lambert, incluyendo un error, la cual se describe en la siguiente ecuación matricial [3.1]:

$$r = Sc + e \quad \dots (3.3)$$

Donde:

- r = matriz del espectro de la mezcla
- S = matriz de espectros individuales de los componentes
- c = matriz de concentración de cada componente
- e = matriz de error de medición o ajuste

En la figura 3.4 se muestra la representación gráfica de las matrices de la ecuación 3.3.

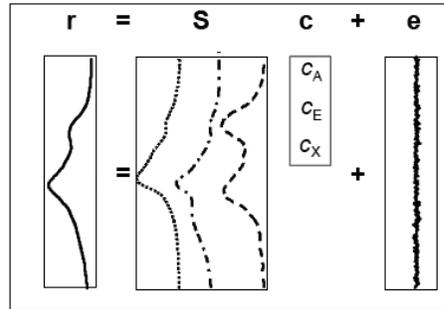


Figura 3.4 Representación gráfica del método CLS.

De la ecuación 3.3 se quiere calcular la matriz c de concentración para cada componente a partir del espectro de la mezcla (matriz r) y de los espectros individuales de cada componente (matriz S). El despeje de c implica una operación de división, la cual no existe en el algebra matricial por lo tanto se procede de la siguiente forma, tomando e = 0:

$$r = cS \quad \dots (3.4)$$

$r = cS$	multiplicando por la matriz transpuesta S^T
$rS^T = cSS^T$	multiplicando por $[SS^T]^{-1}$
$rS^T [SS^T]^{-1} = cSS^T [SS^T]^{-1}$	finalmente
$rS^T [SS^T]^{-1} = c$	$\dots (3.5)$

El error no se utiliza para calcular las concentraciones debido a que el espectro de fluorescencia es sometido primeramente a un proceso de filtrado.

De la misma manera los espectros originales de los elementos que componen la mezcla pueden ser calculados a partir del conocimiento de la mezcla y sus concentraciones. La ecuación queda de la siguiente manera:

$$rc^T [cc^T]^{-1} = S \quad \dots (3.6)$$

La base del modelo CLS de la ecuación 3.1, la cual indica que el espectro de la mezcla se debe reproducir sumando los espectros de los componentes puros (adecuadamente escalados). Para que esta ecuación se cumpla es necesario satisfacer dos condiciones:

1. La respuesta instrumental debe ser lineal con respecto a la concentración de los componentes de la muestra en el intervalo de concentraciones de trabajo. Esto debe ser válido para todas las longitudes de onda del espectro y para todos los componentes de la muestra.
2. No debe existir interacción entre los componentes de la mezcla. Los espectros de los componentes puros se pueden obtener midiendo cada compuesto puro o una dilución de concentración conocida. Sin embargo, si los constituyentes de la mezcla interactúan, sus espectros dentro de la mezcla serán distintos de los que hemos obtenido a partir de cada componente aislado.

3.4 Mínimos Cuadrados Inversos (ILS)

Para resolver los problemas que se presentan en el método (CLS) debido a las similitudes de los espectros y las interacciones de componentes, existe una gran variedad de Métodos Multivariantes Inversos. Uno de ellos es el ILS, en el cual se trabaja con la expresión inversa de la Ley de Beer-Lambert:

$$S = rc + e \quad \dots (3.7)$$

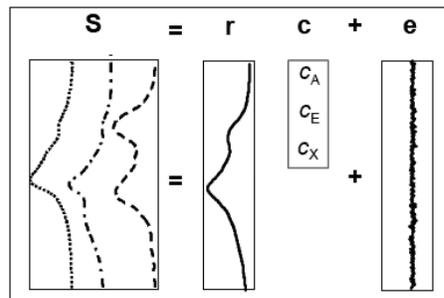


Figura 3.5 Representación gráfica del método ILS.

De la misma manera que en CLS se pueden calcular las concentraciones y los espectros, lo único que hay que cambiar son las variables $S \leftrightarrow r$



$$\begin{aligned}
 S &= cr && \text{multiplicando por la matriz transpuesta } r^T \\
 Sr^T &= cr r^T && \text{multiplicando por } [r r^T]^{-1} \\
 Sr^T [r r^T]^{-1} &= cr r^T [r r^T]^{-1} && \text{finalmente} \\
 Sr^T [r r^T]^{-1} &= c && \dots (3.8)
 \end{aligned}$$

Algunas complicaciones que se pueden presentar es que al multiplicar por $r^T [r r^T]^{-1}$ (pseudoinversa) puede dar como resultado una matriz singular, es decir que su determinante es 0 y por lo tanto no sería posible calcular la inversa de $r^T [r r^T]$.

3.5 Regresión por Componentes Principales (PCR)

Este método de reducción de variables consta de dos etapas. En la primera se efectúa una reducción de variables mediante un análisis de componentes principales (PCA) y en la segunda se realiza la regresión de estos componentes principales sobre la matriz de parámetros a estimar, en este caso las concentraciones [3.2].

3.5.1 Etapa de Análisis por Componentes Principales

En la técnica multivariables PCA, un número elevado de variables, más o menos correlacionadas, son transformadas en un número inferior de variables ortogonales (no correlacionadas) que contienen la información principal del sistema, eliminando la información redundante o reduciendo la contribución del ruido.

