

APLICACIÓ DE LENGÜES ELECTRÒNIQUES POTENCIOMÈTRIQUES PER AL MONITORATGE EN ELS CAMPS AGRÍCOLA, MEDIAMBIENTAL I CLÍNIC

Memòria presentada per en

Manuel Gutiérrez Capitán

per a optar al grau de doctor en Ciències Químiques



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Bellaterra, febrer de 2008

Manel del Valle Zafra, professor titular de la Universitat Autònoma de Barcelona, certifico que aquesta tesi, que porta per títol “Aplicació de llengües electròniques potenciomètriques per al monitoratge en els camps agrícola, mediambiental i clínic”, ha estat realitzada en els laboratoris del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la meva direcció.

Bellaterra, febrer de 2008

Manel del Valle Zafra

La present tesi doctoral s’ha realitzat gràcies a una beca predoctoral per a la formació de personal investigador (FI) atorgada per l’Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya.

Grup de Sensors i Biosensors

Unitat de Química Analítica

Departament de Química

Universitat Autònoma de Barcelona

Edifici Cn, 08193 Bellaterra



A la meva mare,

i a tu, Irene

ÍNDEX

Índex

Abreviatures i símbols..... 1

Resum 3

CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1 Sensors i biosensors químics..... 5

1.1.1 Sensors potenciomètrics 7

1.1.1.1 Els elèctrodes selectius a ions 7

1.1.1.2 Elèctrodes metàl·lics..... 8

1.1.2 Biosensors potenciomètrics basats en enzims 9

1.1.2.1 Biosensors potenciomètrics d'urea 12

1.1.2.2 Biosensors potenciomètrics de creatinina..... 15

1.1.3 Sistemes biparamètrics per a la determinació simultània d'urea i creatinina.... 18

1.2 Matrius de sensors i biosensors 20

1.3 La llengua electrònica 21

1.3.1 Llengües electròniques potenciomètriques..... 23

1.3.2 Altres tipus de llengües electròniques 25

1.3.3 Miniaturització de la llengua electrònica..... 27

1.4 Processament multicomponent.....	29
1.4.1 Pretractament dels senyals.....	30
1.4.2 Xarxes neuronals artificials (XNA).....	31
1.4.2.1 Antecedents: la neurona biològica.....	32
1.4.2.2 La neurona artificial o perceptró.....	33
1.4.2.3 XNAs multicapa.....	34
1.4.2.4 XNAs amb retropropagació.....	35
1.4.2.5 Sobreentrenament i Regularització Bayesiana.....	37
1.4.3 Regressió per mínims quadrats parcials (PLS).....	38
1.5 El monitoratge i el control analític.....	39
1.6 Bibliografia.....	41

CAPÍTOL 2: OBJECTIUS

CAPÍTOL 3: EXPERIMENTAL

3.1 Reactius i dissolucions.....	51
3.2 Construcció dels elèctrodes.....	52
3.2.1 Elèctrodes selectius a ions de portador mòbil.....	52
3.2.1.1 Construcció dels cossos dels elèctrodes convencionals.....	52
3.2.1.2 Preparació i deposició de les membranes.....	53
3.2.1.3 Construcció de les matrius de sensors serigrafiades.....	55
3.2.2 Biosensors d'urea i creatinina.....	57
3.2.3 Elèctrodes metàl·lics de segona espècie.....	58
3.3 Instrumentació.....	59
3.3.1 Mesures potenciomètriques al laboratori.....	59
3.3.2 Mesures potenciomètriques en camp.....	60
3.4 Metodologia de càlcul.....	63
3.4.1 Caracterització dels sensors i biosensors.....	63
3.4.2 Generació de la informació.....	67
3.4.3 Tractament de les dades mitjançant xarxes neuronals artificials.....	74
3.4.4 Tractament de les dades mitjançant la regressió per mínims quadrats parcials.....	76
3.5 Bibliografia.....	77

CAPÍTOL 4: DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

4.1 Introducció	79
4.2 Llengües electròniques per al monitoratge als hivernacles	82
4.2.1 Primera aproximació	84
4.2.1.1 <i>Primera matriu de sensors</i>	84
4.2.1.2 <i>Construcció del model de resposta basat en XNA</i>	84
4.2.1.3 <i>Aplicacions en mostres reals i a l'hivernacle</i>	88
4.2.2 Segona aproximació	91
4.2.2.1 <i>Segona matriu de sensors</i>	91
4.2.2.2 <i>Construcció del model de resposta basat en XNA</i>	91
4.2.2.3 <i>Aplicació a l'hivernacle</i>	92
4.2.3 Tercera aproximació	94
4.2.3.1 <i>Tercera matriu de sensors</i>	94
4.2.3.2 <i>Construcció del model de resposta basat en XNA</i>	96
4.2.3.3 <i>Aplicacions en mostres reals i a l'hivernacle</i>	98
4.3 Llengües electròniques per a aplicacions mediambientals	102
4.3.1 Llengua electrònica per al monitoratge de la concentració d'ions alcalins i anions en un RCTA	102
4.3.1.1 <i>Construcció del model de resposta basat en XNA</i>	102
4.3.1.2 <i>Aplicació en un RCTA</i>	106
4.3.2 Llengua electrònica per al monitoratge de la concentració d'amoni, potassi i sodi en la presa IR (Mèxic)	109
4.3.2.1 <i>Construcció del model de resposta basat en XNA</i>	109
4.3.2.2 <i>Aplicacions en mostres reals i a la presa IR</i>	110
4.3.3 Llengua electrònica per a la determinació d'ions alcalins emprant una matriu de sensors serigrafiada	113
4.3.3.1 <i>Caracterització dels sensors serigrafiats</i>	113
4.3.3.2 <i>Construcció del model de resposta basat en XNA</i>	115
4.3.3.3 <i>Aplicacions en mostres sintètiques i mostres reals</i>	116
4.3.3.4 <i>Implementació en un sistema de flux</i>	118
4.4 Llengües electròniques basades en matrius de biosensors.....	121
4.4.1 Llengua electrònica per a la determinació d'urea i ions alcalins en mostres clíniques.....	121

4.4.1.1	<i>Caracterització dels biosensors d'urea</i>	122
4.4.1.2	<i>Construcció dels dos models de resposta: XNA i PLS</i>	123
4.4.1.3	<i>Aplicació dels models en mostres reals</i>	127
4.4.2	Llengua electrònica per a la determinació d'urea, creatinina i ions alcalins en mostres clíniques	129
4.4.2.1	<i>Caracterització dels biosensors de creatinina</i>	129
4.4.2.2	<i>Construcció del model de resposta basat en XNA</i>	130
4.4.2.3	<i>Aplicació en mostres reals</i>	131
4.5	Bibliografia	133

CAPÍTOL 5: CONCLUSIONS GENERALS

CAPÍTOL 6: ARTICLES PUBLICATS

I. Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples.

Biosensors and Bioelectronics, 22 (2007) 2171-2178

Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle

II. Application of a potentiometric electronic tongue to fertigation strategy in greenhouse cultivation.

Computers and Electronics in Agriculture, 57 (2007) 12-22

M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle

III. Remote environmental monitoring employing a potentiometric electronic tongue.

International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 88 (2008) 103-117

Manuel Gutiérrez, Juan Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Lorenzo Leija, Pablo Rogelio Hernández, Liliana Favari, Roberto Muñoz, Manuel del Valle

IV. Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples.

Biosensors and Bioelectronics, 23 (2008) 795-802

Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle

ANNEXOS

V. Electronic tongue for the determination of alkaline ions using a screen-printed potentiometric sensor array.

Microchimica Acta, acceptat octubre de 2007, doi: 10.1007/s00604-007-0894-9

Manuel Gutiérrez, Víctor M. Moo, Salvador Alegret, Lorenzo Leija, Pablo R.

Hernández, Roberto Muñoz, Manuel del Valle

VI. Nutrient solution monitoring in greenhouse cultivation employing a potentiometric electronic tongue.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, en revisió

M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle

ABREVIATURES I SÍMBOLS

Abreviatures i símbols

α	velocitat d'aprenentatge
β	moment
a_i	activitat de l'ió i
BBPA	adipat de bis(1-butilpentil)
BBTP	bis(bis(4-1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil)fosfat de calci
CE	conductivitat elèctrica
CINVESTAV	Centro de Investigación y Estudios Avanzados
CMDMM	malonat de bis[(12-corona-4)metil]-2-dodecil-2-metil
DBP	ftalat de dibutil
DBS	sebacat de dibutil
DFC	disseny factorial complet
DFF	disseny factorial fraccionat
Dibenzo	dibenzo-18-corona-6
DOPP	fenilfosfonat de dioctil
DOS	sebacat de dioctil
E	potencial de l'elèctrode

EDAC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
ESI	elèctrode selectiu a ions
FIA	anàlisi per injecció en flux
KpCIPB	tetrakis[4-clorofenilborat] potàssic
ICP-OES	espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament
IR	presa Ignacio Ramírez
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària
ISFET	transistor d'efecte de camp sensibles a ions
LD	límit de detecció
NPOE	o-nitrofeniloctileter
PLS	regressió per mínims quadrats parcials
PRESS	suma dels quadrats dels errors de predicció
PVC	clorur de polivinil
PVC-COOH	clorur de polivinil carboxilat
r	correlació dels punts
RB	regularització bayesiana
RCTA	reactor continu de tanc agitat
RMSE	arrel de l'error quadràtic mig
TDDA	tridodecilamina
TDMAC	clorur de tridodecilmetilamoni
THF	tetrahidrofuran
TOAB	bromur de tetraoctilamoni
TOAN	nitrat de tetraoctilamoni
TRIS	tris(hidroximetil)aminometà
XNA	xarxa neuronal artificial

RESUM

Resum

Els sensors químics tenen avui dia un renovat interès degut a les creixents necessitats actuals de la societat de disposar de més i millor informació analítica. No obstant, la manca de sensors ideals específics per a una espècie determinada va portar al nostre grup d'investigació a explorar les possibilitats de les llengües electròniques. Aquests sistemes analítics, bioinspirats en el sentit del gust, consideren un conjunt o matriu de sensors i/o biosensors amb selectivitat creuada, i no un únic sensor. La rica i abundant informació obtinguda és posteriorment tractada amb eines de calibratge multivariable, com les xarxes neuronals artificials (XNA) o la regressió per mínims quadrats parcials (PLS, de l'anglès *Partial Least Squares*), per a extreure la informació analítica útil.

La present tesi doctoral va començar enfocada en el desenvolupament, per primera vegada al grup, de llengües electròniques potenciomètriques basades en matrius de biosensors. Concretament, es va construir una llengua electrònica per a la determinació simultània d'urea, NH_4^+ , K^+ i Na^+ en mostres clíniques. Es van fabricar i caracteritzar primer diferents biosensors d'urea basats en l'enzim ureasa i, un cop demostrada la seva idoneïtat per a ser implementats en una matriu, es van construir dos models de resposta diferents basats en XNA i PLS, respectivament. Els resultats obtinguts van mostrar una millor capacitat de predicció en el cas

del model amb XNA, aconseguint determinar la urea sense necessitat d'eliminar les interferències alcalines.

Amb l'experiència adquirida amb aquest primer sistema, es van iniciar i continuar altres aplicacions de les llengües electròniques potenciomètriques, les quals van servir per a abordar tres requisits clau per als sistemes sensors: petites dimensions, baix cost i generació d'informació en temps real i *in-situ*. Pels dos primers aspectes, es va considerar la fabricació de matrius integrades de sensors potenciomètrics mitjançant la tècnica serigràfica (*screen-printing* en anglès), que permet la miniaturització i la producció massiva, en col·laboració amb un grup del *Centro de Investigación y Estudios Avanzados* (CINVESTAV) de Mèxic. Aquesta matriu serigrafiada va servir per a desenvolupar una llengua electrònica per a la quantificació simultània dels ions NH_4^+ , K^+ i Na^+ en mostres mediambientals, concretament de la presa mexicana *Ignacio Ramírez* (IR). El model de resposta basat en XNA va mostrar bons resultats en la determinació dels tres cations en mostres sintètiques i mostres reals, tot i que no va ser possible quantificar l'ió sodi degut a la complexa matriu de l'aigua de la presa. Pel tercer aspecte considerat, es va proposar l'ús per primera vegada d'una llengua electrònica per al monitoratge *on-line* de la composició de la solució nutritiva d'un hivernacle hidropònic, gràcies a una col·laboració amb investigadors de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) de la Generalitat de Catalunya. Es van realitzar tres aproximacions, amb els seus respectius seguiments en camp, amb la idea d'optimitzar una llengua electrònica per a la determinació simultània i en temps real dels ions fertilitzants NH_4^+ , K^+ , NO_3^- i PO_4^{3-} , i els ions salins Na^+ i Cl^- . Els resultats obtinguts van ser prou interessants com per seguir treballant en el tema. A més, es va explorar l'aplicabilitat de dos diferents llengües electròniques en el monitoratge mediambiental *in-line* amb transmissió de dades per radiofreqüència, també en col·laboració amb el grup del CINVESTAV. La primera d'elles per a la determinació simultània i en temps real dels ions NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Cl^- i NO_3^- en un reactor continu de tanc agitat (RCTA) que simulava les condicions de biodegradació naturals, i la segona, per a la determinació simultània i en temps real dels cations NH_4^+ , K^+ i Na^+ en la presa IR. Els bons resultats obtinguts van permetre demostrar l'aplicabilitat de les llengües electròniques desenvolupades com a sistemes de mesura remota en aplicacions mediambientals. En totes aquestes aplicacions en camp, es va posar especial èmfasi en corregir l'efecte de la temperatura i les derives de la resposta dels elèctrodes.

Finalment, després d'haver treballat en aquests temes i per tal de tornar a la línia de recerca inicial, es va desenvolupar amb èxit una nova llengua electrònica amb biosensors per a la quantificació d'urea, creatinina, NH_4^+ , K^+ i Na^+ en mostres clíniques. En aquest cas els biosensors de creatinina desenvolupats estaven basats en l'enzim creatinina deiminasa i el model de resposta, que estava basat en XNA, va permetre la determinació simultània de les cinc espècies, deixant el sistema a punt per a passar a estudis en hospitals.

CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ GENERAL

Capítol 1

Introducció general

1.1 Sensors i biosensors químics

Un sensor es pot definir com un dispositiu analític que permet fer mesures de paràmetres físics, químics o biològics, i que es caracteritza per la seva simplicitat, per tenir petites dimensions, un baix cost i per ser capaç de generar informació en temps real. Una particularitat dels sensors és que integren la majoria d'etapes dels procediments analítics tradicionals, reduint-les a dues: el reconeixement i la transducció. En el cas dels sensors químics, l'element que es reconeix és un analit, pel qual són selectius.

Idealment, els sensors químics estan formats per dues parts ben diferenciades (Figura 1.1). La primera és l'element de reconeixement o receptor, que és el responsable de la interacció selectiva amb l'analit, fruit d'on sorgeix el senyal primari, i la segona és el transductor, que converteix aquest senyal primari en un senyal processable (senyal secundari), generalment del domini elèctric. Segons el domini del senyal primari, els sensors químics es poden classificar en elèctrics, electroquímics, òptics, tèrmics o

màssics. Finalment el senyal secundari és amplificat, condicionat, processat i presentat en forma de dada.

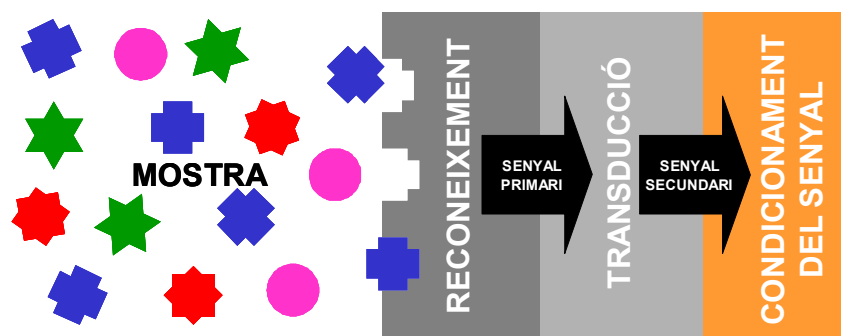


Figura 1.1 Diagrama esquemàtic del funcionament d'un sensor químic.

Els sensors electroquímics tenen l'avantatge respecte la resta de sensors químics que subministren directament un senyal del domini elèctric, el qual és fàcil de processar per mètodes electrònics, de manera que no es necessiten equips sofisticats, i s'utilitza instrumentació molt típica del laboratori (potenciòmetres i potenciostats). A més, els sensors electroquímics en molts casos es poden fabricar amb tècniques de producció en sèrie per la qual cosa tenen un cost molt baix i es poden comercialitzar com dispositius d'un sol ús.

Existeixen principalment dues categories ben diferenciades de sensors electroquímics. En primer lloc els sensors potenciomètrics, amb especial rellevància dels elèctrodes selectius a ions (ESIs) i també dels transistors d'efecte de camp sensibles a ions (ISFETs, de l'anglès *Ion Selective Field Effect Transistor*), que tenen un potencial de membrana com a origen del senyal primari. L'altra categoria la formen els sensors amperomètrics, en la seva forma d'elèctrodes modificats químicament, que tenen com a senyal primari la intensitat o corrent d'una reacció electroquímica. Per últim, només nombrar un altre tipus de sensors electroquímics, els sensors impedimètrics. Aquests es basen en la mesura de la intensitat de corrent elèctric a diferents freqüències a través d'una cel·la electroquímica a la qual s'aplica un potencial altern de petita amplitud[1].

Parlem de biosensor quan el dispositiu incorpora material biològic en la seva estructura, en contacte o integrat amb un transductor de la senyal (sensor), amb la finalitat de conferir al sistema una sensibilitat específica per a un analit determinat.

1.1.1 Sensors potenciomètrics

Els sensors potenciomètrics tenen els seus fonaments en el potencial elèctric que es genera a la superfície d'un sòlid al estar en contacte amb una dissolució amb ions que poden interaccionar bescantiant-se amb els de la superfície. L'activitat d'aquests ions en la solució, que ve a ser una concentració efectiva, està relacionada directament amb la magnitud d'aquest potencial mitjançant l'equació de Nernst. A la pràctica, aquest potencial és mesurat com a diferència entre dos elèctrodes d'una cel·la, un indicador i un de referència, en condicions de corrent pràcticament nul[2] (Figura 1.2).

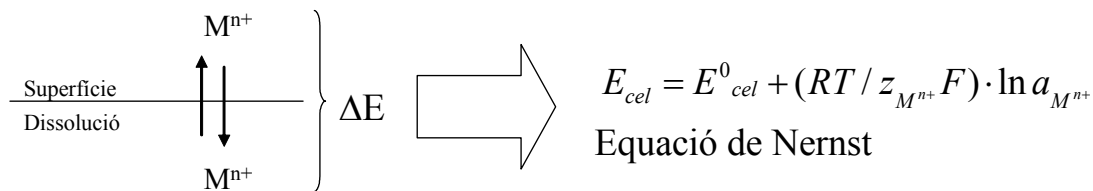


Figura 1.2 Esquema bàsic de funcionament d'un sensor potenciomètric.

on ΔE és el potencial que es genera com a conseqüència del bescanvi d'ions, E_{cel} , el potencial de la cel·la, E_{cel}^0 , el potencial estàndard de la cel·la, R és la constant del gasos ($8.314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T és la temperatura absoluta en kelvin (K), F és la constant de Faraday ($9.6485 \cdot 10^4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$), $z_{M^{n+}}$ és la càrrega de l'ió M^{n+} implicat i $a_{M^{n+}}$ és l'activitat de l'ió M^{n+} implicat en el procés.

1.1.1.1 Els elèctrodes selectius a ions

Els ESIs, que són el tipus fonamental de sensor potenciomètric, basen el seu funcionament en una membrana que separa dues fases i que interacciona amb un ió. El mecanisme de reconeixement es basa en una reacció d'equilibri a la superfície del sensor que, per tant, ha de tenir alguna substància que pugui reaccionar de forma reversible i selectiva amb l'analít. Al posar en contacte aquesta superfície amb una solució que conté l'ió al qual la membrana és selectiva, es produeix un bescanvi d'ions que produeix una separació de càrregues al llarg de la interfície membrana-solució i

l'aparició d'un potencial interfacial, el potencial de membrana. La Taula 1.1 mostra la classificació que fa la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) d'aquest tipus de dispositius segons el tipus de membrana que utilitzen.