Se trabaja con una matriz X , donde cada fila es una muestra u objeto y cada columna una variable, que puede ser la fluorescencia a una longitud de onda y tiempo determinado. La dimensión de esta matriz puede ser de m muestras por k variables. La técnica PCA proporciona una aproximación a la matriz X como producto de dos matrices de la siguiente manera:

$$X = TP^T + E \quad \dots (3.9)$$

en donde:

- T = registros de la relación entre objetos (muestras)
- P = cargas que retienen la relación existente entre las variables
- E = error de medición o ajuste

$$\begin{array}{|c|} \hline \begin{array}{c} J \\ \hline X \\ \hline I \end{array} = \begin{array}{c} A \\ \hline T \\ \hline I \end{array} \begin{array}{c} J \\ \hline P^T \\ \hline J \end{array} + \begin{array}{c} J \\ \hline E \\ \hline I \end{array} \\ \hline \end{array}$$

Figura 3.6 Notación de la descomposición de Componentes Principales.

En la figura 3.6 se muestran las dimensiones que se obtienen al calcular las matrices T y P a partir de la matriz de los espectros de cada uno de los componentes.

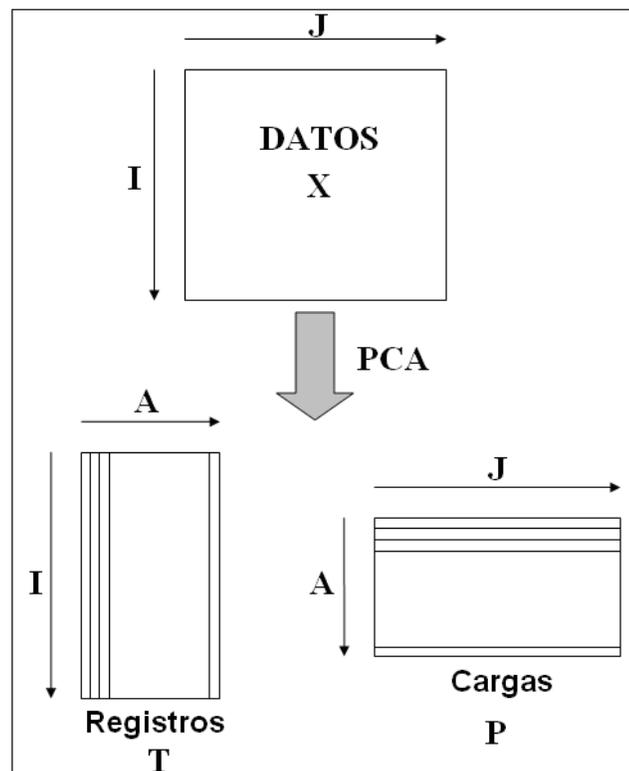


Figura 3.7 Obtención de Registros y Cargas.

Este análisis se aplica frecuentemente cuando se trabaja con datos colineales es decir que la información principal de las variables X se puede expresar en un conjunto más pequeño de A variables. Cada una de estas nuevas A variables se denomina componente principal o factor.



3.5.2 Etapa de Regresión de Componentes Principales

Utilizando los componentes principales de la etapa anterior se realiza una regresión múltiple inversa (ILS por sus siglas en inglés) utilizando específicamente los *registros*, en lugar de realizarlo sobre los datos originales, con lo que se elimina cualquier posible problema de singularidad como en las técnicas ILS y CLS.

Para resolver lo anterior se aplica un método para calcular la pseudoinversa, el cual consiste en descomponer la matriz en valores y vectores singulares mediante la descomposición de valores singulares (SVD por sus siglas en inglés). El procedimiento es el siguiente:

1. Obtener las matrices U y V , que son los vectores singulares por la izquierda y derecha respectivamente.
2. Obtener la matriz diagonal S , que son los valores singulares de la matriz original.
3. Establecer $X=USV^T$
4. Calcular $[1/S]^T$, es decir la transpuesta del valor inverso de los valores singulares la cual es la pseudoinversa de S ó (S^+)
5. Multiplicar $VS^+ U^T$, con lo que se obtiene la pseudoinversa de la original, que es igual a $r^T[r r^T]^{-1}$ o $S[SS^T]^{-1}$ para cada método.

Uno de los principales problemas de la técnica PCR es que los componentes principales obtenidos para la representación de datos de la matriz X muchas veces no pueden ser los óptimos para la predicción de los componentes. Por ese motivo se han desarrollado otras técnicas de calibración que intentan concentrar el máximo poder predictivo en lo primeros componentes principales como es el caso de la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales.

3.6 Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR)

En el método PLSR, a diferencia del PCR se intenta que los primeros componentes contengan la mayor información para la predicción de la matriz c . Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLSR utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz c , p. ej. concentraciones), obteniéndose variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o

componentes que tienen gran parecido a los componentes principales que se encuentran a partir del método PCR [3.2].

Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices \mathbf{X} y \mathbf{c} se centran o auto escalan como en el caso del PCA. Cada una de las matrices se descompone simultáneamente en una suma de A factores como se muestra en la figura 3.8:

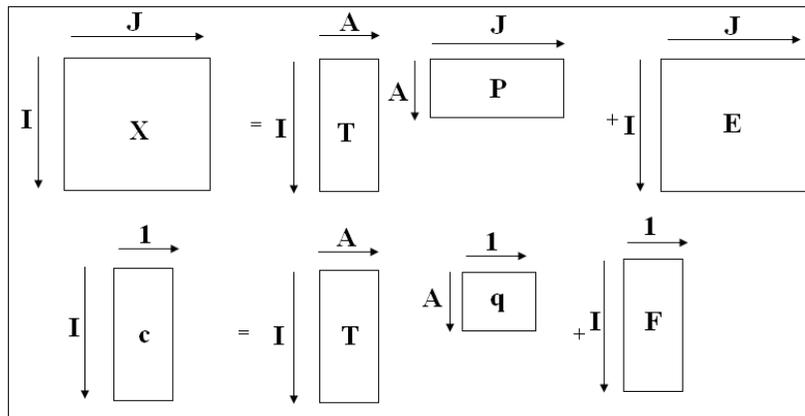


Figura 3.8 Representación gráfica del método PLSR.