Taula 1.1 Classificació IUPAC dels elèctrodes selectius a ions[3].

Elèctrodes Selectius a Ions (ESIs)					
PRIMARIS				COMPOSTOS	
MEMBRANA CRISTAL·LINA		MEMBRANA NO CRISTAL·LINA			
Membrana Homogènia	Membrana Heterogènia	Matriu Rígida	Portador Mòbil	Sensibles a Gasos	Basats en enzims

Els elèctrodes de membrana cristal·lina són aquells que contenen ions mòbils i els contraions fixos, destacant l'elèctrode de fluorur (membrana homogènia de monocristall de LaF_3). Dels ESIs amb membrana no cristal·lina destaca l'elèctrode de vidre sensible al pH (de matriu rígida) i els versàtils ESIs de portador mòbil, també anomenats de membrana líquida.

En aquest últim tipus de dispositius, la selectivitat de la membrana ve donada per la presència en el seu si d'un element de reconeixement o ionòfor. En la versió moderna, els ESIs de portador mòbil estan basats en una matriu de suport de tipus polimèrica, principalment clorur de polivinil (PVC), on es troben integrats l'element de reconeixement i un solvent mediador o plastificant, que confereix a la membrana la seva consistència plàstica. L'element de reconeixement o ionòfor és un agent complexant capaç d'interaccionar reversiblement amb els ions. En funció de la seva càrrega, podem distingir entre portador neutre, portador carregat i parell iònic hidrofòbic[4]. Normalment, quan es treballa amb portador neutres s'han d'incorporar a la membrana certes sals lipofíliques (additius) que, entre d'altres avantatges, faciliten la transferència i l'extracció de l'ió entre ambdues fases[4].

1.1.1.2 Elèctrodes metàl·lics

Com hem vist fins ara, la majoria de sensors potenciomètrics incorporen una membrana com a principal component actiu. Els fils metàl·lics que ara passem a comentar no tenen

una membrana selectiva i han estat usats molt sovint en l'anàlisi amperomètric multicomponent[5]. En canvi, el seu ús en potenciometria ha estat molt limitat[6].

És ben sabut que el potencial d'equilibri d'un elèctrode metàl·lic depèn de la concentració del seu ió primari en solució, segons estableix la llei de Nernst. Aquest tipus d'elèctrodes reben el nom de metall inert. Quan l'elèctrode està format no només pel metall, sinó també per una sal insoluble del metall llavors tenim el que s'anomena un elèctrode de segona espècie, ja que respon a l'anió que forma la sal insoluble. És el cas de l'elèctrode de Ag/AgCl que, a més de ser un magnífic elèctrode de referència, s'ha usat també en la determinació de clorur[7].

Per altra banda, en absència de l'ió principal, el potencial mesurat d'un elèctrode metàl·lic està determinat per diversos processos que tenen lloc alhora. És ben conegut, per exemple, que la presència de fosfat influencia el potencial de l'elèctrode metàl·lic de cobalt, mentre que altres anions (Cl⁻, NO₃⁻, acetat, etc.) no mostren el mateix efecte. Existeixen diversos mecanismes per explicar la transducció del fil de cobalt. Un d'ells proposa la formació d'òxids de cobalt sobre la superfície de l'elèctrode. Les cavitats generades en aquesta fase poden encabir l'ió dihidrogenfosfat (H₂PO₄⁻), conferint selectivitat a l'elèctrode[8]. Altre estudi demostra que el fil de cobalt respon a fosfat a través d'un complex mecanisme de potencials mixts associats a la lenta oxidació del cobalt metàl·lic i la reducció simultània de l'oxigen i el Co²⁺ a la superfície de l'elèctrode[9]. Finalment, un últim mecanisme relaciona els dos anteriors i conclou que l'ió H₂PO₄⁻ dissol l'òxid de cobalt que es forma, facilitant així el procés de corrosió que controla la resposta de l'elèctrode metàl·lic en medi aquós[10]. No obstant, el cert és que cap d'aquests mecanisme explica en la seva totalitat el comportament electroquímic del fil de cobalt i la seva selectivitat cap el fosfat. En qualsevol cas, els elèctrodes de cobalt han estat proposats com a elements per al monitoratge de fosfat, emprats sobretot com a detectors en sistemes d'anàlisi per injecció en flux (FIA, de l'anglès *Flow Injection Analysis*)[11].

1.1.2 Biosensors potenciomètrics basats en enzims

Es tracta d'un tipus d'ESI compost, ja que utilitzen dues membranes, la selectiva a ions i una addicional, de naturalesa enzimàtica, selectiva a molècules d'origen biològic. És possible, doncs, transformar un sensor potenciomètric d'ions en un biosensor, aportant

la selectivitat d'un enzim per al reconeixement de l'analít. Normalment, un enzim no serà un bon element electroactiu potenciomètric, és a dir no actua com a portador. La manera d'acoblar els dos principis és combinant la reacció enzimàtica amb la detecció potenciomètrica, en un dispositiu compost o en etapes. Per això, en el disseny, l'analít, que és un substrat enzimàtic, reacciona amb l'enzim en una primera etapa, i, en una segona, els productes de la reacció enzimàtica són detectats gràcies a l'ús d'un ESI adequat[12]. A la Figura 1.3 s'ha esquematitzat aquest funcionament.

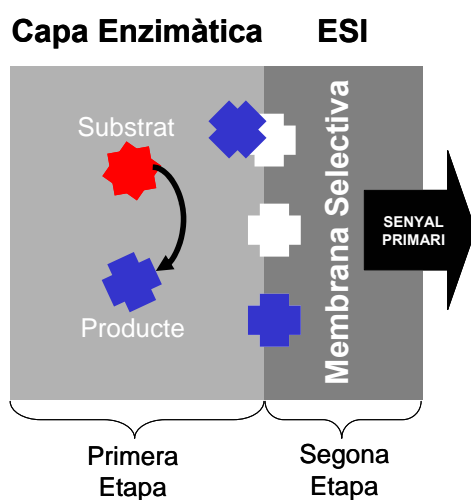


Figura 1.3 Esquema bàsic de funcionament d'un biosensor potenciomètric basat en enzims.

Com s'observa en la Taula 1.2, la majoria d'enzims usats en biosensors potenciomètrics són hidrolases que catalitzen la descomposició dels substrats. En alguns casos, existeixen diverses possibilitats d'acoblament per a la determinació d'un mateix substrat, com és el cas de la urea.

Taula 1.2 Exemples de configuracions de biosensors potenciomètrics per diferents substrats amb el transductor ESI necessari en cada cas.

Substrat	Enzim	ESI utilitzat
Urea	Ureasa	NH_4^+
Urea	Ureasa	pH
Creatinina	Creatinina deiminasa	NH_4^+
Penicilina	Penicilinas	pH
Glucosa	Glucosa oxidasa	I^-
Amigdalina	β -Glucosidasa	CN^-
L-Arginina	Arginina descarboxilasa	CO_2

Per a la immobilització de la capa enzimàtica sobre l'ESI transductor, a la bibliografia trobem diverses possibilitats:

- Adsorció física sobre el transductor.
- Entrecreuament (*crosslinking* en anglès), mitjançant un reactiu bifuncional com el glutaraldehid.
- Atrapament físic o encapsulació en matrius de gels, per exemple de poliacrilamida.
- Retenció amb membranes de diàlisi, per exemple d'acetat de cel·lulosa.
- Enllaç covalent directe al transductor.

A la Taula 1.3 es comparen diferents biosensors d'urea segons el mètode escollit per immobilitzar la ureasa:

Taula 1.3 Comparació de les propietats dels diferents biosensors potenciomètrics d'urea segons el tipus d'immobilització de la ureasa.

Mètode d'immobilització	Sensibilitat (mV/dèc)	Rang Lineal (M)	Temps de Vida	Ref.
Adsorció física	35	-	Pocs dies	[13]
Entrecreuament	50 - 52	$10^{-3} - 10^{-1}$	Poques hores	[14]
Atrapament	55	-	Pocs dies	[13]
Retenció	47.6 - 36.6	$10^{-4} - 10^{-2}$	Un Mes	[15]
Unió Covalent	55	$10^{-4} - 2 \cdot 10^{-2}$	Més de 40 dies	[13]

L'enllaç covalent directe a la membrana sensora és el que dona els millors resultats en quant a sensibilitat i temps de vida, ja que proporciona superfícies sensores molt estables a canvis de pH, temperatura i força iònica. L'estabilitat en la resposta durant el temps de treball és una característica necessària dels biosensors que es volen desenvolupar pensant en la seva posterior implementació en una matriu de sensors d'una llengua electrònica. És per això que, en aquest treball, s'ha optat per la unió covalent directe de l'enzim a la membrana sensora com a mètode d'immobilització.

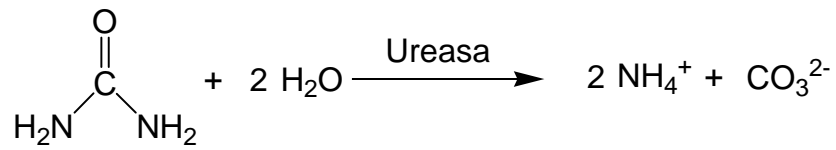
1.1.2.1 Biosensors potenciomètrics d'urea

La determinació d'urea té nombroses aplicacions. En la indústria farmacèutica, a on la urea s'usa com a component en moltes formulacions i el seu contingut ha de ser controlat estrictament. En la indústria alimentària, el control de la qualitat dels aliments inclou la determinació d'urea, com en el cas de la llet fresca. La producció de fertilitzants i la protecció del medi ambient són altres aplicacions. Per exemple, la presència d'urea en aigües superficials o subterrànies evidencia una contaminació amb aigües residuals. A més, el nivell d'urea permet estimar quan es va produir l'abocament. Però l'aplicació més important de la determinació d'urea és en l'anàlisi clínica. La urea és el principal producte de rebuig del metabolisme de les proteïnes. De fet, prop del 95 % del nitrogen proteic és metabolitzat a nitrogen ureic. La urea es forma al fetge i és transportada per la sang fins als ronyons, on és filtrada i passa a formar part de l'orina. Com a producte final del metabolisme, la urea és un factor important per a avaluar el funcionament dels ronyons[16]. El nivell elevat d'urea en sang s'anomena azotèmia. Quan els nivells en sang són molt elevats degut a una disfunció renal severa, la malaltia s'anomena urèmia i el seu tractament passa per l'hemodiàlisi, la diàlisi peritoneal o, en els casos més greus, el trasplantament del ronyó. En el procés d'hemodiàlisi es posa en contacte la sang del pacient amb un líquid d'igual pH i força iònica a través d'un filtre que permet el pas de petites molècules. Així les toxines passen de la sang al líquid d'hemodiàlisi degut a un gradient de concentracions entre els dos costats del filtre. En la diàlisi peritoneal la membrana peritoneal que envolta l'intestí actua com a membrana semipermeable natural. S'introdueix el líquid de diàlisi a través d'un catèter en la cavitat abdominal del pacient i es produeix l'intercanvi de toxines pel mateix principi. Tot i que la concentració d'urea és molt dependent de la dieta (més específicament, de la ingesta de proteïnes), a la Taula 1.4 es mostren els intervals en que pot trobar-se en diferents fluids biològics.

Taula 1.4 Concentració d'urea en diferents fluids biològics[17].

Sang			Líquids		
Nivell fisiològic normal	Azotèmia	Urèmia	Després hemodiàlisi o diàlisi peritoneal	post-diàlisi	Orina
2.5-8.6 mM	50-70 mM	120-150 mM	< 10 mM	3-16 mM	0.2-1 M

El bioreconeixement de la urea està basat en la hidròlisi d'aquest compost catalitzada per l'enzim ureasa (EC 3.1.3.5):



La ureasa és un biocatalitzador estable i que es pot trobar en preparats molt purs i amb elevada activitat enzimàtica per un preu molt econòmic. Això fa que existeixin biosensors d'urea amperomètrics, òptics, impedimètrics i màssics, encara que el nombre de biosensors potenciomètrics reportats a la literatura analítica és bastant més extens.

Així, els productes de la reacció enzimàtica defineixen clarament els tipus d'ESIs transductors que s'hauran d'usar per al desenvolupament dels biosensors. En primer lloc, es poden usar elèctrodes de pH donat que els productes de la reacció presenten propietats àcid-base i alcalinitzen el microambient que envolta la superfície del sensor de pH, causant una disminució del seu potencial. La principal desavantatge d'aquest tipus de biosensor és que la seva resposta és molt dependent de la capacitat tamponadora de les mostres a analitzar. I és que la ureasa, com la majoria d'enzims, presenta la seva màxima activitat a un pH al voltant de 7[18], per la qual cosa és convenient treballar en medi tamponat. Però l'increment de la concentració del tampó (és a dir, de la capacitat tamponadora de la solució) pot suprimir els canvis de pH provocats per la reacció enzimàtica. Com a conseqüència, la sensibilitat del biosensor es veu disminuïda i el seu límit de detecció (LD), augmentat[19]. La solució, que seria treballar amb tampons més diluïts, presenta l'inconvenient que les mesures són més sensibles al efectes no específics del pH i a la capacitat tamponadora de les mostres a analitzar. Per altra banda, l'avantatge principal aquests biosensors és que no es veuen afectats per la presència dels ions alcalins que hi ha en les mostres biomèdiques reals i que són una interferència molt important en els biosensors basats en ESIs d'amoni, dels quals parlarem tot seguit. Un recull bibliogràfic dels treballs més destacats publicats en els últims cinc anys sobre el desenvolupament de biosensors potenciomètrics d'urea basats en elèctrodes de pH es mostra a la Taula 1.5.

Taula 1.5 Resum dels treballs més destacats publicats en els últims cinc anys en el camp dels biosensors potenciomètrics d'urea basats en elèctrodes de pH.

Elèctrode de pH	Immobilització ureasa	Mostra	Tècnica especial	Referència
Elèctrode de vidre	Enllaç covalent sobre alcohol polivinílic activat	Sèrum	-	[20]
Elèctrode de vidre	Microencapsulació en sílica sol-gel	Sèrum	-	[21]
Elèctrode de RuO ₂	Atrapament físic en pasta de grafit-RuO ₂	Sèrum i orina	Fabricació per serigrafia	[22]
Elèctrode de RuO ₂	Atrapament físic en pasta de grafit-RuO ₂	Líquids post-diàlisi	Fabricació per serigrafia i anàlisi per FIA	[23]
Elèctrode de SiO ₂ /Si ₃ N ₄	Atrapament físic en alcohol polivinílic	Líquids hemodiàlisi	Tipus ISFET	[24]
Elèctrode de Al ₂ O ₃	Entrecreuament	Líquids diàlisi peritoneal	Tipus ISFET	[25]

Els ESIs d'amoni modificats enzimàticament constitueixen el segon gran grup de biosensors d'urea aplicats en l'anàlisi biomèdica. La principal avantatge d'aquests biosensors és que la seva resposta no es veu afectada per la capacitat tamponadora del medi. Això els fa útils en l'anàlisi de qualsevol tipus de mostra biomèdica. No obstant, els ESIs d'amoni basats en l'antibiòtic ionofòric nonactina sí que presenten una gran interferència dels ions alcalins. El problema rau en el fet que els ESIs en general no són específics, sinó que presenten una bona selectivitat a un ió però amb certa resposta també a d'altres ions[26]. Per extensió, podem dir que els biosensors potenciomètrics que usen com a transductor un ESI també es veuen afectats per aquestes interferències. Els coeficients de selectivitat potenciomètrica[27] per a potassi i sodi estan en aquest cas per sobre de 10^{-1} i 10^{-3} , respectivament[28]. Però la major interferència d'aquests biosensors és l'amoni endogen. A la Taula 1.6 es mostren les concentracions en que poden trobar-se aquestes interferències en sang i orina.

Taula 1.6 Concentracions d'amoni, potassi i sodi en sang i orina[17].

Ions	Sang		Orina
	Nivell fisiològic normal	Disfunció renal	
Amoni	0.05 mM	0.2 mM	> 10 mM
Potassi	4 mM	8 mM	> 8 mM
Sodi	140 mM	150 mM	> 150 mM

Per tant, és molt important l'eliminació d'aquestes interferències abans de fer l'anàlisi. A la literatura es troben diferents estratègies, més o menys complexes, per aconseguir-ho. Una primera opció és usar un tampó amb una concentració elevada i coneguda dels ions interferents, de manera que els aportats per la mostra a analitzar no tinguin influència sobre la resposta de l'ESI d'amoni[29]. Aquest mètode és simple però fa augmentar significativament el LD del dispositiu. Igualment simple és el mètode basat en la correcció matemàtica de la resposta del biosensor mitjançant l'equació de Nikolskii-Eisenmann[30], per la qual cosa necessitem conèixer a priori les concentracions dels ions interferents presents en cada mostra. També s'han usat, juntament amb el biosensor d'urea, elèctrodes d'amoni sense modificar enzimàticament, amb la idea d'obtenir senyals diferencials[31, 32]. Una altra opció que també s'ha reportat es basa en recobrir l'elèctrode de nonactina amb una membrana hidrofòbica permeable a gasos dins un sistema de flux[33], tot i que en aquest cas no es pot parlar de biosensor d'urea ja que la ureasa no es troba immobilitzada sobre l'elèctrode, sinó lliure en un pas previ a la detecció. Finalment, per eliminar l'amoni endogen i els ions alcalins també s'ha implementat una columna de bescanvi iònic en un sistema de flux, de manera que les interferències de la mostra a analitzar queden retingudes abans de passar pel biosensor d'urea[34].

1.1.2.2 Biosensors potenciomètrics de creatinina

La creatinina es produïda al cos per la desfosforilació de la fosfocreatina i la deshidratació de la creatina. La creatina és sintetitzada al fetge i convertida en fosfocreatina, que és una font d'energia per als músculs. La creatinina és un dels analític més significatius de l'anàlisi clínica moderna. La seva determinació en diversos fluids fisiològics és útil per a avaluar les disfuncions renals, musculars i tiroïdals. A més,

serveix per a diagnosticar infarts de miocardi aguts i per a avaluar el procés d'hemodiàlisi. El nivell de creatinina és un indicador de la massa muscular i la seva generació reflecteix una lenta renovació de les proteïnes musculars, ja que també és una reserva d'aminoàcids. Al igual que en el cas de la urea, un mal funcionament renal provoca l'augment de la concentració de creatinina en sang[16]. A la Taula 1.7 es mostren els intervals en els quals es pot trobar en diferents fluids biològics.

Taula 1.7 Concentració de creatinina en diferents fluids biològics[17].

Sang			Líquids post-dialisi	Orina
Nivell fisiològic normal	Disfunció renal severa	Disfunció renal molt greu		
0.05-0.11 mM	0.5 mM	> 1.0 mM	0.05-0.35 mM	> 2.0 mM

Pel que fa al desenvolupament de biosensors de creatinina, trobem a la bibliografia dos tipus diferents: biosensors amb detecció potenciomètrica i amb detecció amperomètrica. Pràcticament tots els biosensors amperomètrics de creatinina estan basats en un sistema de tres enzims (creatininasa, creatinasa i sarcosina oxidasa), mentre que els biosensors potenciomètrics usen un únic enzim (creatinina deiminasa). Ambdós camins es troben representats en la Figura 1.4. En el sistema amperomètric de tres enzims, es catalitza la conversió seqüencial de creatinina a creatina (hidròlisi), de creatina a sarcosina (hidròlisi) i finalment l'oxidació de la sarcosina a glicina. La detecció amperomètrica de l'oxigen consumit o del peròxid d'hidrogen generat en l'última reacció es relaciona directament amb la concentració de creatinina inicial[35]. Partint d'aquesta seqüència de reaccions, també s'han reportat sistemes adaptats a la mesura potenciomètrica amb un reactor bienzimàtic (creatininasa i creatinasa) seguit d'un biosensor d'urea[36, 25]. No obstant, aquests sistemes es veuen afectats per interferències d'espècies intermèdies de la seqüència, com la creatina o la urea endògenes, i d'altres espècies redox presents també en les mostres biomèdiques.

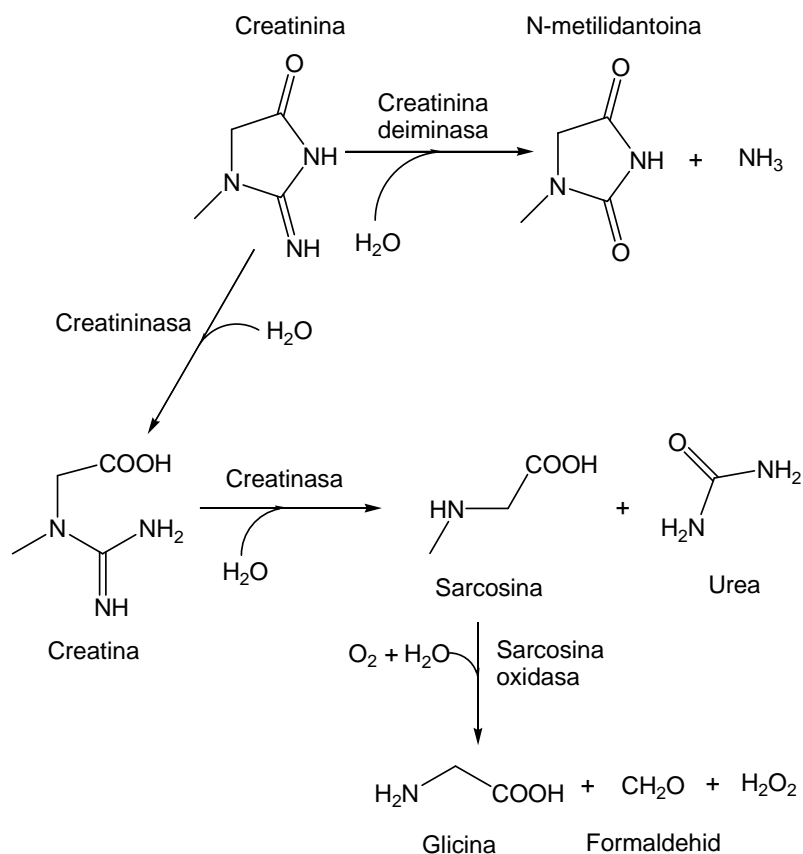


Figura 1.4 Reaccions enzimàtiques implicades en la detecció potenciomètrica i amperomètrica de la creatinina.

Els biosensors potenciomètrics monoenzimàtics són molt més prometedors per a les necessitats de l'anàlisi biomèdica. La seva operació està basada en la detecció de l'amoni i els canvis de pH que es generen en el curs de la hidròlisi del substrat per la creatinina deiminasa (creatinina iminohidrolasa, EC 3.5.4.21). En la pràctica, s'usen els mateixos ESIs transductors que en el cas dels biosensors d'urea: pH i amoni. Per tant, les limitacions i interferències, i la manera de corregir-les també són les mateixes que en el cas anterior. Un recull bibliogràfic dels treballs més destacats publicats en els últims cinc anys sobre el desenvolupament de biosensors potenciomètrics de creatinina es mostra a la Taula 1.8.

Taula 1.8 Resum dels treballs més destacats publicats en els últims cinc anys en el camp dels biosensors potenciomètrics de creatinina.

ESI transductor	Mostra	Tècnica especial	Correcció senyal	Referència
Amoni	Orina, sèrum i líquids post-diàlisi	Anàlisi per FIA	Columna de bescanvi iònic	[37]
Amoni	Mostres clíniques sintètiques	Anàlisi per FIA	Correcció amb Nikolskii-Eisenmann	[38]
Amoni	Orina	-	Matriu de sensors i PLS	[39]
pH (SiO ₂ /Si ₃ N ₄)	Líquids post-diàlisi	Tipus ISFET	-	[40]
pH (Si ₃ N ₄)	Sèrum i líquids post-diàlisi	Tipus ISFET	Optimització de la capacitat tamponadora	[41]

1.1.3 Sistemes biparamètrics per a la determinació simultània d'urea i creatinina

La majoria de tests clínics per a avaluar la funció renal estan relacionats amb la mesura de la capacitat que tenen els ronyons d'eliminar del cos productes de rebuig, normalment compostos nitrogenats com la urea i la creatinina. Per tant és molt comú determinar aquestes dues espècies en sang[42]. No obstant, la disfunció renal tindrà lloc abans que un augment significatiu d'aquests dos compostos en sang sigui detectat. Així, per realitzar una detecció precoç de les diferents nefropaties, és necessari calcular el valor de les depuracions (*clearance* en anglès) d'urea i creatinina. La depuració d'una substància A és defineix com la relació entre la massa de la substància eliminada en l'orina en un dia, i seva concentració en plasma (equació 1.1).

$$Dep(A) = \frac{[A]_0 \times V_0}{[A]_p \times 1440} \quad (1.1)$$

on $[A]_0$ és la concentració de la substància en orina, $[A]_p$ és la concentració de la substància en plasma, V_0 és el volum d'orina en mil·lilitres, recollida durant 24 hores i 1440 són els minuts d'un dia.

Els valors normals de depuració d'urea són 64-99 ml/min, i de creatinina, 78-117 ml/min, depenent de l'edat i el sexe de la persona. Un descens en la depuració de qualsevol d'aquestes substàncies indica una disfunció renal i, per això, és important

controlar ambdues[43]. No obstant, existeixen pocs sistemes biparamètrics reportats que permetin la determinació simultània d'urea i creatinina, tots ells basats en mètodes enzimàtics:

- Karube et al.[44] han utilitzat un sensor potenciomètric biparamètric d'ureasa i creatinina deiminasa i una columna cromatogràfica que permet la separació dels dos analits, urea i creatinina. La desavantatge d'aquest sistema és que el temps d'anàlisi es massa gran (més de 15 minuts).
- Matsumoto et al.[45] han desenvolupat un sistema FIA amb dos canals independents en els quals es donen les diferents reaccions enzimàtiques, i finalment detectors independents per a la determinació de cada analit.
- Rui et al.[46] també han desenvolupat un sistema FIA basat en les reaccions d'hidròlisi de la urea i creatinina fins a ió amoni. L'ió amoni generat reacciona en un reactor a on hi ha glutamat deshidrogenasa i glutamat oxidasa. L'oxigen consumit en aquesta reacció és detectat per un elèctrode d'oxigen. En aquest cas la mostra és injectada en un únic canal, que es divideix en dos: en un té lloc la reacció de la ureasa i en l'altre, la de la creatinina deiminasa. Després els canals tornen a convergir per passar pel reactor de glutamat deshidrogenasa i glutamat oxidasa, i el detector amperomètric d'oxigen.
- Jurkiewicz et al.[47] han desenvolupat un sistema FIA similar a l'anterior però amb detecció potenciomètrica mitjançant un ESI d'amoni. El disseny es va aplicar a líquids d'hemodiàlisi i plasma sanguini de pacients amb disfuncions renals. Degut a que en aquests tipus de mostres la concentració d'amoni endogen és molt més petita que la d'urea i creatinina, no es considera la seva interferència. A més el sistema incorpora una cel·la de difusió de gasos per eliminar les interferències alcalines en continu.
- Radomska et al.[34] també han usat la tècnica FIA, però amb una columna de bescanvi catiònic que neteja les mostres clíniques de l'amoni, potassi i sodi endògens. El sistema utilitza biosensors d'urea i creatinina basats en un ESI d'amoni amb els enzims immobilitzats covalentment sobre la seva membrana. El sistema és totalment automàtic, fins i tot la regeneració de la columna, obtenint una freqüència de 8-9 mostres per hora.

1.2 Matrius de sensors i biosensors

Com hem pogut comprovar en tot l'apartat anterior, la necessitat d'eliminar les interferències complica molt el sistema de mesura, perdent així l'essència dels sistemes sensors, que s'han de caracteritzar per la simplicitat i la integració d'etapes del procediment analític.

Per solucionar aquest problema existeixen varies línies de recerca obertes. La més immediata consisteix en la recerca del “sensor ideal”, específic per a una única espècie. El segon camí que es proposa en aquesta tesi és utilitzar una **matriu o conjunt de sensors i/o biosensors de selectivitat creuada**, és a dir, que responen a un cert nombre d'analits com és el cas dels ESIs, i realitzar un calibratge multivariable de les dades generades mitjançant eines de processament avançat. Bàsicament, aquesta aproximació trasllada la complexitat del problema des del camp de la química al del tractament de la informació, per la qual cosa és necessària la fusió del coneixement de diferents branques de la ciència: intel·ligència artificial, quimiometria, reconeixement de pautes, enginyeria electrònica, etc.[48]. D'aquesta manera no només s'aconsegueix determinar els analits sense la necessitat d'eliminar les interferències, sinó també quantificant aquestes simultàniament[49]. El punt crític aquí és aconseguir que les dades generades continguin la màxima informació sobre el sistema per al qual es dissenya i sobre la composició de la mostra[50]. Per tant, sembla raonable que la matriu contingui com a mínim tants dispositius com número d'espècies es vulguin determinar[51].

Addicionalment, però, aquest tipus de matrius de sensors també permet abordar problemes més complexos, a on l'objectiu no és la multideterminació de diferents espècies, sinó l'adquisició d'informació complexa, com pot ser una olor o un sabor. En el món dels sentits animals, es disposa d'un nombre limitat de receptors per flaïres i sabors primaris, i és la resposta conjunta d'aquests la que defineix una olor/sabor únic entre milers. De la mateixa manera es processa la informació en aquests sistemes, per la qual cosa es diu que estan *bioinspirats*. Quan està format per sensors de gasos, rep el nom de *nas electrònic*, i quan està format per sensors per a líquids, el de *llengua electrònica*. Fins ara, aquest tipus d'informació només era possible obtenir-la per intervenció humana, mitjançant un expert o panells sensorials.

Si a aquesta combinació de sensors no específics i eines de processament quimiomètric, afegim eines d'intel·ligència artificial, llavors obrim la porta als anomenats *sensors intel·ligents*, que no només seran capaços de determinar i monitoritzar, sinó també

d'interpretar els canvis que es produeixen i prendre decisions en conseqüència, corregint així possibles defectes d'operació[52].

A més de matrius de sensors de selectivitat creuada, existeixen **matrius de sensors redundants** i **matrius de sensors selectius**. Les primeres estan formades per sensors del mateix tipus i proporcionen un senyal replicat[53]. Aquests sistemes proporcionen un senyal mitjà amb una precisió i estabilitat més grans que el subministrat per un sensor individual. Les matrius redundants són útils per construir sistemes d'autodiagnosi, ja que si un sensor s'espatlla pot ser detectat fàcilment per anul·lar-ne la resposta. Les segones estan formades per sensors sensibles a diferents analits que, gràcies a la utilització de dispositius multicanal d'adquisició de dades, permeten la determinació simultània de diverses espècies[54]. D'aquesta manera s'aconsegueix reduir el cost de l'anàlisi, per la minimització del volum de mostra, reactius, temps d'anàlisi, etc.

Potser l'avantatge més important d'emprar matrius de sensors i biosensors és que és una de les escasses estratègies d'anàlisi que proporciona informació analítica multicomponent en temps real i simultàniament identifica i pot compensar els efectes de matriu. No obstant, per tal de gaudir d'aquest avantatge, cal que els paràmetres de resposta dels diferents sensors i biosensors romanguin estables durant el període d'ús[55].

1.3 La llengua electrònica

La classificació dels sentits humans acceptada pels neurofisiòlegs inclou cinc sentits: vista, oïda, tacte, gust i olfacte. Els tres primers són sentits físics, ja que responen a estímuls de caire físic, mentre que els últims dos són sentits químics, ja que poden percebre canvis en la composició química de l'ambient.

Recentment han hagut molts intents d'"imitar" els sentits químics[56], encara que la tasca de construir un nas o una llengua biòniques és molt complexa, ja que el mecanisme de la percepció química natural està encara sent estudiat[57, 58]. No obstant això, en els últims 25 anys s'han reportat molts treballs considerant aquesta opció. El primer treball en el que es simulava el sentit de l'olfacte va ser publicat al 1982[59]. En ell, un conjunt de sensors químics va fer el paper de receptors biològics i es van usar mètodes de reconeixement de pautes per reconèixer els diferents estímuls. Ja en el seu

dia, es va considerar el sistema desenvolupat com a una versió electrònica del sentit de l'olfacte. El terme “nas electrònic” va ser àmpliament reconegut durant la segona meitat dels anys 80 i des de llavors s'han reportat moltes diferents estratègies: òxids metàl·lics semiconductors (MOS, de l'anglès *Metal Oxide Semiconductor*)[60], polímers conductors[61] i diferents tipus de sensors piezoelèctrics[62, 63]. Aquestes matrius de sensors han estat usades junt amb diferents mètodes quimiomètrics que permeten processar la informació generada, com l'anàlisi en components principals (PCA, de l'anglès *Principal Component Analysis*), les Xarxes Neuronals Artificials (XNA), la regressió per mínims quadrats parcials (PLS, de l'anglès *Partial Least Squares*), entre d'altres[64].

En 1985 va ser presentat el primer sistema per a l'anàlisi de mostres líquides basat en una matriu de sensors[65]. El treball tractava la multideterminació simultània dels ions calci, magnesi, potassi i sodi mitjançant ESIs no específics i tractament dels senyals per PLS. No obstant, el terme “llengua electrònica” no apareix fins el 1997 de la mà de Vlasov[66]. La definició consensuada de llengua electrònica que van fer grups de recerca significatius en el tema va ser “instrument analític que inclou una matriu de sensors químics de resposta no específica i entrecreuada, combinada amb una eina quimiomètrica adequada per al processament de la informació”[67]. Poc després la IUPAC va publicar un informe on donava una nova definició: “sistema multisensor que consisteix en un conjunt de sensors de resposta poc selectiva i que utilitza procediments matemàtics avançats per al processament de la senyal basats en pautes de reconeixement i/o calibratge multivariable, com les xarxes neuronals artificials, l'anàlisi en components principals, etc.”[68].

Els primers articles sobre llengües electròniques van aparèixer en els anys 80 i 90. Des de llavors la matèria ha estat estudiada intensament i cada any apareixen més i més treballs (des dels 20 aproximadament entre els anys 1996 i 2000, fins els més de 80 només en el 2006). No obstant això, la transmissió de coneixement cap a la societat no ha comportat gaires llengües electròniques comercials (Taula 1.9), en comparació, per exemple, amb els nassos electrònics, dels quals existeixen desenes de sistemes comercialment disponibles[69, 70].

Taula 1.9 Resum de les llengües electròniques disponibles comercialment.

Empresa	Model	Matriu de Sensors	Eina de Processament	Referència
Anritsu Corp., Japó	SA402, SA402B	8 elèctrodes potenciomètrics	PCA	[71]
Alpha MOS, França	Astree	7 ISFETs	PCA	[72]
McScience, Corea	Multiarray Chemical Sensor	7 ISEs	PCA	[73]

A vegades, aquests sistemes reben el nom de sensor de tast (*taste sensor* en anglès) quan són usats per classificar segons els cinc gustos essencials (dolç, salat, àcid, amarg i umami*) i els resultats són comparats amb els del sentit humà del gust. Si bé és cert que una de les aplicacions de les llengües electròniques és classificar els productes alimentaris, els resultats no necessàriament s'han de comparar amb els dels sentits humans, sinó més aviat amb d'altres qualitats o característiques de les mostres[74].

1.3.1 Llengües electròniques potenciomètriques

Una gran varietat de sensors químics poden ser usats en el disseny de llengües electròniques: electroquímics, òptics, biosensors. No obstant, la gran majoria usen sensors potenciomètrics, especialment ESIs. Una de les principals desavantatges de les mesures potenciomètriques és la seva dependència de la temperatura. L'aproximació clàssica per minimitzar el seu efecte consisteix en treballar en condicions de temperatura constant. Això és possible quan les mesures es realitzen en l'ambient controlat del laboratori, però és més complex si l'experiment es realitza en camp. En aquests casos, l'opció és incloure la temperatura en el disseny com una variable més del sistema. Aquesta és l'alternativa que s'ha utilitzat durant la present tesi en les experiències de monitoratge. A més, els avantatges dels ESIs (principi de funcionament ben conegut, baix cost, fàcil fabricació, instruments de mesura simples, amb resposta creuada a diverses espècies i la seva semblança amb el mecanisme natural de reconeixement de molècules) els han convertit en els sensors més àmpliament emprats en llengües electròniques.

* Segons les cultures orientals, aquest cinquè gust bàsic complempla la sensació de “saborós”.

Les llengües electròniques potenciomètriques s'han usat tant en anàlisi qualitativa com quantitativa. L'objectiu de l'anàlisi qualitativa és la discriminació, classificació o identificació de mostres. Les mostres líquides en els quals s'han aplicat aquests dispositius són molt diverses, com es pot comprovar a la Taula 1.10, on s'han recollit només alguns exemples. La metodologia es basa en la mesura d'un elevat nombre de mostres i un posterior tractament de reducció de variables, com el PCA, per a generar mapes on s'agrupin aquestes mostres en funció de les seves característiques. Un cop generats i delimitats aquests grups, seria possible identificar a quin pertany una nova mostra que no ha participat en la generació dels grups, interpolant la resposta de la llengua electrònica en el model de resposta.

Taula 1.10 Alguns exemples d'aplicacions qualitatives de les llengües electròniques potenciomètriques.

Aplicació qualitativa	Referència
Classificació d'aigües minerals, tes, cerveses i cafès	[75]
Classificació de vins segons l'origen i l'anyada	[76]
Classificació de begudes alcohòliques (vodka, cognac)	[77]
Classificació de diferents tipus d'aigua embotellada, begudes de taronja i tes	[78]
Avaluació de la qualitat de la llet	[79, 80]
Discriminació de diferents tipus de sake i salsa de soja	[81, 82]
Discriminació entre diferents marques de cervesa, llet i suc de fruita	[83]
Control de qualitat de productes farmacèutics	[84, 85]
Determinar la presència de microorganismes	[86, 87]

Tot i que és menys habitual, les llengües electròniques potenciomètriques també s'han usat en l'anàlisi quantitativa, per determinar de manera simultània diferents espècies en solució. En aquest cas, la metodologia és diferent. Ara per cada multideterminació, s'haurà de seleccionar la matriu de sensors i/o biosensors adient (ha de recollir la màxima informació dels analits i de les interferències), preparar un conjunt de patrons que representin tota la variabilitat de les espècies en les mostres i en l'interval de concentracions que es vulgui treballar, realitzar-ne les mesures, entrenar la XNA o, en seu cas, calibrar el PLS, de manera que sigui un sistema intel·ligent capaç de predir mostres que no han estat processades inicialment i poder determinar així la concentració dels analits. La present tesi doctoral s'ha centrat més en la vessant quantitativa de les

llengües electròniques potenciomètriques. A la Taula 1.11 es mostren alguns exemples d'aquesta variant recollits en la literatura.

Taula 1.11 Alguns exemples d'aplicacions quantitatives de les llengües electròniques potenciomètriques.

Aplicació quantitativa	Referència
Determinació simultània de diversos metalls pesants (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} i Fe^{3+})	[88]
Determinació simultània de contaminants iònics en aigües subterrànies	[89]
Determinació de calci i de la duresa total d'aigües naturals	[90]
Determinació de lisina en mostres alimentàries, incorporant biosensors	[91]
Determinació simultània de Cl^- , NO_3^- i HCO_3^- en mostres d'aigua sintètiques i naturals	[92, 93]
Determinació simultània de NH_4^+ , K^+ i Na^+ en aigües naturals i fertilitzants líquids	[94, 95]
Determinació de creatinina en mostres d'orina, incorporant biosensors	[39]
Determinació simultània d'urea i potassi en sèrum, incorporant biosensors	[96]

1.3.2 Altres tipus de llengües electròniques

L'altra gran família de llengües electròniques està formada per matrius de sensors amperomètrics. En aquest cas, la cel·la de mesura està constituïda per tres elèctrodes: el de referència, el de treball i l'auxiliar. La reacció electrolítica té lloc a l'elèctrode de treball i la corrent flueix entre aquest i l'elèctrode auxiliar. Pel seu principi d'operació, doncs, la seva aplicabilitat està limitada a substàncies redox, capaces de reduir-se i oxidar-se.