Donde:

\mathbf{X} = matriz de espectro medido

\mathbf{q} = matriz de cargas

\mathbf{c} = matriz de concentraciones

\mathbf{P} = matriz de registros

\mathbf{E} y \mathbf{F} = matrices de error

Si tenemos m muestras, a factores, k variables y p analitos, la dimensionalidad de las matrices es la siguiente: \mathbf{T} y \mathbf{U} ($m \times a$), \mathbf{P}^T ($a \times k$) y \mathbf{Q}^T ($a \times p$). En este caso, las cargas no coinciden exactamente con la dirección de máxima variabilidad de las muestras como en el caso de PCA, ya que están corregidos para obtener la máxima capacidad predictiva para la matriz \mathbf{c} .

La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los registros de los bloques \mathbf{X} y \mathbf{c}

A partir de aquí se calcula el valor de \mathbf{c} :

$$\mathbf{c} = \mathbf{T} \mathbf{B} \mathbf{Q}^T + \mathbf{f} \quad \dots (3.10)$$

Donde \mathbf{B} es la matriz de los regresores.



REFERENCIAS

- [3.1] R. Kramer, "Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis", Marcel Dekker Edition, 1998.
- [3.2] R. Brereton, "Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant", Wiley England Edition, 2003.
- [3.3] A. Smilde, R Bro, "Multi-way Analysis Applications in Chemical Sciences", Wiley England Edition, 2004.
- [3.4] M. Porcel, "Aplicación de Técnicas Quimiométricas para el Desarrollo de Nuevos Métodos Cinético-Espectrofotométricos de Análisis", Tesis 2001.
- [3.5] S. Macho, "Metodologías Analíticas basado en Espectroscopía de Infrarrojo y Calibración Multivariables. Aplicación a la Industria Petroquímica", Tesis 2002.
- [3.6] J. Ferré, "Calibración multivariante en análisis cuantitativo. El modelo directo", Universidad Rovira i Virgili.
- [3.7] J. Ferré, "Calibración multivariante en análisis cuantitativo. El modelo indirecto", Universidad Rovira i Virgili.
- [3.8] R. De Maesschalck, F. Estienne, "The Development of Calibration Models for Spectroscopic Data Using Principal Component Regression".
- [3.9] Infometrix, "Comparison of Factor-Based PLS and PCR to Traditional Calibration Methods", 1991 Infometrix, Inc. Chemometrics technical notes.
- [3.10] J. Shlens, "A Tutorial on Principal Component Analysis", 2005.
- [3.11] C. Lee, "Principal Component Analysis", University of Alberta, 2004.
- [3.12] J. Ferré, "Análisis de mezclas líquidas multicomponentes mediante un espectrofotómetro IR i técnicas Quimiométricas".
- [3.13] C. Araujo, I Campos, "Modelo de Predicción Basado en Análisis Multivariables para la Determinación de Concentración de Azúcar en Solución", Revista Mexicana de Física, 2005, pp. 67-75.
- [3.14] R. Milindiu, R. Rentería, "APLS: A Fast Approximate Algorithm for Partial Least Squares", 2001.



- [3.15] H. Abdi, "Partial Least Square Regression PLS-Regression", The University of Texas at Dallas, 2007.
- [3.16] J. Vega, "Generalizaciones de Mínimos Cuadrados Parciales con Aplicación en Clasificación Supervisada", Universidad de Puerto Rico, Tesis 2004.
- [3.17] K. I. Poulli, G. A. Mousdis, C. A. Georgiou, "Rapid synchronous fluorescence method for virgin olive oil adulteration assessment", Food Chemistry 105 (2007) 369-375.
- [3.18] K. I. Poulli, G. a: Mousdis, C. A. Georgiou, "Synchronous fluorescence spectroscopy for quantitative determination of virgin olive oil adulteration with sunflower oil ", Anal Bioanal Chem (2006) 386: 1571-1575.
- [3.17] M. Zandomenighi, L. Carbonaro and C. Caffarata, "Fluorescence of Vegetable Oils: Olive Oils", J. Agric. Food Chem, 2005, 53, 759-766.



Capítulo 4

Resultados

Con cada uno de los métodos multivariantes descritos en el capítulo 3, se analizaron los anticongelantes, los aceites comerciales, y las respectivas mezclas de estos (mediciones realizadas en el capítulo 2). Con jugos de cítricos se obtuvieron mediciones saturadas de Retrodispersión o con muy poca fluorescencia que en algunos casos se confunde con ruido.

Para realizar el análisis multivariantes de nuestras mediciones se elaboró un programa en LabVIEW 8.2 en el que se pueden observar de manera rápida y si se requiere en tiempo real las variaciones de los resultados en cada método. El programa puede encontrar las concentraciones en la mezcla de cada uno de sus componentes (conocidos por el usuario en el proceso de calibración) con un máximo de hasta 3 componentes. En la figura 4.1 se muestra la interfase con el usuario del programa desarrollado.