Els sensors amperomètrics o voltamperomètrics són avantatjatsos per a l'anàlisi quantitativa multicomponent ja que presenten una alta selectivitat i sensibilitat, una elevada relació senyal/soroll, límits de detecció baixos, diversos mètodes de mesura (voltamperometria d'ona quadrada, voltamperometria de polsos, voltamperometria cíclica, etc.) i fàcil interpretació de la senyal obtinguda. No obstant, en el cas de solucions de composició complexa, les senyals poden solapar-se i donar com a resultat característiques I/V més complicades, depenent del tipus d'elèctrode. Tot i això, aquest senyal complex constitueix una "imatge" única i específica de la mostra, per la qual cosa aquest tipus de llengües electròniques són usades també en l'anàlisi qualitativa.

El tercer tipus de sensors electroquímics que poden formar part d'una llengua electrònica són els sensors impedimètrics. Les llengües electròniques impedimètriques

van aparèixer al 2003 de la mà de Riul[97] i s'han usat per aplicacions tant quantitatives com qualitatives.

Recentment, la investigació s'ha dirigit no només al desenvolupament de nous mètodes electroquímics de mesura i a l'aplicació de noves eines de tractament de les dades generades, sinó també a la recerca de nous materials sensibles a espècies químiques, com els nanotubs de carboni[98] o nous polímers conductors[99], i nous components per les membranes, com les metaloporfirines[100]. A més, també s'estan optimitzant noves tècniques per a la preparació de la capa sensible dels sensors per la seva posterior aplicació en llengües electròniques, com la tècnica serigràfica (*screen-printing* en anglès)[80, 86, 101], l'electrodeposició o l'electropolimerització[102].

Si bé les llengües electròniques basades en sensors electroquímics són les més àmpliament reportades, en els últims anys també han aparegut llengües electròniques basades en sensors òptics i en sensors màssics. Els sensors òptics basen el seu funcionament en una membrana que conté un indicador, el qual canvia les seves propietats òptiques en presència de l'analit, influenciant així l'absorbància o la fluorescència de la membrana. Els sensors màssics, en canvi, es basen en l'efecte piezoelèctric i normalment estan fabricats amb cristall de quars recobert de diversos materials sensibles a espècies químiques. A la Taula 1.12 es mostren algunes aplicacions d'aquests altres tipus de llengües electròniques.

Taula 1.12 Algunes aplicacions de llengües electròniques amperomètriques, impedimètriques, òptiques i màssiques.

Tipus de llengua electrònica	Tipus d'anàlisi	Aplicació	Referència
Amperomètrica	Qualitativa	Classificació de diferents olis d'oliva verge segons la seva amargor i acritud, incorporant biosensors	[103]
Amperomètrica	Qualitativa	Discriminació dels diferents aclarats d'una rentadora	[5]
Amperomètrica	Quantitativa	Determinació simultània de paracetamol, àcid úric i àcid ascòrbic	[104]
Impedimètrica	Qualitativa	Identificació de la presència de sucrosa, quinina, NaCl i HCl en nivells de ppb	[105]
Impedimètrica	Quantitativa	Determinació de pesticides	[97]
Òptica	Qualitativa	Anàlisi biomèdica	[106]
Òptica	Quantitativa	Quantificació de proteïnes	[107]
Màssica	Qualitativa	Reconeixement de diferents begudes refrescants	[108]

1.3.3 Miniaturització de la llengua electrònica

La miniaturització condueix a la reducció dels costos de fabricació de les matrius de sensors ja que es necessiten menys reactius químics i menys materials. En general, però la miniaturització de sistemes analítics no sempre és beneficiosa i s'han de considerar els guanys però també les pèrdues. Així hi ha alguns reptes que s'han de tenir en compte a l'hora de desenvolupar sensors miniaturitzats:

- Les dificultats de fabricació (el cost de la preparació, problemes tecnològics).
- El tractament de les mostres a analitzar.
- La durabilitat del sensor.
- El deteriorament dels paràmetres de treball.

Cada vegada que baixem un escaló més en la miniaturització, apareixen noves limitacions que a escala macroscòpica no teníem, com la evaporació dels petits volums de mostra usats, les restriccions de fabricació i problemes amb la recepció, amplificació i transducció del senyal[109].

No obstant, en el cas de les llengües electròniques el volum de mostra que comporta l'ús de matrius de sensors convencionals és molt gran i la seva reducció seria desitjable. Per això, en els últims anys han hagut molts intents per miniaturitzar la llengua electrònica. Hi ha dues possibles maneres d'aconseguir-ho: miniaturitzant els sensors individuals o desenvolupant matrius de sensors integrades. En el primer cas, existeixen molts articles reportats a la literatura que desenvolupen sensors de petites dimensions per ser incorporats en sistemes de flux[110, 83]. Altre tipus de sensor electroquímic miniaturitzat és l'ISFET[111, 112, 113]. No obstant, al llarg dels anys han hagut pocs intents per desenvolupar llengües electròniques basades en matrius de sensors integrades. La integració dels sensors és avantatjosa ja que el sistema esdevé més simple i fàcil d'operar. Normalment, la configuració d'aquestes matrius és de tipus planar i inclou capes de tintes especials o pastes dipositades seqüencialment sobre suports aïllants i químicament inerts, anomenats substrats. Segons el gruix d'aquestes capes, distingim entre les tècniques de “capa gruixuda” (*thick film* en anglès) i de “capa prima” (*thin film* en anglès). Les primeres usen mètodes de deposició serigràfics, de manera que les capes tenen un gruix típic d'entre 10 i 50 μm . Les segones dipositen les capes normalment sobre silici mitjançant evaporació química o bombardeig amb espècies

carregades. D'aquesta manera s'aconsegueixen capes de menys de 5 μm . Per tant, la resolució en aquesta última tècnica és més gran, encara que l'equipament necessari és molt més complex i costós que en el cas de la serigrafia[114]. A la Taula 1.13 es mostren els exemples més representatius de llengües electròniques basades en matrius de sensors integrades reportats en els últims cinc anys.

Taula 1.13 Exemples més representatius de llengües electròniques basades en matrius de sensors integrades reportats des del 2002.

Transductor i tècnica de deposició	Tipus d'elèctrodes	Aplicació	Referència
Ag/Pd/Pt per serigrafia (“ <i>thick film</i> ”)	Potenciomètrics basats en diferents metalls també serigrafiats	Classificació de diferents aigües naturals embotellades	[115]
Silici per mètodes microelectrònics (“ <i>thin film</i> ”)	Potenciomètrics basats en membranes de PVC	Discriminació entre vins contaminats amb SO_2 , H_2S i $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	[116]
Au per mètodes microelectrònics (“ <i>thin film</i> ”)	Potenciomètrics basats en membranes de PVC	Classificació de diferents marques de cervesa	[117]
Pasta de carboni per serigrafia (“ <i>thick film</i> ”)	Potenciomètrics basats en membranes de PVC	Classificació de diferents aigües potables, begudes refrescants i cerveses	[118]
Au per mètodes litogràfics	Amperomètrics basats en diferents materials sensibles	Discriminació entre vins adulterats amb diferents substàncies	[119]

La serigrafia ens permet la producció massiva de dispositius a un baix cost, per la qual cosa és una de les tècniques més prometedores per comercialitzar sensors. La serigrafia és una tècnica usada des de fa molts anys per la reproducció gràfica en la indústria de les arts gràfiques i també en la tèxtil, i a on la deposició s'aconsegueix pressionant la pasta amb l'ajut d'una rasqueta a través d'una malla, en la qual s'han obturat les parts per les quals no es vol deixar passar tinta. El primer pas consisteix en l'aplicació de la capa conductora. Per fer això s'usa una pantalla, que és com s'anomena al conjunt format pel marc i la malla, que es posa en contacte amb el substrat i la deposició s'obté per transferència del dibuix de la malla (Figura 1.5). Per controlar el gruix de les capes que es dipositen, es fan servir unes pel·lícules especials que es troben adherides a la

mallà. Després és necessari que els solvents s'evaporin i la pasta curi, per la qual cosa es sol posar el substrat en una estufa a temperatura elevada durant un temps. Aquests passos es repeteixen diverses vegades usant en cada cas la pasta i la màscara apropiades fins completar el disseny específic.

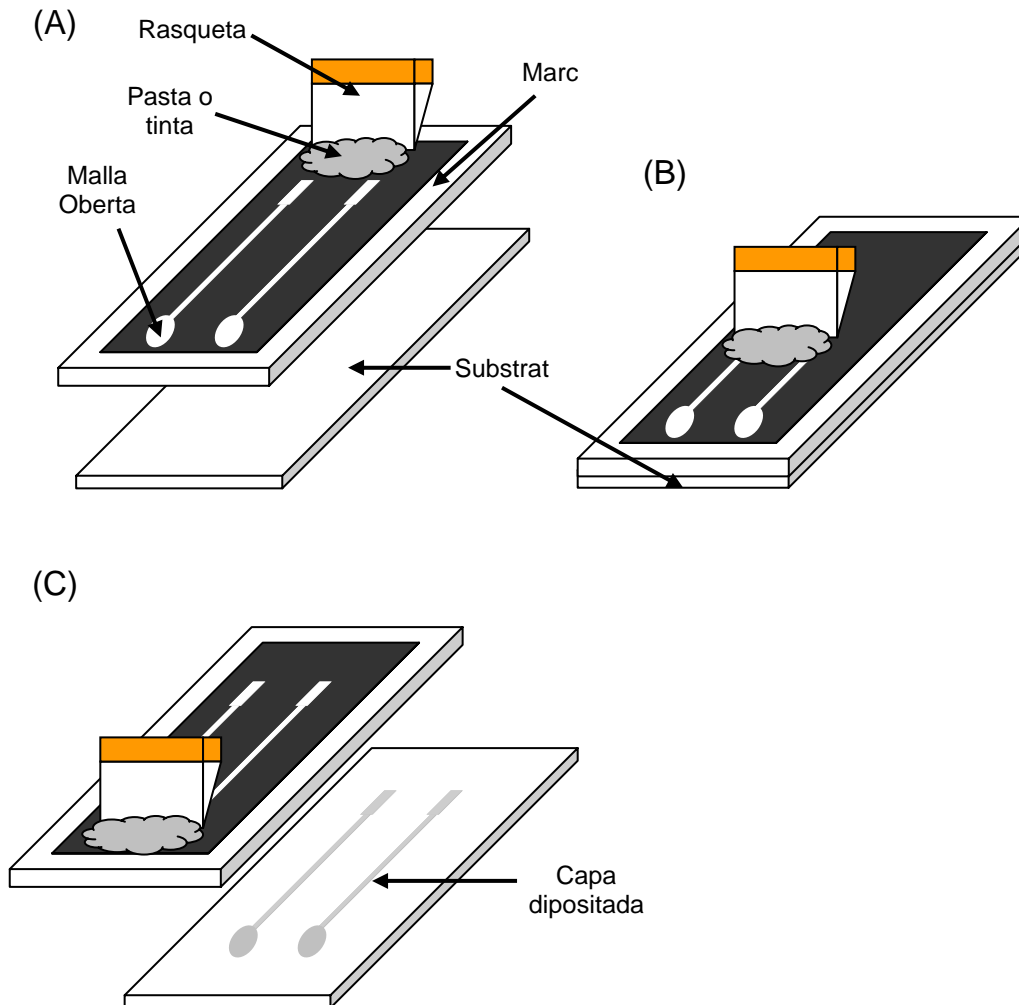


Figura 1.5 Representació esquemàtica del procés serigràfic de producció de sensors químics. (A) Marc i substrat preparats abans de dipositar, (B) procés de deposició i (C) capa dipositada en el substrat després del procés.

1.4 Processament multicomponent

Per al processament multicomponent o multivariable dels senyals obtinguts de les matrius de sensors i/o biosensors s'utilitzen eines quimiomètriques. La quimiometria és la ciència que tracta d'ajuntar els avantatges del processament mitjançant ordinadors i

els senyals d'origen químic per treure'n el màxim profit. La quimiometria té dos objectius bàsics: el disseny d'experiments i el de proporcionar la màxima informació analítica a partir de dades químiques. En la present tesi doctoral hem treballat en aquests dos aspectes.

L'objectiu principal del disseny d'experiments és planificar (dissenyar, organitzar) d'una manera òptima la seqüència d'experiències que s'han de dur a terme, de forma que es minimitzi tant el cost de l'experimentació com la influència de l'error experimental sobre la informació buscada. En la present tesi doctoral s'han dissenyat diferents seqüències, segons l'aplicació de la llengua electrònica, per definir el millor possible el domini experimental i, a la vegada, amb un nombre de mostres no massa elevat.

1.4.1 Pretractament dels senyals

La qualitat de les dades de partida és un factor a cuidar en l'anàlisi multivariable. Aquestes poden contenir soroll, error instrumental fruit de la pròpia tècnica o del dispositiu de mesura i fins i tot, error humà, que si no són corregits a temps ens poden conduir a conclusions errònies.

Un primer problema en treballar amb llengües electròniques potenciomètriques és que els sensors presenten efectes de memòria (història o histèresi) i de deriva. La IUPAC defineix la histèresi com la diferència entre el potencial observat quan l'elèctrode està en contacte amb una solució d'una concentració determinada de la substància A i el potencial mesurat en la mateixa solució després d'exposar l'elèctrode a una concentració diferent d' A . Generalment, l'error sistemàtic es produeix en la direcció de la concentració de la solució en la qual l'elèctrode estava submergit prèviament. El mateix organisme defineix la deriva com el canvi lent i no aleatori del potencial amb el temps quan l'elèctrode està en contacte permanent amb una solució de composició i temperatura constants[3]. Aquests dos fenòmens típics dels ESIs fan que els paràmetres de resposta no romanguin estables durant l'experiment, condició indispensable per a obtenir informació analítica fiable, especialment quan la mesura és en continu durant un període de temps llarg. Una manera d'abordar aquest problema és considerar el dia de mesura com una variable més del sistema. L'altra és considerar els potencials referenciats, és a dir, al potencial absolut mesurat per l'elèctrode restar-li el potencial

d'una solució de referència, de composició constant i coneguda, que s'ha mesurat amb anterioritat. D'aquesta manera es corregeix la histèresi, per que la solució de referència conté els analits en una concentració més baixa que qualsevol mostra a analitzar, i la deriva, per que afectarà de igual forma a la mostra i a la solució de referència, de manera que amb la diferència quedarà compensada.

Per altra banda, per evitar que algunes variables tinguin més pes que altres pel fet de tenir diferents unitats, com el cas del potencial (mV) i la temperatura (°C), existeixen diferents estratègies:

- Centrat: es referencien les lectures de cada sensor a la mitjana aritmètica d'aquestes.
- Estandardització: pretractament per que les dades tinguin desviació estàndard igual a la unitat.
- Autoescalat: operació resultant de la combinació del centrat i l'estandardització.
- Normalització: és l'operació utilitzada en la present tesi i consisteix a aconseguir que les dades estiguin dins l'interval [-1, 1], és a dir, que el valor mínim sigui -1 i el màxim 1. La fórmula que utilitza el programa MATLAB per fer-ho és la següent:

$$x^* = \frac{2 \times (x - \min_x)}{\max_x - \min_x} - 1 \quad (1.2)$$

a on x^* és la dada normalitzada, x és la dada original, \min_x i \max_x són el mínim i el màxim de les dades originals, respectivament.

1.4.2 Xarxes neuronals artificials (XNA)

Les xarxes neuronals són eines d'intel·ligència artificial per a la classificació i la modelització, que s'han mostrat especialment útils per al calibratge quan la relació entre el mesurand i la mesura és de tipus no lineal. Podríem definir-les com algorismes basats en una simplificació del model cerebral; no intenten copiar exactament com treballa el cervell però sí de reproduir les seves operacions lògiques ajudant-se d'unes entitats, les

neurones o perceptrons, que processen els senyals inspirant-se en com ho fan les neurones biològiques[120].

Alguns autors proposen l'ús de XNAs per al processament de dades obtingudes a partir d'una matriu d'ESIs[121, 51]. Els resultats preliminars han estat molt satisfactoris, permetent l'aplicació en anàlisis tant qualitatives com quantitatives. Per tant, la utilització de XNAs per a modelitzar les respostes entrecruades dels ESIs, a causa de l'elevada no linealitat del model subjacent, es preveu una opció factible.

1.4.2.1 Antecedents: la neurona biològica

La neurona biològica és un tipus de cèl·lula nerviosa que es troba a l'encèfal, la medul·la espinal i els ganglis, i és l'element fonamental de l'estructura del sistema nerviós animal. Un cervell humà conté uns 100000 milions de neurones (10^{11}). Està formada pel cos cel·lular o soma i diferents prolongacions:

- L'axó: per on transiten els impulsos nerviosos o potencials d'acció des del soma cap a la següent neurona. Una neurona només pot tenir un axó.
- Les dendrites: amb un número i estructura variable segons el tipus de neurona, transmeten els potencials d'acció des de les neurones adjacents cap al soma.

Al soma, els potencials que arriben per les dendrites s'integren de manera que si el potencial resultant supera un valor llindar, la neurona s'activa i produeix un potencial d'acció.

La xarxa de neurones és sempre activa i els missatges viatgen de neurona en neurona, responent a estímuls externs que arriben a través dels cinc sentits. Les connexions nervioses que s'activen per un estímulo concret que es repeteix són reforçades amb el temps, i això sembla ser la base l'aprenentatge. Salvant les diferències, aquest mecanisme és el que s'intenta reproduir en el cas d'una XNA. La XNA aprèn a base d'experiència; aportant-li informació sobre el sistema en estudi, la XNA és capaç de respondre de la mateixa manera quan es repeteixen les entrades. Aquest procés, equivalent a l'aprenentatge, s'anomena entrenament.

1.4.2.2 La neurona artificial o perceptró

És la unitat bàsica de les XNAs i, al igual que la neurona biològica, compta amb diverses connexions d'entrada i una única connexió de sortida (Figura 1.6).

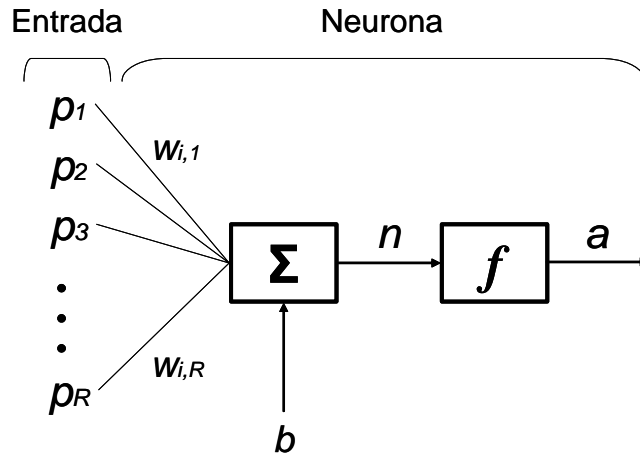


Figura 1.6 Esquema de la neurona artificial o perceptró.

Un senyal p_i , proporcionat per una entrada i , es multiplica per un pes $w_{i,R}$, de manera que cada senyal apareix a la neurona com a $w_{i,R} \times p_i$. El perceptró suma totes les senyals que entren i afegeix al resultat d'aquest sumatori un terme de tendència o biaix (b), que permet que la resposta no hagi de passar obligatòriament per l'origen. Sobre aquesta suma s'aplica una funció de transferència f , que normalment és de tipus escalar, i produeix la sortida a . A diferència del sistema biològic en el qual la resposta de les neurones és binària ("sí" supera el valor llindar o "no" el supera), l'ús de funcions de transferència contínues pot fer que els perceptrons tinguin una resposta gradual. En la Figura 1.7 es representen les funcions de transferència més emprades.

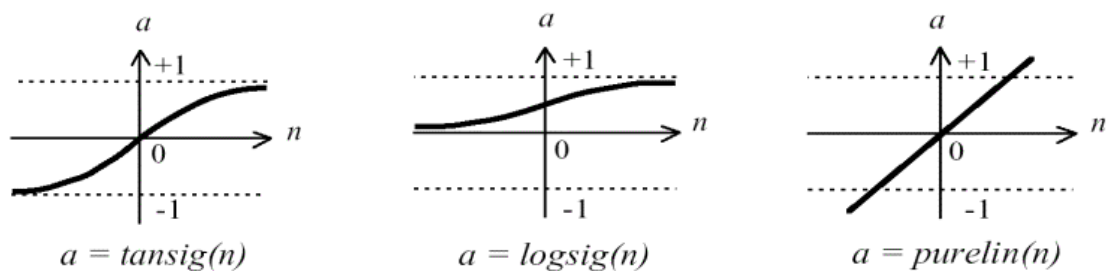


Figura 1.7 Funcions de transferència (f) més emprades.

1.4.2.3 XNAs multicapa

Per tal de poder produir respostes més complexes, el següent pas és afegir més perceptrons al sistema per aproximar-nos més al model del cervell humà. Això es pot fer de dues maneres: afegint neurones veïnes per formar una capa que comparteixen les mateixes entrades, o introduint noves capes de neurones que agafin com a entrades les sortides de les neurones de la capa anterior. L'arquitectura neuronal resultant es mostra a la Figura 1.8.

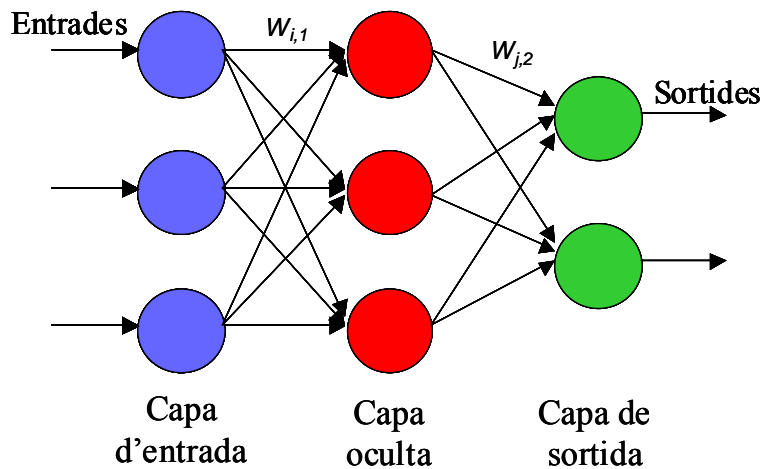


Figura 1.8 Esquema d'una XNA multicapa.

En aquest esquema podem observar que l'estructura està formada per una capa d'entrada, que serveix per distribuir els senyals cap a la següent capa. Aquesta primera capa no filtra ni aplica cap funció de transferència a les dades. Els perceptrons de la segona capa, que rep el nom de capa oculta, sí que processen els senyals rebuts, normalment utilitzant una funció sigmoïdal del tipus *logsig* o *tansig*, i els envien a l'última capa. La capa de sortida enllaça la XNA amb l'exterior, subministrant la informació processada mitjançant una funció lineal, normalment la *purelin*. Com s'observa a l'esquema, cada perceptró està connectat amb tots els perceptrons de les capes contigües, però amb cap de la seva mateixa capa. Per això s'anomenen xarxes unidireccionals (*feedforward*)[122].

És possible incloure més capes de neurones addicionals entre la capa d'entrada i la capa de sortida, però s'ha comprovat que les configuracions amb tres capes com la que es mostra a la Figura 1.8 proporcionen bons ajustos en sistemes com els que es desenvolupen en la present tesi[92, 94, 95]

1.4.2.4 XNAs amb retropropagació

Per aprenentatge o entrenament d'una XNA cal entendre optimització dels pesos w_i per tal de modelitzar correctament la informació i obtenir així resultats correctes a partir d'un conjunt de mesures. Un esquema il·lustratiu del procés que es realitza en l'aprenentatge d'una xarxa neuronal amb retropropagació (*backpropagation* en anglès) és el que es pot apreciar a la Figura 1.9:

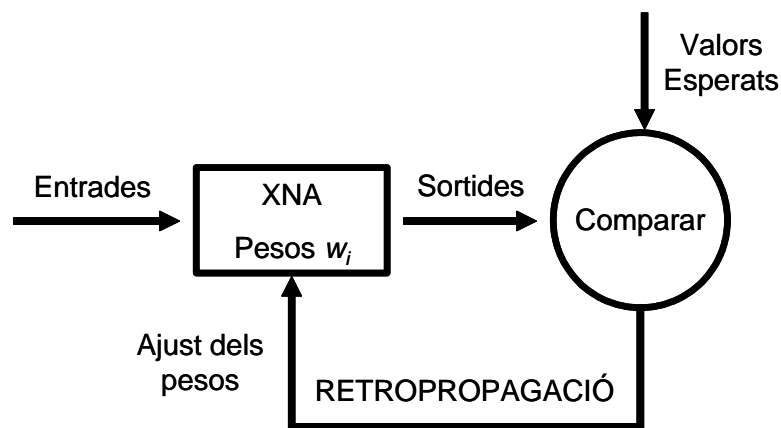


Figura 1.9 Esquema del mecanisme de retropropagació.

Les xarxes tenen la capacitat d'aprendre a partir d'un recull de mostres representatives del problema que es vol modelar. Aquestes mostres són les que formen el conjunt d'entrenament de la xarxa: els senyals formen les entrades, una per cada senyal (és a dir, una entrada per sensor, una per la temperatura); les propietats de les mostres conformen les sortides de la xarxa, una per cada propietat (és a dir, una per concentració considerada). La idea és recalculer iterativament els pesos w_i , essent el seu valor òptim aquell que fa que els senyals de sortida (en el nostre cas, concentracions) siguin el més semblants possible als desitjats. Una de les maneres més habituals és minimitzar el

sumatori dels quadrats de les diferències entre els valors esperats (o_{pj}) i els trobats (t_{pj}) per cada neurona j i per cada patró p . Per tant, la funció d'error emprada és la següent:

$$E_p = \frac{1}{2} \sum_j^n (t_{pj} - o_{pj})^2 \quad (1.3)$$

Aquest mecanisme s'anomena algorisme del gradient descendent. A l'aplicar-lo, el valor del pes d'una connexió a l'estat ($t+1$) està relacionat amb el valor del mateix pes a l'estat t per l'equació següent:

$$w_{pj}(t+1) = \beta \times w_{pj}(t) + \alpha \times \delta_{pj} \times o_{pj} \quad (1.4)$$

a on α és la velocitat d'aprenentatge (*learning rate* en anglès), β és el moment (*momentum* en anglès) i δ_{pj} és la magnitud del canvi, essent el producte $\delta_{pj} \times o_{pj}$ la contribució del gradient. La velocitat d'aprenentatge va entre 0 i 1 i té la funció d'accelerar o frenar el descens cap el mínim global del sistema. Tot i que tenir valors baixos d' α és útil per evitar caure en mínims locals, també alenteixen el procés de minimització de l'error. El moment també va entre 0 i 1 i serveix per reduir les probabilitats d'acabar en un mínim local. δ és el paràmetre a calcular mitjançant aquest algorisme.

És possible derivar aquestes expressions, obtenint la mida dels canvis a fer als pesos per disminuir l'error durant l'entrenament. Per a la capa de sortida:

$$\delta_{pj} = k \times o_{pj} \times (1 - o_{pj}) \times (t_{pj} - o_{pj}) \quad (1.5)$$

i per a les capes ocultes:

$$\delta_{pj} = k \times o_{pj} \times (1 - o_{pj}) \times \sum_k \delta_{pk} \times w_{jk} \quad (1.6)$$

Aquestes expressions es coneixen com la regla delta generalitzada i mostren de quina manera l'error depèn de les capes subsegüents: s'ajusten els pesos de la capa de sortida i

es retropropaga l'error, ajustant els pesos i continuant amb aquest procés fins arribar a la capa d'entrada.

1.4.2.5 Sobreentrenament i Regularització Bayesiana

Un dels problemes que poden tenir lloc durant l'entrenament de la XNA s'anomena sobreentrenament o sobreajust. Es produeix quan s'han ajustat els pesos w_i de forma que l'error en el conjunt d'entrenament és petit, però en canvi, quan es processa amb un nou conjunt de mostres, sent aquest de la mateixa naturalesa però sense haver participat en l'entrenament (conjunt de validació externa o *test set* en anglès), aquest error es fa gran. És a dir, la xarxa ha memoritzat els exemples de l'entrenament, però no ha après a generalitzar noves situacions[123].

Per evitar-ho, hi han diferents alternatives, com l'aturada a temps o l'algorisme de Regularització Bayesiana (RB):

- **Aturada a temps:** la manera més simple d'evitar el sobreentrenament és aturar el procés d'entrenament abans que es produeixi aquest problema. Això s'aconsegueix detectant el sobreajust mitjançant un conjunt de mostres anomenat conjunt de validació interna que no participa en la construcció del model. Així, la totalitat de mostres es divideixen en tres grups: el conjunt de mostres d'entrenament que serveix per construir la xarxa mitjançant l'ajust dels pesos, aquest conjunt de mostres de validació interna i finalment el conjunt de mostres de validació externa o *test-set* que permet avaluar la capacitat de predicció de la XNA optimitzada, ja que tampoc participen en l'entrenament. L'aturada a temps funciona de manera que al mateix temps que la xarxa s'entrena, es monitoritza l'error del conjunt de validació interna. Aquest error va disminuint a mesura que avança l'entrenament, fins que la tendència canvia i comença a créixer. Això ens indica que la xarxa comença a patir sobreentrenament i el procés s'atura. Així la xarxa queda optimitzada amb els valors dels pesos d'iteracions anteriors que estaven en memòria temporal.
- **Regularització Bayesiana (RB):** aquest mètode busca el model de xarxa més simple que millor s'ajusti a la funció que volem aproximar, arribant a predir més eficientment punts que no han participat en l'entrenament. A diferència de

l'algorisme del gradient descendent, no només es considera l'error global de la xarxa, sinó que també es té en compte el valor de cadascun dels pesos de la XNA. Per tant, en aquest cas es busca també minimitzar els valors actuals dels pesos i amb això s'aconsegueix que la complexitat de la xarxa disminueixi, suavitzant la seva resposta i evitant el sobreajust. Així doncs, una de les principals avantatges de la RB és que no necessita el conjunt de validació interna, de manera que podem distribuir més mostres en els altres dos grups de mostres.

1.4.3 Regressió per mínims quadrats parcials (PLS)

La regressió per mínims quadrats parcials és un mètode de calibratge multivariable que es basa en la idea de que la informació continguda en les variables mesurades es pot compactar en un nombre menor de noves variables sense pèrdua d'informació analítica rellevant alhora que es descarta el soroll. Aquestes noves variables reben el nom de components o factors i són combinacions lineals de les variables originals. La regressió per mínims quadrats, doncs, no es realitza a partir de les dades originals sinó a partir d'aquestes noves variables, simplificant el model i la interpretació dels resultats.

En essència, es tracta d'un mètode lineal, és a dir, que el model final de calibratge vindrà descrit per una equació del tipus (1.7):

$$y = b_0 + \sum_{k=1}^k b_k x_k \quad (1.7)$$

essent b_0 , b_k els paràmetres a determinar, y la variable dependent (concentració), i x les variables independents (els diferents potencials, temperatura).

S'intenta que els primers components continguin la major informació per a la predicció de mostres. Per fer això, durant l'etapa de calibratge, l'algorisme PLS no només utilitza la informació donada pels potencials mesurats i, en el seu cas, la temperatura, sinó també la informació donada per les concentracions dels patrons. Aquesta és la principal millora del PLS respecte la regressió en components principals (PCR, de l'anglès

Principal Component Regression), ja que els *loadings** no coincideixen exactament amb la direcció de màxima variació, com en el cas de l'anàlisi en components principals (PCA), donat que es troben corregits per aconseguir aquesta òptima capacitat predictiva per les concentracions[124].

Els models PLS s'empren sobretot en sistemes analítics amb un gran volum de variables i amb un nombre no massa elevat de mostres[125].

1.5 El monitoratge i el control analític

El monitoratge analític és l'obtenció contínua o periòdica d'informació analítica de tipus químic procedent d'un determinat sistema material o d'un procés. Quan a conseqüència de la informació analítica obtinguda amb el monitoratge es produeix una actuació sobre el sistema o procés, llavors parlem de control analític. El control d'un procés està totalment automatitzat quan l'actuació es realitza sense intervenció humana. Un sistema o procés, el control del qual està totalment automatitzat, implica que el monitoratge de la informació analítica també es realitza de forma automàtica[126]. Els processos controlats automàticament tenen les avantatges de ser més econòmics, degut a que no hi ha despeses de personal i poden treballar sense limitació de temps, són més fiables en evitar-se l'error humà i l'actuació sobre el sistema es realitza just en el moment considerat més oportú i amb un temps d'actuació conegut i controlat.

Segons el contacte entre la mostra i l'analitzador, el monitoratge analític pot ser:

- *In-line*: El monitoratge es realitza en el mateix lloc a on es troba el procés o sistema. L'analitzador s'introdueix en el sistema material o procés que es desitja monitoritzar. Aquest tipus de monitoratge és el més fiable i convenient quan és possible realitzar-lo, ja que l'anàlisi de la mostra es realitza en les mateixes condicions fisico-químiques en les que es troba el sistema material o procés.
- *On-line*: El monitoratge es realitza en el mateix lloc a on es troba el procés o sistema, però, a diferència de l'anterior, es realitza una etapa automatitzada de presa i transport de la mostra cap a l'analitzador. Així doncs, la mostra s'analitza fora del seu entorn i en unes condicions fisico-químiques diferents.

* Els *loadings* són els pesos o coordenades que tenen els eixos vells en els nous eixos (components). Habitualment es representen com els cosinus dels angles que formen els components amb els eixos antics.

- *At-line*: L'anàlisi es realitza també al mateix lloc a on es troba el procés o sistema, però la presa i transport de la mostra es realitza mitjançant intervenció humana, per la qual cosa el procés no pot ser monitoritzat de forma totalment automàtica.
- *Off-line*: En aquest últim cas la mostra es presa i transportada fins a un laboratori (analitzador) que es troba en un lloc diferent d'on s'ha realitzat el mostreig. És el cas més desfavorable per monitoritzar un procés o sistema material, ja que la mostra no només pot variar les seves propietats físico-químiques sinó que l'actuació sobre el procés triga molt més temps a produir-se.

Actualment, els camps en els quals existeix una major demanda d'analitzadors que permetin realitzar un monitoratge i/o control de procés són els següents:

- Medi ambient: la creixent conscienciació de la societat sobre temes ecològics ha portat al monitoratge i al control dels nivells de contaminació de l'aire, l'aigua i el sòl, els quals s'alteren de manera significativa per causa de l'activitat humana.
- Processos industrials: degut a l'interès econòmic, cada vegada més es tendeix a monitoritzar i controlar de manera automatitzada un o diversos paràmetres dels processos de fabricació. Els dos camps industrials en els quals és d'especial importància el control de processos són el farmacèutic (seguiment de la puresa i l'activitat dels preparats) i l'alimentari (seguiment a nivell de l'elaboració i obtenció dels aliments, així com de la conservació dels mateixos).
- Processos biotecnològics: producció d'anticossos, cultiu de cèl·lules animals, fermentacions, etc.
- Processos clínics: la medicina actual fonamenta les seves actuacions en la determinació d'un gran nombre de paràmetres clínics en diferents fluids corporals (sèrum, orina, etc.) que constitueixen la base dels diagnòstics. Especialment representatiu és l'exemple del monitoratge d'urea i creatinina en pacients amb disfuncions renals.
- Sistemes químics: el monitoratge d'un reactiu o d'un producte d'una determinada reacció permet el coneixement de la cinètica i el mecanisme de la mateixa.

Com hem explicat abans, les matrius de sensors i biosensors permeten obtenir informació analítica multicomponent en temps real per la qual resulten especialment útils en el monitoratge. Integrades en una llengua electrònica, s'han descrit moltes aplicacions, sobretot en el camp mediambiental i industrial. A la Taula 1.14 es resumeixen alguns dels treballs que s'han publicat en els últims anys.

Taula 1.14 Alguns treballs publicats des de 2003 sobre llengües electròniques emprades en el monitoratge de paràmetres.

Llengua electrònica	Camp d'aplicació	Ref.
Potenciomètrica	Procés biotecnològic: monitoratge <i>at-line</i> d'àcid octanoïc en un cultiu microbiològic	[127]
Potenciomètrica	Procés industrial: monitoratge de la qualitat de la llet	[80]
Potenciomètrica	Medi ambient: monitoratge de collites i estimació de la qualitat de les plantes	[128]
Amperomètrica	Medi ambient: multideterminació <i>in-situ</i> i en temps real de traces de Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ i Cr ³⁺ en aigua	[129]
Amperomètrica	Procés industrial: monitoratge de la qualitat de menjars per a bebès	[130]
Òptica	Procés industrial: monitoratge de la qualitat de refrescos i altres begudes	[131]

1.6 Bibliografia

- [1] M. Cortina, M.J. Esplandiu, S. Alegret, M. del Valle, *Sensors and Actuators B Chemical*, **118** (2006) 84-89
- [2] R.W. Cattrall, *Chemical Sensors*. New York, Oxford University Press (1997)
- [3] R.P. Buck, E. Lindner, *Pure and Applied Chemistry*, **66** (1994) 2527-2536
- [4] D. Amman, *Ion-Selective Microelectrodes: Principles, Design and Application*. Berlin, Springer-Verlag (1986) cap. 4
- [5] P. Ivarsson, M. Johansson, N.E. Hojer, C. Krantz-Rülcker, F. Winqvist, I. Lundström, *Sensors and Actuators B*, **108** (2005) 851-857
- [6] L. Lvova, E. Martinelli, E. Mazzone, A. Pede, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico, *Talanta*, **70** (2006) 833-839
- [7] M. Miró, W. Frenzel, *The Analyst*, **128** (2003) 1291-1297
- [8] D. Xiao, H.Y. Yuan, J. Li, R.Q. Yu, *Analytical Chemistry*, **67** (1995) 288-291
- [9] R.K. Meruva, M.E. Meyerhoff, *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2022-2026