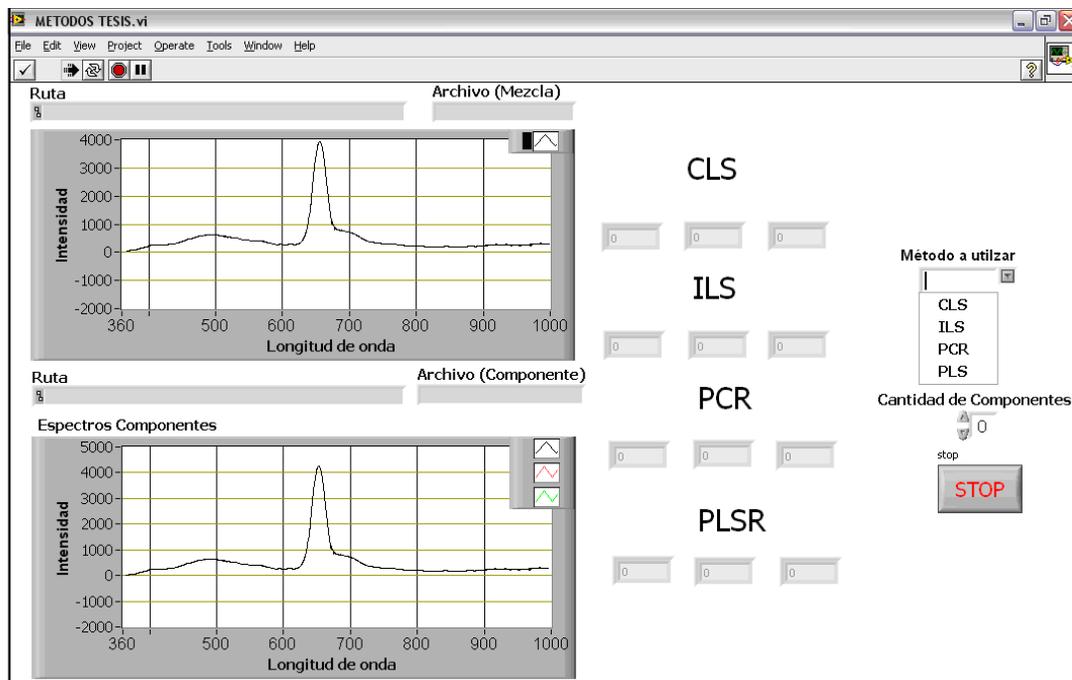


Figura 4.1 Interfaz con el Usuario (Métodos Multivariantes).

4.1 Análisis en anticongelantes

Puesto que los espectros de cada uno son similares se dificulta el cálculo de las concentraciones y la identificación de espectros de fluorescencia. Para cada método se presenta una tabla en la cual se pondrá solo algunos ejemplos los cuales serán los mismos para su fácil comparación. En las siguientes líneas se presentan tablas de resultados comparativos entre los diversos métodos aplicados, para los métodos CLS y ILS estos resultados son mostrados con el valor que se obtiene con dichos métodos para observar las imprecisiones que se obtienen para con estas mezcla.



4.1.1 Método CLS

En la tabla 4.1 se muestra la deficiencia del método CLS para el cálculo de concentraciones en los anticongelantes, para los cuales los espectros son casi idénticos, el signo menos indica que esta por debajo del porcentaje mezclado y viceversa si el valor es positivo.

Tabla 4.1 Resultado de porcentajes en anticongelantes método CLS.

	Coolant	Climatizado	Concentrado
	%	%	%
Porcentajes mezclado	70	30	
Porcentajes calculado	148.21	-48.21	
Error	78.21	-78.21	
Porcentajes mezclado		90	10
Porcentajes calculado		-171.65	271.65
Error		-261.65	261.65
Porcentajes mezclado		50	50
Porcentajes calculado		-124.65	224.65
Error		-174.65	174.65
Porcentajes mezclado	50	25	25
Porcentajes calculado	146.82	-51.62	4.80
Error	96.82	-76.63	20.20
Porcentajes mezclado	50	33	17
Porcentajes calculado	146.82	4.80	-51.62
Error	96.82	-25.63	-68.20

4.1.2 Método ILS

Después de analizar los mismos espectros pero ahora con el método ILS se mejoraron los resultados para la mezcla de dos componentes, ver tabla 4.2. Con tres componentes los errores son considerables aunque el signo negativo desaparece.

Tabla 4.2 Resultado de porcentajes en anticongelantes método ILS

	Coolant	Climatizado	Concentrado
	%	%	%
Porcentajes mezclado	70	30	
Porcentajes calculado	77.15	22.84	
Error	7.15	-7.16	
Porcentajes mezclado		90	10
Porcentajes calculado		54.98	45.01
Error		-35.02	35.01



Porcentajes mezclado			50	50
Porcentajes calculado			54.69	45.30
Error			4.69	-4.70
Porcentajes mezclado		50	25	25
Porcentajes calculado		1135	1501	465.30
Error		1085	1476	440.3
Porcentajes mezclado		50	33	17
Porcentajes calculado		45.43	37.49	17.07
Error		-4.57	4.49	0.07

4.1.3 Método PCA y PLSR

Los resultados obtenidos con los métodos PCA y PLSR, tablas 4.3 y 4.4 son similares y más exactos. Esto debido a que utilizan el mismo principio, aunque en PCA se obtienen los resultados en una sola iteración y en PLSR se van obteniendo en relación con los componentes principales de la concentración anterior es decir cada uno con su respectiva iteración, por lo que se necesitan dos o tres iteraciones para obtener resultados.

Tabla 4.3 Resultado de porcentajes en anticongelantes método PCA

	Coolant	Climatizado	Concentrado
	%	%	%
Porcentajes mezclado	70	30	
Porcentajes calculado	72.22	27.77	
Error	2.22	-2.23	
Porcentajes mezclado		90	10
Porcentajes calculado		95.3	4.63
Error		5.30	-5.37
Porcentajes mezclado		50	50
Porcentajes calculado		50.73	49.26
Error		0.73	-0.74
Porcentajes mezclado	50	25	25
Porcentajes calculado	45.20	37.39	17.40
Error	-4.80	12.39	-7.60
Porcentajes mezclado	50	33	17
Porcentajes calculado	54.72	35.67	9.60
Error	4.72	2.67	-7.40

Tabla 4.4 Resultado de porcentajes en anticongelantes método PLSR

	Coolant	Climatizado	Concentrado
	%	%	%
Porcentajes mezclado	70	30	
Porcentajes calculado	72.22	27.77	
Error	2.22	-2.23	



Porcentajes mezclado			90	10
Porcentajes calculado			95.36	4.63
Error			5.30	-5.37
Porcentajes mezclado			50	50
Porcentajes calculado			50.73	49.26
Error			0.73	-0.74
Porcentajes mezclado		50	25	25
Porcentajes calculado		45.20	37.39	17.40
Error		-4.80	12.39	-7.60
Porcentajes mezclado		50	33	17
Porcentajes calculado		54.72	35.67	9.60
Error		-4.80	12.39	-7.60

4.2 Análisis en aceites

Para el análisis de aceites se cuidó que al momento de mezclarlos no se hicieran burbujas y que quedaran lo mas homogéneos posible, lo que resulto un poco difícil. Al final se obtuvieron resultados razonables. Puesto que los espectros de cada uno son diferentes se facilita el cálculo de las concentraciones y la identificación de espectros de fluorescencia, al igual que en los anticongelantes se muestran los resultados tal y como se obtienen de los métodos multivariables.

4.1.1 Método CLS

A diferencia de las mezclas con anticongelantes los resultados obtenidos al combinar dos tipos de aceites con espectros diferentes, el método identifica los componentes dando así un mejor resultado. Al mezclar un tercer componente se confundió el método.

Tabla 4.5 Resultado de porcentajes en aceites método CLS

	Rioliva	Patrona	Oleico
	%	%	%
Porcentajes mezclado	50	50	
Porcentajes calculado	30.15	69.84	
	-19.85	19.84	
Porcentajes mezclado	70	30	
Porcentajes calculado	73.12	26.87	
	3.12	-3.13	
Porcentajes mezclado	99		1
Porcentajes calculado	71.88		28.11
	-27.12		27.11
Porcentajes mezclado	66	16	16
Porcentajes calculado	-54.98	257.14	-102.16
	-120.98	241.14	-118.16



Porcentajes mezclado		50	33	17
Porcentajes calculado		-7.36	399.12	-291.76
Error		-57.36	366.12	-308.76

4.1.2 Método ILS

En este método se logro identificar los tres componentes de la mezcla dando así un resultado mejor que con el método CLS pero aún muy inexacto.

Tabla 4.6 Resultado de porcentajes en aceites método ILS

		Rioliva	Patrona	Oleico
		%	%	%
Porcentajes mezclado		50	50	
Porcentajes calculado		35.48	64.51	
Error		-14.52	14.51	
Porcentajes mezclado		70	30	
Porcentajes calculado		72.45	27.54	
Error		2.45	-2.46	
Porcentajes mezclado		99		1
Porcentajes calculado		87.16		12.83
Error		-11.84		11.83
Porcentajes mezclado		66	16	16
Porcentajes calculado		27.33	37.35	35.30
Error		-38.67	21.35	52.30
Porcentajes mezclado		50	33	17
Porcentajes calculado		37.84	33.20	28.95
Error		-12.16	0.20	11.95

4.1.3 Método PCA y PLSR

Para estos últimos dos métodos los resultados fueron bastante buenos, la detección de espectros no fue un gran problema como anteriormente y aunque los espectros sean similares como el caso de anticongelantes el método PCA y el PLSR pueden ser útiles y eficaces para solucionar problemas multivariados.

Tabla 4.7 Resultado de porcentajes en aceites método PCA

		Rioliva	Patrona	Oleico
		%	%	%
Porcentajes mezclado		50	50	
Porcentajes calculado		47.93	52.06	
Error		-2.07	2.06	
Porcentajes mezclado		70	30	
Porcentajes calculado		69.84	30.15	
Error		-0.16	0.15	



Porcentajes mezclado		99		1
Porcentajes calculado		94.72		5.27
Error		-4.28		4.27
Porcentajes mezclado		66	16	16
Porcentajes calculado		55.60	20.68	23.71
Error		-10.4	4.68	7.71
Porcentajes mezclado		50	33	17
Porcentajes calculado		50.43	34.70	14.86
Error		0.43	1.70	2.14