- [10] R. de Marco, B. Pejčić, Z. Chen, *The Analyst*, **123** (1998) 1635-1640
- [11] M. Ramón, *Desenvolupament d'un analitzador automàtic per a la monitorització d'ió fosfat en aigües superficials. Tesi doctoral*. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona (2003)
- [12] S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos*. Barcelona, Servei de Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona (2004)
- [13] S. Glab, R. Koncki, E. Kopczevska, I. Walcerz, A. Hulanicki, *Talanta*, **41** (1994) 1201-1205
- [14] S. Zamponi, B. Lo Cicero, M. Mascini, L. Della Ciana, S. Sacco, *Talanta*, **43** (1996) 1373-1377
- [15] J.M.C.S. Magalhaes, A.A.S.C. Machado, *Talanta*, **47** (1998) 183-191
- [16] R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W. Winkelman, (Eds.), *Clinical Chemistry: Principles and Technics*, 2^a Edició. Filadèlfia, Harper & Row (1974)
- [17] R. Koncki, *Analytica Chimica Acta*, **599** (2007) 7-15
- [18] D.M. Pena, *Desenvolupament de biosensors electroquímics per a la deteminació d'inhibidors enzimàtics. Tesi doctoral*. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona (1995)
- [19] J. Ruzicka, E.H. Hansen, A.K. Ghose, H.A. Mottola, *Analytical Chemistry*, **51** (1979) 199-203
- [20] A. Sehitogullari, A.H. Uslan, *Talanta*, **57** (2002) 1039-1044
- [21] R. Sahney, S. Anand, B.K. Puri, A.K. Srivastava, *Analytica Chimica Acta*, **578** (2006) 156-161
- [22] L. Tymecki, E. Zwierkowska, R. Koncki, *Analytica Chimica Acta*, **538** (2005) 251-256
- [23] L. Tymecki, R. Koncki, *Sensors and Actuators B*, **113** (2006) 782-786
- [24] W. Sant, M.L. Pourciel, J. Launay, T. Do Conto, A. Martínez, P. Temple-Boyer, *Sensors and Actuators B*, **95** (2003) 309-314
- [25] B. Premanode, Ch. Toumazou, *Sensors and Actuators B*, **120** (2007) 732-735
- [26] V. Pravdová, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Analytical Letters*, **35** (2002) 2389-2419
- [27] Y. Umezawa, K. Umezawa, H. Sato, *Pure and Applied Chemistry*, **67** (1995) 507-518
- [28] Y. Umezawa, (Ed.), *Handbook of Ion-Selective Electrodes. Selectivity Coefficients*. Boca Raton, FL, CRC Press (1990)
- [29] I. Walcerz, S. Glab, R. Koncki, *Analytica Chimica Acta*, **369** (1998) 129-137
- [30] D.D. Cunningham, *Sensors Letters*, **2** (2004) 217-220
- [31] R. Koncki, A. Radomska, S. Glab, *Talanta*, **52** (2000) 13-17
- [32] R. Koncki, A. Radomska, S. Glab, *Analytica Chimica Acta*, **418** (2000) 213-224
- [33] T. Zrawczynski vel Krawczyk, M. Trojanowicz, A. Lewenstam, *Talanta*, **41** (1994) 1229-1236
- [34] A. Radomska, R. Koncki, K. Pyrzynska, S. Glab, *Analytica Chimica Acta*, **523** (2004) 193-200
- [35] B. Tombach, J. Schneider, F. Matzkies, R.M. Schaefer, G.C. Chemnitz, *Clinica Chimica Acta*, **312** (2001) 129-134
- [36] P.C. Pandey, A.P. Mishra, *Sensors and Actuators B*, **99** (2004) 230-235

- [37] A. Radomska, E. Bodenszac, S. Glab, R. Koncki, *Talanta*, **64** (2004) 603-608
- [38] C.D. Rasmussen, J.E.T. Andersen, B. Zachau-Christiansen, *Analytical Letters*, **40** (2007) 39-52
- [39] J.M.C.S. Magalhaes, A.A.S.C. Machado, *Analyst*, **127** (2002) 1069-1075
- [40] W. Sant, M.L. Pourciel-Gouzy, J. Launay, T. Do Conto, R. Colin, A. Martínez, P. Temple-Boyer, *Sensors and Actuators B*, **103** (2004) 260-264
- [41] A.P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Talanta*, **58** (2002) 351-357
- [42] E.H. Taylor, *Clinical Chemistry*. En: J.D. Winefordner, (Ed.), *Chemical Analysis*, vol. 106. Nova York, John Wiley & Sons (1989)
- [43] C.A. Burtis, E.R. Ashwood, (Eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2ª Edició. Filadèlfia, W.B. Saunders (1994)
- [44] I. Karube, H. Matsuoka, S. Suzuki, E. Watanabe, K. Toyama, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32** (1984) 314-319
- [45] K. Matsumoto, H. Kamikado, H. Matsubara, Y. Osajima, *Analytical Chemistry*, **60** (1988) 147-151
- [46] C.S. Rui, K. Sonomoto, Y. Kato, *Analytical Sciences*, **8** (1992) 845-850
- [47] M. Jurkiewicz, S. Alegret, J. Almirall, M. García, E. Fàbregas, *Analyst*, **123** (1998) 1321-1327
- [48] P. Ciosek, W. Wróblewski, *Analyst*, **132** (2007) 963-978
- [49] J. Workman, K.E. Creasy, S. Doherty, L. Bond, M. Koch, A. Ullman, D.J. Veltkamp, *Analytical Chemistry*, **73** (2001) 2705-2718
- [50] F. Winquist, S. Holmin, D. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström, *Analytica Chimica Acta*, **406** (2000) 147-157
- [51] M. Baret, D.L. Massart, P. Fabry, C. Menardo, F. Conesa, *Talanta*, **50** (1999) 541-558
- [52] K. Toko, *Biomimetic Sensor Technology*. Cambridge, Cambridge University Press (2000)
- [53] K. Sirkar, A. Revzin, M.V. Pishko, *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 2930-2936
- [54] J.A. Ferguson, B.G. Healey, K.S. Bronk, S.M. Barnard, D.R. Walt, *Analytica Chimica Acta*, **340** (1997) 123-131
- [55] D. Diamond, *Principles of Chemical and Biological Sensors*. Nova York, Ed. Wiley (1998)
- [56] H.T. Nagle, S.S. Schiffman, R. Gutiérrez-Osuna, *IEEE Spectrum*, **35** (1998) 22-31
- [57] A.L. Huang, X. Chen, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Tränkner, N.J.P. Ryba, C.S. Zuker, *Nature*, **442** (2006) 934-938
- [58] G. Nelson, J. Chandrashekar, M.A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N.J.P. Ryba, C.S. Zuker, *Nature*, **416** (2002) 199-202
- [59] K. Persaud, G. Dodd, *Nature*, **299** (1982) 352-355
- [60] S.W. Moore, J.W. Gardner, E.L. Hines, W. Gopel, U. Weimar, *Sensors and Actuators B*, **16** (1993) 344-348
- [61] T.C. Pearce, J.W. Gardner, S. Friel, P.N. Bartlett, N. Blair, *Analyst*, **118** (1993) 371-377

- [62] C. Di Natale, A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, R. Paolesse, T. Boschi, M. Faccio, G. Ferri, *Sensors and Actuators B*, **44** (1997) 521-526
- [63] D.S. Ballantine, S.L. Rose, J.W. Grate, H. Wohltjen, *Analytical Chemistry*, **58** (1986) 3058-3066
- [64] S.M. Scott, D. James, Z. Ali, *Microchimica Acta*, **156** (2007) 183-207
- [65] M. Otto, J.D.R. Thomas, *Analytical Chemistry*, **57** (1985) 2647-2651
- [66] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, *Sensors and Actuators B*, **44** (1997) 532-537
- [67] M. Holmberg, M. Eriksson, C. Krantz-Rulcker, T. Artusson, F. Winqvist, A. Lloyd-Spetz, I. Lundstrom, *Sensors and Actuators B*, **101** (2004) 213-223
- [68] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'Amico, *Pure and Applied Chemistry*, **77** (2005) 1965-1983
- [69] Y. Vlasov, A. Legin, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **361** (1998) 255-260
- [70] D. James, S.M. Scott, Z. Ali, W.T. O'Hare, *Microchimica Acta*, **149** (2005) 1-17
- [71] Taste Sensing System, Intelligent Sensor Technology Inc., Japó. Pàgina web: www.insent.co.jp
- [72] Electronic Tongue Astree, Alpha M.O.S., França. Pàgina web: www.alpha-mos.com
- [73] Multiarray Chemical Sensor, McScience, Inc., Corea. Pàgina web: www.mcscience.com
- [74] F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, I. Lundstrom, *Sensors Update*, **11** (2002) 279-306
- [75] A.L.A. Rudnitskaya, B. Seleznev, Y. Vlasov, *International Journal of Food Science and Technology*, **37** (2002) 375-385
- [76] A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, Y. Vlasov, C. Di Natale, A. D'Amico, *Analytica Chimica Acta*, **484** (2003) 33-44
- [77] A. Legin, A. Rudnitskaya, B. Seleznev, Y. Vlasov, *Analytica Chimica Acta*, **534** (2005) 129-135
- [78] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta*, **66** (2005) 1303-1309
- [79] T. Mottram, A. Rudnitskaya, A. Legin, J.L. Fitzpatrick, P.D. Eckersall, *Biosensors and Bioelectronics*, **22** (2007) 2689-2693
- [80] M.Y.M. Sim, T.J. Shya, M.N. Ahmad, A.Y.M. Shakaff, A.R. Othman, M.S. Hitam, *Sensors*, **3** (2003) 340-349
- [81] K. Toko, *Sensors Update*, **3** (1998) 131-160
- [82] M. Iwakura, Y. Isomoto, T. Inoue, K. Toko, *Sensors and Materials*, **15** (2003) 371-380
- [83] P. Ciosek, Z. Brzozka, W. Wróblewski, *Sensors and Actuators B*, **118** (2006) 454-460
- [84] K. Toko, *Measurement Science and Technology*, **9** (1998) 1919-1936
- [85] A. Legin, A. Rudnitskaya, D. Chapham, B. Seleznev, K. Lord, Y. Vlasov, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **380** (2004) 36-45
- [86] A.S.A. Rahman, M.M.S. Yap, A.Y.M. Shakaff, M.N. Ahmad, Z. Dahari, Z. Ismail, M.S. Hitam, *Sensors and Actuators B*, **101** (2004) 191-198
- [87] C. Turner, A. Rudnitskaya, A. Legin, *Journal of Biotechnology*, **103** (2003) 87-91

- [88] Y.G. Mourzina, J. Schubert, W. Zander, A. Legin, Y.G. Vlasov, H. Luth, M.J. Schoning, *Electrochimica Acta*, **47** (2001) 251-258
- [89] A. Rudnitskaya, A. Ehlert, A. Legin, Y. Vlasov, S. Buttgenbach, *Talanta*, **55** (2001) 425-431
- [90] J. Saurina, E. López-Aviles, A. Le Moal, S. Hernández-Cassou, *Analytica Chimica Acta*, **464** (2002) 89-98
- [91] N. Garcia-Villar, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **371** (2001) 1001-1008
- [92] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, *Sensors and Actuators B*, **101** (2004) 72-80
- [93] M. Cortina, A. Durán, S. Alegret, M. del Valle, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **385** (2006) 1186-1194
- [94] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle, *Electroanalysis*, **17** (2005) 348-355
- [95] M. Cortina, A. Gutes, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta*, **66** (2005) 1197-1206
- [96] D.P.A. Correia, J.M.C.S. Magalhaes, A.A.S.C. Machado, *Talanta*, **67** (2005) 773-782
- [97] C.J.L. Constantino, P.A. Antunes, E.C. Venancio, N. Consolin, F.J. Fonseca, L.H.C. Mattoso, R.F. Aroca, O.N. Oliveira Jr., A. Riul Jr., *Sensors Letters*, **2** (2004) 95-101
- [98] G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, R. Leardi, A. Ahluwalia, *Biosensors and Bioelectronics*, **22** (2007) 2624-2628
- [99] W. Bourgeois, R.M. Stuetz, *Water Research*, **36** (2002) 4505-4512
- [100] C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, A. D'Amico, M. Ubigli, A. Legin, L. Lvova, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, *Sensors and Actuators B*, **69** (2000) 342-347
- [101] J.D. Kim, H.G. Byun, D.J. Kim, Y.K. Ham, W.S. Jung, C.O. Yoon, *Talanta*, **70** (2006) 546-555
- [102] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, M.A. Alonso-Lomillo, F.J. Muñoz-Pascual, M. del Valle, *Talanta*, **72** (2007) 774-779
- [103] J.L.H.C. Busch, K. Hrnčirik, E. Bulukin, C. Boucon, M. Mascini, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** (2006) 4371-4377
- [104] A. Gutes, D. Calvo, F. Céspedes, M. del Valle, *Microchimica Acta*, **157** (2007) 1-6
- [105] M. Ferreira, A. Riul Jr., K. Wohnrath, F.J. Fonseca, O.N. Oliveira Jr., L.H.C. Mattoso, *Analytical Chemistry*, **75** (2003) 953-955
- [106] A. Goodey, J.J. Lavigne, S.M. Savoy, M.D. Rodriguez, T. Curey, A. Tsao, G. Simmons, J. Wright, S.J. Yoo, Y. Sohn, E.V. Anslyn, J.B. Shear, D.P. Neikirk, J.T. McDevitt, *Journal of the American Chemical Society*, **123** (2001) 2559-2570
- [107] R. Kirby, E.J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y.S. Park, D.P. Neikirk, J.T. McDevitt, A.D. Ellington, *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 4066-4075
- [108] J.K. Abraham, S. Karjathkar, S. Jacesko, V.K. Varadan, J. Gardner, *Optical Engineering*, **5763** (2005) 414-424
- [109] M.J. Madou, R. Cubicciotti, *Proceedings of the IEEE*, **91** (2003) 830-838
- [110] S.S.M. Hassan, H.E.M. Sayour, S.S. Al-Mehrezi, *Analytica Chimica Acta*, **581** (2007) 13-18

- [111] C. Jiménez, *Sensors químics tipus ISFET. Tesi doctoral*. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona (1992)
- [112] L. Moreno, A. Merlos, N. Abramova, C. Jiménez, A. Bratov, *Sensors and Actuators B*, **116** (2006) 130-134
- [113] A. Poghossian, J.W. Schultze, M.J. Schoning, *Sensors and Actuators B*, **91** (2003) 83-91
- [114] C.A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, *Trends in Analytical Chemistry*, **14** (1995) 225-231
- [115] R. Martínez-Mañez, J. Soto, E. Garcia-Brejjo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Llobet, *Sensors and Actuators B*, **104** (2005) 302-307
- [116] G. Verelli, L. Francioso, R. Paolesse, P. Siciliano, C. Di Natale, A. D'Amico, A. Logrieco, *Sensors and Actuators B*, **123** (2007) 191-197
- [117] P. Ciosek, W. Wróblewski, *Talanta*, **69** (2006) 1156-1161
- [118] L. Lvova, S.S. Kim, A. Legin, Y. Vlasov, J.S. Yang, G.S. Cha, H. Nam, *Analytica Chimica Acta*, **468** (2002) 303-314
- [119] V. Parra, A.A. Arrieta, J.A. Fernández-Escudero, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. De Saja, *Sensors and Actuators B*, **118** (2006) 448-453
- [120] H.M. Cartwright, *Applications of Artificial Intelligence in Chemistry*. Oxford, Oxford Science Publications (1993)
- [121] M. Bos, A. Bos, W.E. Van der Linden, *Analytica Chimica Acta*, **233** (1990) 31-39
- [122] G.R. Ramos, M.C.G. Álvarez-Coque, *Quimiometría*. Madrid, Ed. Síntesis (2001)
- [123] J.C. Mackay, *Probable networks and plausible predictions a review of practical Bayesian methods for supervised neural networks*, Technical Report. Cambridge, Cavendish Laboratory (1995)
- [124] P. Geladi, B.R. Kowalski, *Analytica Chimica Acta*, **185** (1986) 1-17
- [125] M.A.A. Lomillo, O.D. Renedo, M.J.A. Martínez, *Analytica Chimica Acta*, **449** (2001) 167-177
- [126] IUPAC Analytical Chemistry Division, *Compendium of analytical nomenclature. Definitive rules 1997*, Cap. 7: Automatic Analysis. Edició on-line: http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/. Consulta realitzada: Desembre 2007
- [127] C.J. Lomborg, L. Wiebe, K.H. Esbensen, *Journal of Biotechnology*, **133** (2008) 162-169
- [128] P. Ciosek, B. Pokorska, E. Romanowska, W. Wroblewski, *Electroanalysis*, **18** (2006) 1266-1272
- [129] S.F. Zou, H. Men, Y. Li, Y.P. Wang, P. Wang, *Rare Metal Materials and Engineering*, **35** (2006) 381-384
- [130] B. Iliev, M. Lindquist, L. Robertsson, P. Wide, *Fuzzy Sets and Systems*, **157** (2006) 1155-1168
- [131] C. Zhang, K.S. Suslick, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (2007) 237-242

CAPÍTOL 2: OBJECTIUS

Capítol 2

Objectius

L'objectiu global de la present tesi doctoral és la construcció i avaluació de diferents llengües electròniques potenciomètriques per a aplicacions d'anàlisi quantitatiu en diferents àrees d'interès, com són l'agricultura, el medi ambient i l'anàlisi clínic. En aquesta última àrea, s'han construït llengües electròniques amb biosensors. En el camp agrícola, els objectius són:

1. Construcció i avaluació d'una llengua electrònica per al monitoratge *on-line* i simultani dels ions amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat en la solució de nutrició d'un hivernacle hidropònic amb recirculació dels lixiviats.
2. Construcció i avaluació d'una nova llengua electrònica basada en l'anterior, però incloent un nou analit, l'ió fosfat, per a utilitzar-la en la mateixa aplicació hidropònica.

En el camp mediambiental, els objectius són:

3. Construcció i avaluació d'una llengua electrònica per al monitoratge *in-line* i simultani dels ions amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat en un Reactor Continu de Tanc Agitat (RCTA) que simula una aigua superficial i avaluar l'efecte de la biodegradació natural sobre aquestes espècies.
4. Construcció i avaluació d'una llengua electrònica per al monitoratge *in-line* i simultani dels ions amoni, potassi i sodi en la presa Ignacio Ramírez (Mèxic).
5. Exploració de la possibilitat de connectar inalàmbricament l'ordinador i el lloc de monitoratge on es troba la matriu de sensors, mitjançant la transmissió de dades per radiofreqüència. Aquest és el primer pas per a utilitzar llengües electròniques com a sistemes automàtics de mesura remota en aplicacions mediambientals.
6. Construcció i avaluació d'una llengua electrònica basada en una matriu de sensors serigrafada per a la determinació simultània d'amoni, potassi i sodi en mostres d'aigua de la mateixa presa Ignacio Ramírez. La tècnica serigràfica és la que possibilita la construcció de matrius de sensors integrades i de baix cost.

Tant en el monitoratge agrícola com en el mediambiental, s'ha posat especial èmfasi en compensar l'efecte de la temperatura sobre la resposta dels elèctrodes, així com el de les derives provocades per l'ús i la histèresi. Finalment, en el camp clínic, els objectius són:

7. Construcció i avaluació d'una llengua electrònica basada en biosensors potenciomètrics d'urea juntament amb d'altres ESIs per a la determinació simultània d'urea, amoni, potassi i sodi en mostres clíniques, concretament d'orina.
8. Construcció i avaluació d'una nova llengua electrònica basada en l'anterior, però incloent un nou metabòlit al model, la creatinina, per a aplicar-la també en mostres clíniques d'orina.

També s'han comparat les prestacions dels models de resposta generats per dues eines de calibratge multivariable diferents: les xarxes neuronals artificials, àmpliament usades en matrius de sensors potenciomètrics, i la regressió per mínims quadrats parcials. A més, per cada aplicació, s'han construït diferents seqüències d'experiments per tal d'obtenir la màxima quantitat d'informació de les mostres amb esforços experimentals assumibles.

CAPÍTOL 3: EXPERIMENTAL

Capítol 3

Experimental

3.1 Reactius i dissolucions

Tots els reactius emprats, tant en la preparació dels sensors i biosensors com en la seva avaluació, han estat de qualitat “per anàlisi” o similar. Les dissolucions aquoses s’han preparat utilitzant aigua bidestil·lada o Milli-Q (Millipore, MA, Estats Units).

Segons l’aplicació de la llengua electrònica, s’han preparat diferents solucions de fons. En les llengües electròniques usades als hivernacles, en la llengua electrònica emprada per al monitoratge de la presa *Ignacio Ramírez* (IR) i en la usada per al monitoratge del reactor continu de tanc agitat (RCTA), s’han utilitzat, respectivament, dilucions de la pròpia solució de nutrició o dels lixiviats, dilucions de l’aigua de la pròpia presa i aigua de superfície sintètica preparada al laboratori amb concentracions típiques dels ions. En la llengua electrònica desenvolupada mitjançant la tècnica serigràfica (*screen-printing* en anglès) el fons ha estat imidazole (Sigma, MO, Estats Units) 0.01 M a pH = 6.6. En les llengües electròniques amb biosensors s’ha fet servir també tris(hidroximetil)aminometà (TRIS, Merck, Alemanya) 0.05 M a pH = 7.5 com a medi iònic.

3.2 Construcció dels elèctrodes

Al llarg del present treball, s'han preparat tres tipus d'elèctrodes potenciomètrics, en funció de la seva naturalesa. En els següents apartats es descriu el procés de fabricació per a cadascun d'ells.