Tabla 4.8 Resultado de porcentajes en aceites método PLSR

	Rioliva	Patrona	Oleico
	%	%	%
Porcentajes mezclado	50	50	
Porcentajes calculado	47.93	52.06	
Error	-2.07	2.06	
Porcentajes mezclado	70	30	
Porcentajes calculado	69.84	30.15	
Error	-0.16	0.15	
Porcentajes mezclado	99		1
Porcentajes calculado	94.72		5.27
Error	-4.28		4.27
Porcentajes mezclado	66	16	16
Porcentajes calculado	55.60	20.68	23.71
Error	-10.4	4.68	7.71
Porcentajes mezclado	50	33	17
Porcentajes calculado	50.43	34.70	14.86
Error	0.43	1.70	2.14

4.3 Reconocimiento de Sustancias

Para el reconocimiento de sustancias a través del reconocimiento de espectros se desarrollo un programa en Labview 8.2 el cual se muestra en la figura 4.2, el programa consta de un área de direcciones donde nos muestra la ruta de la carpeta donde se encuentran las mediciones y el nombre del último archivo abierto y graficado.

Se tiene también un área de graficado en la que se pueden mostrar “n” espectros a la vez. También un área de reconocimiento, que contiene 12 indicadores: 9 para cada uno de los aceites y 3 para cada anticongelante.

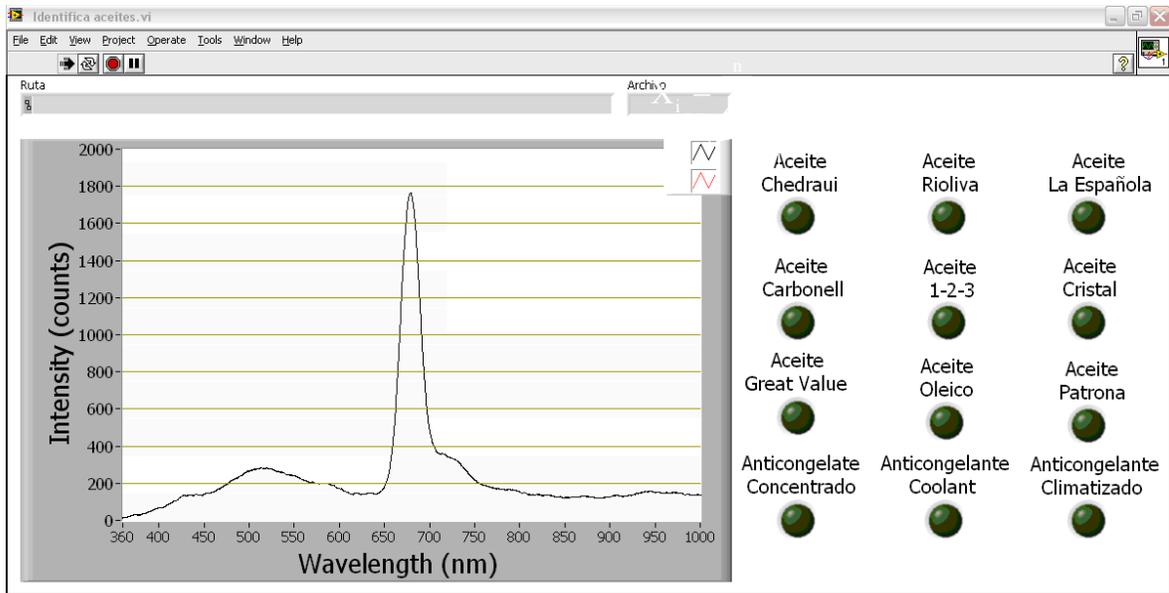


Figura 4.2 Interfaz con el usuario para el reconocimiento de sustancias e identificación de componentes.

Para el reconocimiento de componentes existen varias técnicas, en este trabajo se utilizo la de la *sumatoria* y la de *valor propio*.

En el caso de sumatoria se aplica la siguiente ecuación:

$$X_i = \sum_{j=1}^n X_{ij} \quad \dots (4.1)$$

La ecuación 4.1 establece que se tienen que sumar los valores de intensidad por cada longitud de onda del espectro X_i (para nuestro caso 400 - 1000nm). Los resultados obtenidos se grafican para observar su comportamiento y verificar que no existen valores iguales y se confunda con otro espectro.

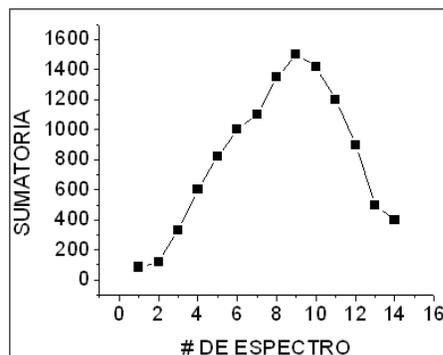


Figura 4.3 Sumatoria de cada

Para utilizar la técnica del *valor propio* se utiliza PCA o PLSR, ya que en estos métodos se calculan los *registros* y *cargas* para obtener concentraciones y de ahí se pueden obtener estos valores. Se pueden utilizar las dos técnicas juntas con el fin de poder usar alguna de ellas como criterio de decisión. En el caso de esta tesis se utilizó un parámetro más de decisión: los picos característicos en los anticongelantes (520nm) y en aceites (530nm y 670nm). Estos valores picos son únicos en cuanto a intensidad y en el caso extraordinario se puede utilizar la relación existente entre los dos picos característicos de los aceites (5:1, 1:7, etc), es decir que tan mayor es la intensidad en un pico en comparación al otro.

4.4 Identificación de componentes

En la identificación de componentes dentro de una mezcla al igual que en el reconocimiento de sustancias se utilizaron, además del *valor propio* y la *sumatoria*, el valor de intensidad de la fluorescencia en 520 nm y 680 nm. Se realizó el análisis con los espectros de anticongelantes y de los aceites.

Resultó difícil la identificación de los anticongelantes ya que sus espectros son muy similares, en cambio con los aceites esto resulto más sencillo ya que tienen características diferentes entre ellos.

El programa desarrollado en la figura 4.2 se mejoro incluyendo la identificación de componentes, por lo que el sistema es capaz de detectar los componentes individuales y de cada mezcla. En la Tabla 4.9 se muestran las características utilizadas para algunas mezclas de aceites.

Tabla 4.9 Características de algunos componentes y mezclas de aceites.

Sustancia y/o mezcla(%)	$X_i = \sum_{j=1}^n X_{ij}$ ($\times 10^2$) (conteo)	Valor Propio ($\times 10^2$) (conteo)	Intensidad a 520nm (conteo)	Intensidad a 680nm (conteo)
Oleico	9,882	2,607	1,175.43	108.18
Patrona	12,952	3,366	1,624.59	388.15
Rioliva	12,695	4,921	371.28	4,872.14
1-2-3	16,043	4,505	2,200.22	199.45
Rioliva 50 – Patrona 50	12,858	3,352	855.63	2,559.83
Rioliva 70 – Oleico 30	12,606	3,727	591.27	3,384.04
Rioliva 70 – Patrona 30	12,445	3,739	600.38	3,360.55
Rioliva 95 – (1-2-3) 5	13,352	4,705	460.08	4,532.56
Rioliva 98 – (1-2-3) 2	13,092	4,811	428.15	4,685.91
Rioliva 99 – Oleico 1	13,103	4,808	405.15	4,690.28

De acuerdo con la tabla se puede hacer un primer análisis tomando por ejemplo la SUMATORIA, de la primera columna. Se observa que no se puede distinguir el aceite Patrona de las tres primeras mezclas con aceite Rioliva. Analizando la intensidad de fluorescencia a 520nm y 680nm, se observa que los valores de las mezclas del aceite Rioliva, se aproximan al valor del aceite. Además



en ambos casos se observa que se pueden identificar los aceites Oleico, Parona y 1-2-3 del Rioliva. Después de la primera iteración, el programa desarrollado indica si se encontró un espectro con características similares al aceite Rioliva.

Cabe señalar que si se desea se puede empezar a analizar con la intensidad en 680nm y apoyarse en algún caso con la intensidad en 520nm. Si se desea analizar por sumatoria ó valor propio es recomendable tener la comparación respecto a las intensidades. Por ejemplo en las ultimas tres mezclas nos predice que en ellas se encuentra el aceite Patrona lo cual es falso.

Una vez reconocido el primer espectro, al aplicar alguno de los métodos multivariados (de preferencia el PCA y PLS), el programa indica la concentración dentro de la mezcla de ese espectro y procede a calcular un posible segundo componente. Entonces se calcula la diferencia entre las intensidades del espectro de la mezcla, lo que genera la cantidad proporcional del aceite encontrado. Una vez realizado el calculo anterior se procede a multiplicarlo por $(1 / (100 - C_1))$. Por ejemplo en la mezcla "Rioliva 95 – (1-2-3) 5" el residuo es idealmente de un 5%, este valor nos dice que el espectro resultante equivalente al 5% restante de la mezcla tienen que amplificarse 20 veces para obtener un 100% con lo que se puede entonces comparar con los otros espectros para poder encontrar el segundo aceite.

Este procedimiento continúa hasta que no encuentre algún espectro parecido. El programa fue capaz de detectar componentes principalmente de los aceites (por su diferencia entre los espectros) hasta con un mínimo de concentración del 2% y por lo tanto un máximo de 98%. En el caso de la mezcla "Rioliva 99 – Oleico 1" el sistema nos dice que prácticamente es Aceite Rioliva. Otro ejemplo de la toma de decisiones en el ejemplo es la de la mezcla "Rioliva 50 – Patrona 50" ya que al analizarlo ahora con el método del valor propio nos dice que el primer aceite identificado es el Patrona, por lo que al calcular su concentración dentro de la mezcla y calcular algún nuevo componente arroja un resultado que se confunde con la sumatoria del aceite Oleico, lo único que lo resuelve es la intensidad a 680nm (ya que la intensidad calculada es similar a la del aceite Rioliva), por lo que se utilizó como criterio principal la intensidad a 520nm y a 680nm.

REFERENCIAS

- [4.1] R. Brereton, "Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant", Wiley England Edition, 2003.
- [4.2] T. Davies, T. Fearn, "A very simple multivariate calibration [Lesson 4 of matrix algebra (matrix inversion)]", University College London, 2000.



Capítulo 5

CONCLUSIONES



Después de hacer las mediciones de cada una de las sustancias se observo que la fluorescencia de los anticongelantes aparece entre 520-530 nm. En los aceites la fluorescencia es más intensa a longitudes de onda alrededor de 520 y 680 nm.

En cuanto a los aceites, los espectros de los llamados aceites puros de oliva o extra vírgenes son similares y se centran alrededor de los 680 nm; los espectros de los llamados aceites refinados tienen su pico característico alrededor de los 520 nm.