3.2.1 Elèctrodes selectius a ions de portador mòbil

Durant la present tesi s'han construït elèctrodes selectius a ions (ESIs) en disposició convencional i també serigrafiats. No obstant, tots dos són del tipus contacte intern sòlid (*all-solid-state* en anglès). La seva característica principal és l'absència d'una solució de referència interna, ja que el transductor i la membrana polimèrica es troben en contacte òhmic directe.

3.2.1.1 Construcció dels cossos dels elèctrodes convencionals

En la construcció (Figura 3.1) dels cossos dels elèctrodes convencionals[1] es parteix d'un connector elèctric al qual es solda en l'extrem una plaqueta de coure de 5 mm de diàmetre (A). Aquest connector s'introdueix en un cilindre de clorur de polivinil (PVC) de 8 mm de diàmetre extern, 6 mm de diàmetre intern i 2 cm de llargada, de manera que queda una cavitat buida entre la plaqueta de coure del connector i l'altre extrem del cilindre de PVC (B). Aquest espai buit s'omple amb una pasta conductora a base d'epoxi-grafit, formada per 1 part de grafit amb mida de partícula de 50 µm (BDH Laboratory Supplies, Regne Unit) i 1 part d'epoxi, evitant que quedin bombolles d'aire en el seu interior i assegurant el contacte amb la plaqueta de coure. L'epoxi emprat és una mescla d'Araldit M i enduridor HR (ambdós d'Uneco, Espanya), en proporció 5:2 en pes. Un cop aplicada la pasta conductora, s'introdueixen els cossos a l'estufa a uns 40 °C durant 24 h, per tal d'assegurar-ne l'assecat (C). Finalment, la pasta conductora es mecanitza per tal de rebaixar-la 0.3 mm i polir-la (D). Sobre aquesta superfície es diposita la membrana polimèrica selectiva.

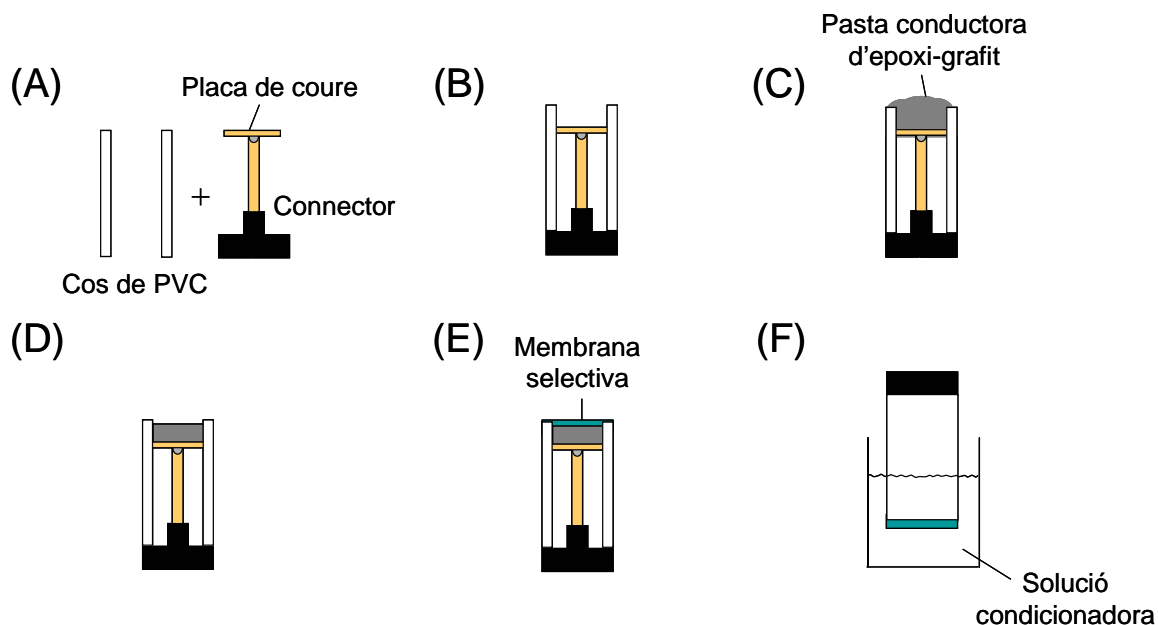


Figura 3.1 Procés de fabricació d'un ESI en disposició convencional.

3.2.1.2 Preparació i deposició de les membranes

Les membranes dels elèctrodes es preparen dissolent el polímer, PVC o PVC carboxilat (PVC-COOH), juntament amb el plastificant (o solvent medidor), l'ionòfor i, en els casos que sigui necessari, l'additiu iònic en tetrahidrofur (THF, Fluka, Suïssa). Amb l'ajuda d'un agitador orbital IKA-VIBRAX-VXR, s'aconsegueix una dissolució homogènia o "còctel sensor". Una composició típica per a una membrana és la que es pot apreciar a la Figura 3.2.

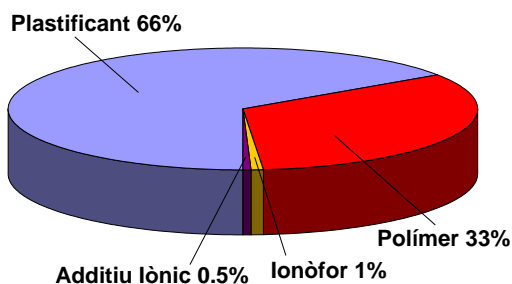


Figura 3.2 Composició típica d'una membrana polimèrica de PVC.

La membrana es forma sobre la superfície rebaixada d'epoxi-grafit del cos de l'elèctrode per evaporació del solvent. Es tracta de dipositar-hi tres gotes del còctel en qüestió i deixar evaporar el THF durant 30 min. El resultat és un material porós i plastificat que actua de suport de l'ionòfor dissolt en un dissolvent orgànic de viscositat apropiada, que és el mateix plastificant. A continuació, es dipositen altres tres gotes de còctel i es deixa evaporar de la mateixa manera. Aquesta operació es repeteix unes sis vegades més per tal d'obtenir un gruix de membrana adequat per a aconseguir una resposta òptima. El següent pas és deixar un mínim de 12 h la membrana formada a l'aire per a assegurar la total evaporació del THF (Figura 3.1 E). Finalment, cal condicionar la membrana deixant-la durant 24 h en contacte amb una solució de concentració 0.1 M de l'ió per al qual és selectiva (Figura 3.1 F).

En el nostre cas, s'han construït elèctrodes selectius a cations i anions. A la Taula 3.1 i la Taula 3.2 es poden observar les composicions en pes de les diferents membranes que s'han preparat durant la present tesi. Les membranes preparades amb PVC-COOH es van usar per a obtenir els biosensors d'urea i creatinina.

Taula 3.1 Composició en pes de les membranes selectives a cations emprades en el desenvolupament de les diferents llengües electròniques.

Membrana selectiva a:	PVC (%)	PVCCOOH (%)	Plastificant (%)	Ionòfor (%)	Additiu (%)	Ref.
Amoni	33	-	BBPA (66)	Nonactina (1)	-	[2]
Amoni	-	33	BBPA (66)	Nonactina (1)	-	[3]
Hidrogen	32.8	-	DOS (65.6)	TDDA (1)	KpCIPB (0.6)	[4]
Hidrogen	-	32.8	DOS (65.6)	TDDA (1)	KpCIPB (0.6)	[5]
Potassi	30	-	DOS (66.7)	Valinomicina (1)	KpCIPB (0.6)	[6]
Sodi	21.76	-	NPOE (70)	CMDMM (6)	KpCIPB (2.24)	[7]
Calci (I)	32.8	-	NPOE (66)	Tetronasina (1)	KpCIPB (0.14)	[8]
Calci (II)	30	-	DOPP (65)	BBTP (5)	-	[9]
Genèric (I)	29	-	DOS (67)	Dibenzo (4)	-	[10]
Genèric (II)	27	-	DBS (70)	Lasalocida (3)	-	[11]

BBPA: adipat de bis(1-butilpentil); DOS: sebacat de dioctil; NPOE: o-nitrofeniloctileter; DOPP: fenilfosfonat de dioctil; DBS: sebacat de dibutil; TDDA: tridodecilamina; CMDMM: malonat de bis[(12-corona-4)metil]-2-dodecil-2-metil; BBTP: bis(bis(4-1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil)fosfat de calci; Dibenzo: dibenzo-18-corona-6; KpCIPB: tetrakis[4-clorofenilborat] potàssic.

Nota: Tots els reactius són de Fluka, excepte el PVC-COOH (Aldrich, WI), el CMDMM (Dojindo Laboratories, Japó) i la tetronasina, subministrada per la Universitat de Cambridge.

Taula 3.2 Composició en pes de les membranes selectives a anions emprades en el desenvolupament de les diferents llengües electròniques.

Membrana selectiva a:	PVC (%)	Plastificant (%)	Ionòfor (%)	Additiu (%)	Ref.
Clorur	30	NPOE (65)	TDMAC (5)	-	[12]
Nitrat	30	DBP (67)	TOAN (3)	-	[13]
Genèric (III)	29	DBP (65)	TOAB (4)	KpCIPB (2)	[14]

NPOE: o-nitrofeniloctileter; DBP: ftalat de dibutil; TDMAC: clorur de tridodecilmetilamoni; TOAN: nitrat de tetraoctilamoni; TOAB: bromur de tetraoctilamoni; KpCIPB: tetrakis[4-clorofenilborat] potàssic.

Nota: Tots els reactius són de Fluka.

3.2.1.3 Construcció de les matrius de sensors serigrafiades

Les matrius de sensors serigrafiades que s'han usat en aquest treball estan constituïdes per cinc sensors, cadascun amb una superfície circular de contacte de 5 mm de diàmetre. Tot el procés de construcció d'aquestes matrius és manual, ja que tenen una configuració especial per a fer més profundes les cavitats dels sensors i poder contenir així les membranes selectives.

El primer pas consisteix en dibuixar les diferents màscares o fotolits amb el disseny adequat i després fabricar els marcs o malles. El substrat usat ha estat policarbonat (0.5 mm de gruix), ja que aquest polímer mostra una molt bona adherència a les diferents tintes emprades. Cada matriu ocupa una àrea de 50 × 75 mm (Figura 3.3 (A)). A la pràctica s'ha usat una superfície més gran de manera que es poden fer vuit matrius alhora.

En primer lloc, es diposita la tinta conductora de plata (Electrodag 1415M, Acheson, MI, Estats Units) sobre la malla amb el disseny preestablert i amb una rasqueta de poliuretà se li proporciona la pressió suficient per a fer-la passar a través de la malla i dipositar-la sobre el policarbonat (B). A continuació, es cura la tinta a 40 °C durant 6 h. Després es diposita el contacte circular de grafit (Electrodag PF-407, Acheson) i es cura amb les mateixes condicions (C). El següent pas consisteix a dipositar la tinta epoxi aïllant (tinta i enduridor, Seripox S-600, Quimovil, Espanya) cobrint els elèctrodes, excepte la superfície sensora i l'extrem, que han de servir de connexió, i deixar-la curar també a 40 °C durant 1 h (D).

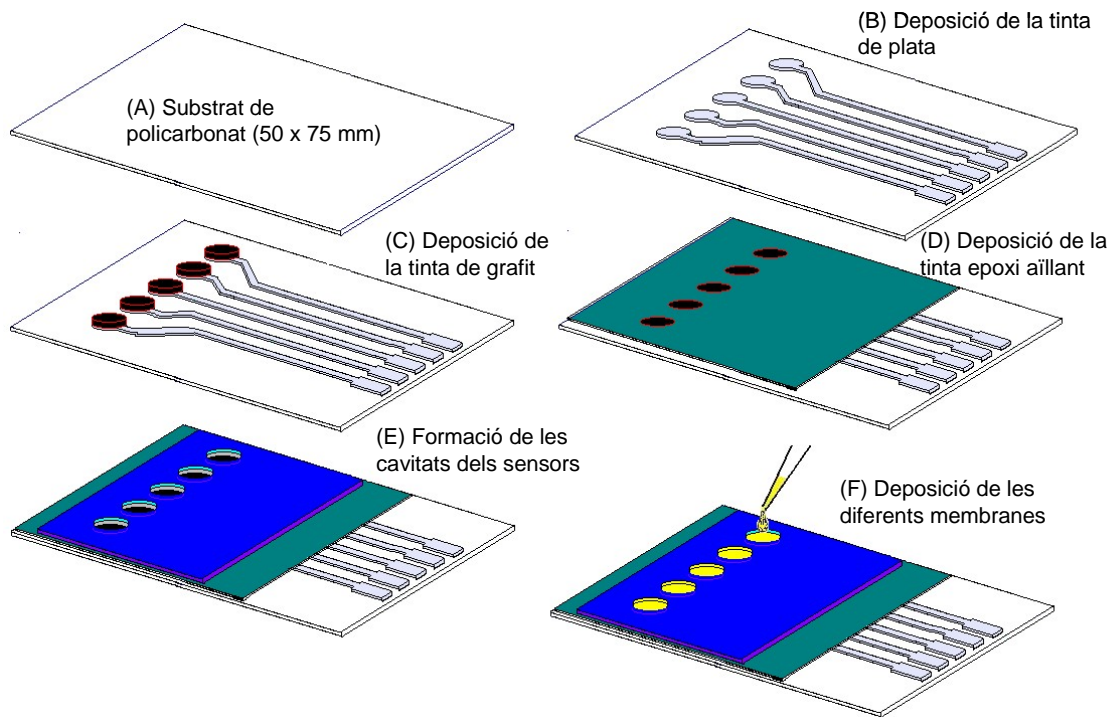


Figura 3.3 Procés de construcció de la matriu serigrafada.

Per a realitzar tots aquests passos d'impressió s'han usat pel·lícules per a obtenir un gruix de les capes de $50\ \mu\text{m}$ (Murakami, Singapur) i una malla de 68 T (Paymser, Espanya), és a dir, d'una densitat de 68 fils/polzada². La lletra T ens indica el diàmetre d'aquests fils i es tracta d'una nomenclatura específica del fabricant. Per a realitzar les cavitats dels sensors és necessari incrementar el gruix del dipòsit de tinta epoxi aïllant fins $400\ \mu\text{m}$. Aquesta deposició s'ha fet en dos passos, usant una malla de menys fils (21 T) (Paymser) amb pel·lícules de $200\ \mu\text{m}$ (Murakami). Es realitza una primera deposició directament sobre la matriu de sensors i una segona sobre un substrat de poliestirè. Per a aconseguir un gruix real de $200\ \mu\text{m}$ és necessari ajustar la viscositat de la tinta epoxídica, modificant la relació entre els seus dos components. Una vegada curat, és fàcil separar la tinta del poliestirè i enganxar-la manualment sobre la matriu per obtenir així les $400\ \mu\text{m}$ totals de la cavitat (E). Finalment, es dipositen les diferents membranes polimèriques de la mateixa manera que s'ha explicat en l'apartat anterior (F).

A la Figura 3.4 es mostra una fotografia de la matriu construïda mitjançant aquest procés on es pot apreciar la fondària de la cavitat generada.

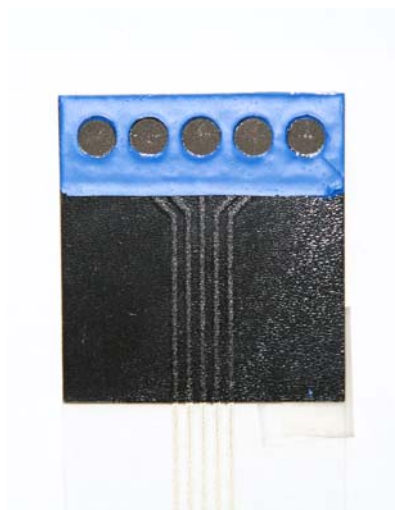


Figura 3.4 Fotografia de la matriu serigrafiada construïda.

3.2.2 Biosensors d'urea i creatinina

S'han fabricat dos tipus de biosensors d'urea, un usant de base l'ESI d'amoni i l'altre usant de base l'ESI de pH, i un tipus de biosensor de creatinina, amb l'ESI d'amoni. Per a la fabricació dels biosensors d'urea s'ha utilitzat l'enzim ureasa (EC 3.5.1.5, 82800 U/g sòlid, Sigma) i per a la fabricació dels biosensors de creatinina s'ha utilitzat l'enzim creatinina deiminasa (EC 3.5.4.21, 12.8 U/mg sòlid, Sigma). La immobilització covalent dels enzims en la membrana de PVC-COOH és anàloga i es realitza mitjançant la reacció de la carbodiimida (Figura 3.5), utilitzant el reactiu N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC, Sigma).

A la Figura 3.6 es mostren els dos passos que s'han seguit per a preparar els biosensors a partir d'un ESI. En primer lloc, es prepara una solució aquosa d'enzim (al voltant de 700 U/ml) i EDAC (6 mg/ml). Es dipositen 60 µl d'aquesta solució sobre la membrana de PVC-COOH sensible a amoni o a pH, i es deixa a la nevera durant 12 hores (G). D'aquesta manera s'aconsegueix l'activació dels grups carboxílics de la membrana i la posterior formació de l'enllaç amida amb els grups amino lliures de l'enzim en un sol pas. Per acabar, es posen els biosensors en el tampó TRIS 0.05 M a pH = 7.5 en agitació durant almenys dues hores per a eliminar l'enzim que hagi pogut quedar adsorbit sobre la membrana (H). Per a mantenir l'activitat de l'enzim, és convenient que els biosensors estiguin submergits en el tampó TRIS dins la nevera quan no s'estigui treballant amb ells[5].

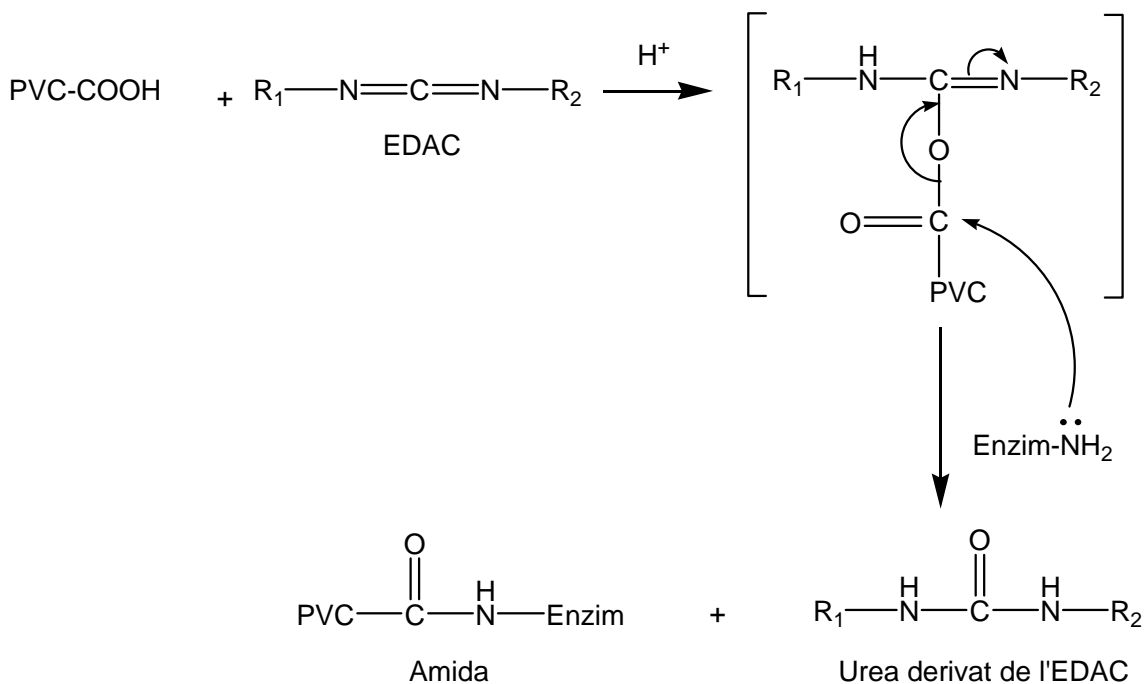


Figura 3.5 Mecanisme de reacció proposat per a la carbodiimida[15].