Con los anticongelantes se lograron con facilidad mezclas homogéneas, lo que facilitó la medición del espectro, en cambio con los aceites se tuvo que tener cuidado de no hacer burbujas y, debido a las diferentes densidades de estos, trabajar un poco más en la preparación de estas.

Cuando los espectros de las componentes de una sustancia son similares los métodos multivariantes utilizados son poco exactos, por lo que se necesita establecer una característica muy bien definida para su identificación.

Cuando las componentes de una mezcla poseen espectros de fluorescencia diferentes en su patrón o presentan picos característicos a ciertas longitudes de onda, la identificación y establecimiento de su proporción por los métodos multivariantes es muy eficaz. Esto se pudo demostrar para el caso de la adulteración del aceite de oliva con aceites refinados de bajo valor comercial.

El sistema y software implementado en este trabajo de tesis tiene la ventaja de que, a diferencia de equipo convencional de espectroscopía, puede ser usado para realizar mediciones in situ y en tiempo real.



RECOMENDACIONES PARA TRABAJO A FUTURO

En esta tesis se requirió de mucho trabajo programación, las mejoras en este terreno pueden ser muchas ya que existen numerosas formas de mejorar un software.

En los métodos de PCR y PLSR se obtuvieron los mismos resultados. Habría que investigar si se necesitan métodos más robustos de cálculo y/o la implementación de nuevas técnicas de preprocesamiento de datos para identificar diferencias entre ellos.

Para en la identificación de sustancias y componentes es necesario investigar una mejor técnica para obtener un menor error en el proceso de identificación cuando las sustancias tienen espectros similares, así como buscar algunas características extras en los espectros para que sea mas rápida la ejecución del programa.

El tamaño del sistema, el tiempo de respuesta de este en la toma de los espectros de fluorescencia y el corto tiempo de procesado que se puede lograr para emitir un diagnóstico, permite su transportación para la realización de mediciones in situ y en tiempo real. Si el sistema se implementa con la electrónica apropiada este puede alimentarse completamente desde una Lap-top para hacer estudios de campo. Así resulta muy recomendable ampliar la aplicación del sistema al estudio de otras sustancias como por ejemplo aguas contaminadas en ríos, presas, lagunas y hasta en suministros de aguas potables. Las técnicas convencionales actuales requieren de mucho tiempo para la entrega de resultados y con esto podrían evitarse situaciones de daño a la salud de la población.

APENDICE A

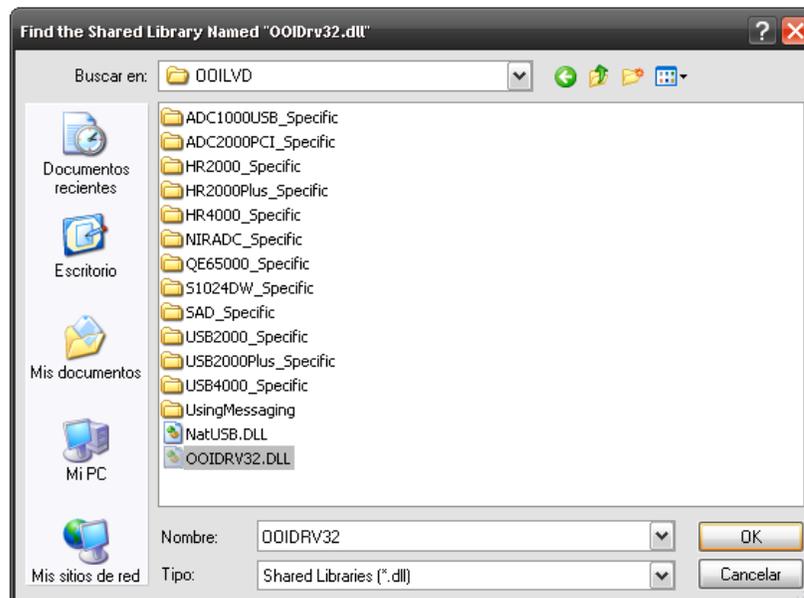
Para medir con el espectrómetro

Una vez instalado el software de LabVIEW 8.2 y las librerías para el espectrómetro ya sea el HR4000 o e USB4000 conectamos el espectrómetro y si es la primera vez que se conecta este dispositivo en algún puerto USB de la computadora abrirá un dialogo de “Nuevo Hardware Detectado” y se le da clic en instalación automática y después de unos minutos le reconoce. Entonces se procede a abrir el programa correspondiente a cada espectrómetro. Inmediatamente aparecerá una pantalla de búsqueda como la siguiente:



Cualquiera de los espectrómetros necesita de esta librería para poder trabajar por lo que se procede a buscarla dándole clic en “Browse...”, la librería esta ubicada en:

“C:\Archivos de programa\Ocean Optics\OOILVD\OOIDrv32.dll”





Una vez “cargada” la librería se puede empezar a trabajar. En la figura 2.3 de esta tesis se muestra la interfaz con el usuario en la que solo asignamos valores al “BOXCAR” y “GANANCIA” y una vez midiendo se le da clic en el botón “GUARDAR ESPECTRO” y se le asigna un nombre al archivo, lo cual se puede hacer de la siguiente manera:

- Ejemplo1.txt
- Ejemplo1.xls
- Ejemplo1

De cualquier forma se pueden leer los archivos. Al finalizar con las mediciones es recomendable no guardar los cambios.