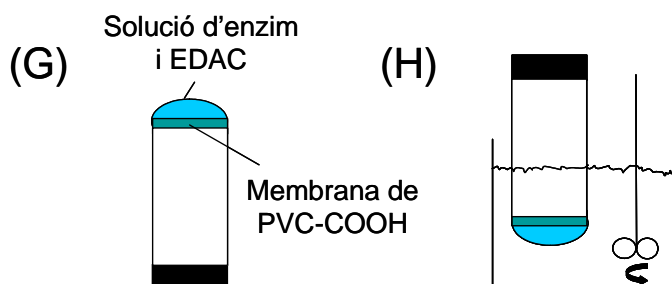


Figura 3.6 Fabricació d'un biosensor a partir d'un ESI amb membrana de PVC-COOH.

3.2.3 Elèctrodes metàl·lics de segona espècie

Per diferents motius, s'han incorporat elèctrodes metàl·lics per a clorur i fosfat a la matriu de sensors per a la seva aplicació en el monitoratge de les concentracions dels ions individuals en l'hivernacle. L'elèctrode de clorur està basat en Ag/AgCl. Per construir-lo s'ha usat una plaqueta de plata (99.9 % de puresa, 0.5 mm de gruix, Aldrich) de 5 mm de diàmetre sobre la qual s'ha electrodepositat una capa de AgCl usant un Autolab PGSTAT (Eco Chimie, Països Baixos). Per a obtenir una

electrodeposició més homogènia, es passen 0.1 mA d'intensitat durant 1 h a través de la cel·la d'hidròlisi, la qual conté una solució 0.1 M NaCl[16].

Per la seva banda, l'elèctrode de fosfat està basat en un fil de cobalt (99.99 % de puresa, 0.5 mm de diàmetre, Goodfellow, Regne Unit) d'1 cm de longitud[17]. Com ja s'ha argumentat en la Introducció General (apartat 1.1.1.2), el mecanisme de resposta d'aquest sensor no està massa clar.

3.3 Instrumentació

3.3.1 *Mesures potenciomètriques al laboratori*

L'elèctrode de referència usat durant la realització de la present tesi ha estat un elèctrode de doble unió Ag/AgCl (model 900200, Thermo Electron, MA, Estats Units), que utilitza com a referència interna una solució de KCl saturada amb AgCl, subministrada per la pròpia casa comercial, i com a referència externa la mateixa solució usada com a fons iònic en l'estudi.

També s'ha usat un pHmetre GLP 22 (Crison, Espanya) amb un elèctrode de vidre que integra el sistema de referència, model 52-03 de la mateixa casa Crison. El calibrat d'aquest equip es realitza amb solucions tamponades de pH 7.00 i pH 4.00 subministrades per Crison també. Aquest mesurador de pH ha estat necessari per a preparar el tampó de TRIS-HCl, per a determinar la resposta dels sensors selectius a ió hidrogen.

S'han fet servir dues sondes de temperatura diferents per als diversos models en els quals s'ha inclòs aquest paràmetre en l'entrenament: una sonda Pt 100 (Crison) comercial i altra construïda al laboratori basada en un circuit integrat LM35 (National Semiconductor, CA, Estats Units).

Per a dur a terme les mesures de potencial entre els diferents sensors fabricats i l'elèctrode de referència, s'han utilitzat tres sistemes multicanal diferents al llarg dels diferents treballs realitzats. Dos d'ells, construïts pel Grup de Sensors i Biosensors (GSB), permeten obtenir les lectures de fins a 32 i vuit elèctrodes alhora, respectivament. Aquests valors de potencial, un cop amplificats i filtrats, són lliurats a la targeta d'adquisició de dades d'un ordinador 4/33 (Intel Inside, CA, Estats Units). El mateix ordinador s'encarrega de tractar les dades capturades per a facilitar-ne la

interpretació mitjançant un programa dissenyat en QuickBASIC (Microsoft, WA, Estats Units), que genera un arxiu de text amb les lectures de tots els sensors en columnes. A la Figura 3.7 es mostra una fotografia d'un d'aquests sistemes.



Figura 3.7 Fotografia del sistema de mesura de 32 canals, la cel·la de mesura i l'ordinador personal.

L'altre sistema, dissenyat i fabricat en col·laboració amb la *Sección de Bioelectrónica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV)*, consta de 12 canals, 11 per a elèctrodes i un més per a la sonda de temperatura construïda. A diferència dels dos anteriors, aquest sistema té incorporat el convertidor A/D (analògic a digital), el qual està regit per un microprocessador (model AT90S8515, Atmel Corp., CA, Estats Units). Aquest microprocessador és el que s'encarrega de transmetre i rebre les dades a través de la interfície serial RS-232, i està programat en llenguatge C. Un esquema i una explicació més acurada sobre el disseny d'aquest sistema han estat inclosos en l'Article III, que es troba a l'apartat d'Articles Publicats[18].

3.3.2 Mesures potenciomètriques en camp

Per la seva més fàcil portabilitat, aquest últim sistema descrit i el sistema de vuit canals construït pel GSB s'han dissenyat expressament pensant en la seva aplicació en camp fora del laboratori. Així doncs, el sistema de vuit canals s'ha portat a les instal·lacions

de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) a Cabrils (Barcelona) per al monitoratge de la solució nutritiva d'un hivernacle hidropònic durant la primera i la segona aproximació. Per a aquestes dues experiències, s'ha usat un *datalogger* Campbell CR10 (Campbell Scientific, UT, Estats Units) en lloc d'un ordinador personal per a registrar les dades. A la Figura 3.8 es mostra una fotografia del sistema de mesura amb la cel·la que tècnics de l'IRTA van dissenyar, construir i instal·lar *on-line*.



Figura 3.8 Fotografia del sistema de mesura de 8 canals, en el seu emplaçament en les instal·lacions de l'IRTA, amb els vuit elèctrodes usats a la primera aproximació i la sonda de temperatura dins la cel·la de mesura.

El sistema dissenyat pel CINVESTAV s'ha usat durant la tercera experiència a l'IRTA, per al monitoratge a la presa IR, per al monitoratge del RCTA, així com en l'aplicació amb la matriu de sensors serigrafiada. A la Figura 3.9 es mostra una fotografia del sistema de mesura durant l'aplicació a la presa IR i a la Figura 3.10, una fotografia del RCTA durant el seguiment realitzat.

En aquestes dues últimes aplicacions de monitoratge ambiental s'ha realitzat la connexió remota entre el sistema de mesura i el PC mitjançant dos terminals de ràdio (model SRM6100, Data-Linc Group, WA, Estats Units) que operen a 2.4-2.4835 GHz. Això ha permès separar físicament els dos sistemes, el de mesura i el de tractament i emmagatzematge de dades, 2 metres en el cas del monitoratge del RCTA i 120 metres, aproximadament, en el cas de la presa IR. A la Figura 3.11 es mostra una fotografia de

l'ordinador portàtil usat durant el seguiment a la presa IR connectat al terminal a través del qual es rebien les lectures dels sensors.



Figura 3.9 Fotografia del sistema de mesura de 12 canals durant el seguiment a la presa IR.



Figura 3.10 Fotografia del RCTA amb la matriu de sensors en un moment del seguiment.



Figura 3.11 Fotografia de l'ordinador portàtil connectat a un dels terminals de ràdio durant l'aplicació a la presa IR.

3.4 Metodologia de càlcul

3.4.1 *Caracterització dels sensors i biosensors*

La caracterització d'un sensor o biosensor consisteix a avaluar la seva resposta en front de l'analit al qual és selectiu. Per això el que es fa és determinar els seus paràmetres característics, tals com la sensibilitat, el límit de detecció (LD), el rang de resposta lineal, el temps de resposta i el temps de vida. Així es veurà la idoneïtat d'implementar el sensor o biosensor en la matriu. A la pràctica, aquesta caracterització es realitza a través d'un calibratge. Per a cada calibratge s'utilitzen dos replicats dels sensors o biosensors construïts amb la mateixa composició de la membrana potenciomètrica i metodologia.

El procediment consisteix a fer addicions successives de microvolums de patrons de concentracions perfectament conegudes sobre un cert volum conegut de solvent (mètode de les addicions conegudes o de l'addició d'analit). Això permet conèixer la concentració d'analit que hi ha en contacte amb els elèctrodes després de cada addició. En el nostre cas, el volum de dissolvent és sempre de 25.0 ml amb agitació magnètica. Les dissolucions estàndard emprades per als calibratges són de concentracions 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} i 1.0 M, preparades per pesada directa de la 1.0 M i posterior dilució d'aquesta.

Per a calibrar els elèctrodes selectius a ió hidrogen, es prepara una solució que conté 10 mM de K_2HPO_4 , 10 mM de citrat, 10 mM d'acid bòric i 100 mM de NaCl[5]. Aquesta solució és el que s'anomena un tampó universal, ja que aconseguix tamponar el medi en tot el rang de pH. Es parteix de 50 ml d'aquesta solució i, afegint NaOH 1.0 M, es porta el pH a 12. Seguidament es fan microaddicions successives de HCl 1.0 M mesurant el pH i el potencial després de cada addició fins arribar a pH = 2. A la Figura 3.12 es mostra un dels calibratges obtinguts en la caracterització dels elèctrodes de pH.

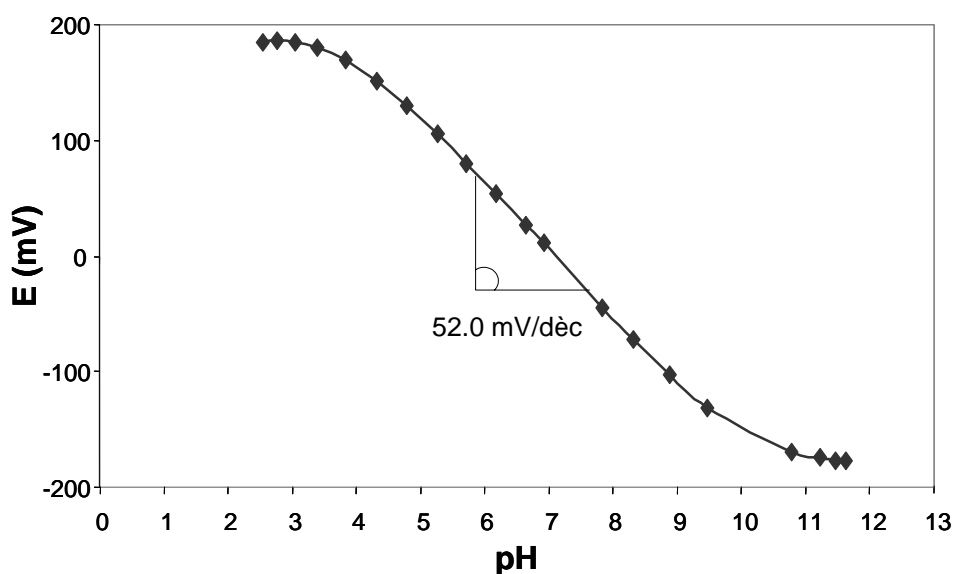


Figura 3.12 Calibratge obtingut per a un elèctrode selectiu a H^+ en medi tampó universal.

Tots els sensors potenciomètrics mesuren el potencial de membrana, el qual està relacionat amb l'activitat de l'ió principal per l'equació de Nernst (3.1), però també pot estar relacionat amb l'activitat dels ions interferents per la relació de Nikolskii-Eisenmann (3.2).

$$E = E_0 + (RT / z_i F) \cdot \ln a_i \quad (3.1)$$

$$E = E_0 + (RT / z_i F) \cdot \ln \left[a_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} (a_j)^{z_i / z_j} \right] \quad (3.2)$$

on E és el potencial de l'elèctrode en front de l'elèctrode de referència (mV), E_0 és el potencial estàndard típic de cada elèctrode (mV), R és la constant dels gasos ($8.314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T és la temperatura absoluta (K), F és la constant de Faraday ($9.6485\cdot 10^4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$), a_i i z_i són l'activitat i la càrrega de l'ió principal, a_j i z_j són l'activitat i la càrrega dels ions interferents i $K_{i,j}^{pot}$ és el coeficient de selectivitat potenciomètrica.

Si s'agrupen els termes constants, les equacions de Nernst i de Nikolskii-Eisenmann apareixen simplement com:

$$E = E_0 + s \cdot \log a_i \quad (3.3)$$

$$E = E_0 + s \cdot \log \left[a_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (3.4)$$

on s és el pendent de la corba de calibratge, que es coneix com a sensibilitat de l'elèctrode, i que té un valor teòric de 59.16 mV/dècada de concentració en el cas d'un ió monovalent a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pels sistemes estudiats, amb múltiples ions involucrats i interferències creuades, el model complet de Nikolskii resulta complex i altament no lineal.

L'activitat és la concentració efectiva de l'espècie que es mesura en la dissolució i es relaciona amb la concentració per mitjà de l'equació:

$$a_i = \gamma_i \cdot c_i \quad (3.5)$$

on c_i és la concentració de l'ió i γ_i és el seu coeficient d'activitat, el qual està relacionat amb la força iònica del medi (I):

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{-A \cdot |z_+ \cdot z_-| \cdot \sqrt{I}}{1 + B \cdot \sqrt{I}} + C \cdot I \quad (3.6)$$

on A és una constant que, per a solucions aquoses a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, val 0.5108 , B i C són valor tabulats per a cada espècie iònica[19], i z_+ i z_- són la càrrega del catió i anió de l'electròlit, respectivament.

La força iònica d'una solució es pot calcular usant l'expressió:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^i z_n^2 \cdot c_n \quad (3.7)$$

on z_n és la càrrega de cada ió n en solució i c_n , la seva concentració.

Si es treballa amb un medi de concentració salina elevada, es pot considerar que la força iònica és constant per a totes les solucions i , per tant, que el coeficient d'activitat, calculat a partir de l'equació 3.6, també es manté constant.

Com a conseqüència de fer aquestes consideracions, les equacions 3.3 i 3.4 es simplifiquen, ja que el potencial varia en funció del logaritme de la concentració i no del logaritme de l'activitat de l'analít. Només en aquest cas les corbes de calibratge s'obtenen representant el potencial llegit enfront del logaritme de la concentració de l'espècie estudiada (Figura 3.13). Si el medi de fons és aigua bidestil·lada, es representa en front de l'activitat de l'espècie.

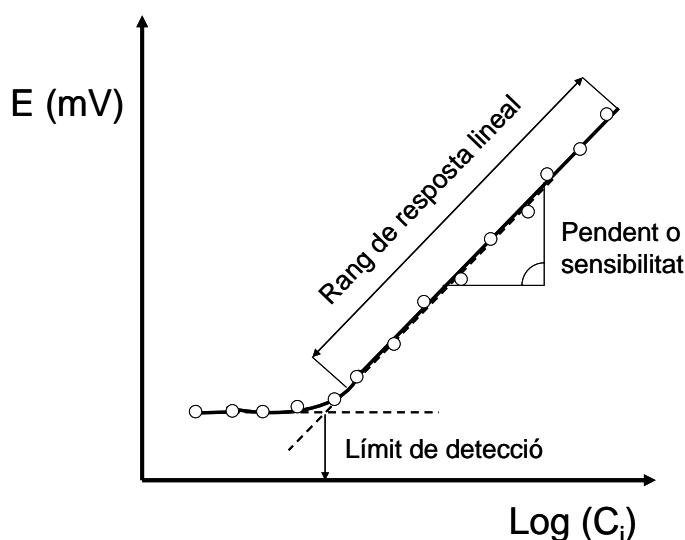


Figura 3.13 Típica corba de calibratge d'un ESI en un medi de concentració salina elevada.

Una de les definicions més acceptades del LD ens diu que és l'activitat (o la concentració) de l'ió principal en el punt de la intersecció entre l'extrapolació de la zona lineal de resposta i la zona normalment horitzontal que correspon a les concentracions més baixes [20]. No obstant, al present treball es va fer servir una definició que deriva de la utilització de mètodes no lineals d'ajust. El paràmetre LD s'obté de l'ajust de la totalitat dels punts de la corba de calibratge a l'equació no lineal:

$$E = A + B \cdot \log(a_i + C) \quad (3.8)$$

on B és la sensibilitat de l'ESI, a_i és l'activitat de l'ió principal calculada i C és el sumatori entre el LD i l'efecte de les possibles interferències:

$$C = LD + \sum_j K_{i,j}^{pot} (a_j)^{z_i/z_j} \quad (3.9)$$

Així doncs, quan es fa servir un medi sense ions interferents s'obté el LD directament de l'ajust no lineal de la corba de calibratge, ja que correspon al terme C . El software utilitzat per a fer aquests ajustos va ser el Sigmaplot 8.0 (SPSS, IL, Estats Units).

Finalment, un últim paràmetre important en l'avaluació d'un sensor és el temps de vida, és a dir, el temps durant el qual les característiques de resposta del sensor no es veuen afectades pel seu ús, unes condicions de conservació indegudes o per l'alteració dels seus components electroactius. Per a avaluar el temps de vida dels biosensors, s'han fet seguiments de la sensibilitat i el LD amb el temps de dos dispositius replicats que es conservaven submergits en tampó TRIS. A part de les alteracions típiques dels ESIs, tals com la dissolució de l'ionòfor o la exsudació del plastificant[21], els biosensors poden sofrir d'altres com la pèrdua d'activitat de l'enzim. A més també s'ha avaluat de la mateixa manera el temps de vida dels elèctrodes serigrafiats, usant tres dispositius replicats basats en l'ionòfor dibenzo-18-corona-6. En aquest cas, els elèctrodes es conservaven submergits en aigua i els calibratges es feien en funció de la concentració d'ió potassi. L'alteració més important d'aquest tipus de dispositiu és la falta d'adherència de la membrana polimèrica als materials impresos en el suport de policarbonat.

3.4.2 Generació de la informació

Les matrius de sensors i/o biosensors de les diferents llengües electròniques desenvolupades estan formades per un número variable d'elèctrodes; des dels cinc de la matriu serigrafiada fins els 12 de la matriu per a determinar urea, creatinina i ions alcalins. Amb aquests sensors es pretén recollir la màxima informació de les variables. Per a cada diferent aplicació, cal preparar un conjunt de dissolucions amb

concentracions conegudes de les espècies que volem determinar, les quals serviran per a entrenar i/o calibrar el nostre sistema. L'elecció d'aquest conjunt de mostres és especialment crítica, ja que ha de definir perfectament el rang de concentracions en el que volem treballar (domini experimental o espai dels experiments). A la pràctica aquestes mostres d'entrenament o calibratge s'han de preparar amb diferents continguts de les espècies a determinar i que a la vegada cobreixin un ampli interval de concentracions per a cadascuna d'elles.

Taula 3.3 Composició de les 27 solucions d'entrenament, generades a partir d'un DFC 3^3 , utilitzades a la llengua electrònica desenvolupada amb la matriu serigrafada.

Dissolució	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)
1	0.1	0.1	0.1
2	0.1	0.1	1.0
3	0.1	0.1	10
4	0.1	1.0	0.1
5	0.1	1.0	1.0
6	0.1	1.0	10
7	0.1	10	0.1
8	0.1	10	1.0
9	0.1	10	10
10	1.0	0.1	0.1
11	1.0	0.1	1.0
12	1.0	0.1	10
13	1.0	1.0	0.1
14	1.0	1.0	1.0
15	1.0	1.0	10
16	1.0	10	0.1
17	1.0	10	1.0
18	1.0	10	10
19	10	0.1	0.1
20	10	0.1	1.0
21	10	0.1	10
22	10	1.0	0.1
23	10	1.0	1.0
24	10	1.0	10
25	10	10	0.1
26	10	10	1.0
27	10	10	10

La preparació d'aquestes dissolucions s'ha realitzat de manera manual, una a una, a partir de dissolucions concentrades dels analits i enrasant amb el medi de fons corresponent fins els 50 ml. Per això, s'havia de buscar un compromís sobre el nombre de mostres que, a la vegada, cobreixi l'espai a entrenar. Els dissenys factorials complets (DFC) són els que millor caracteritzen un domini experimental. En dues de les llengües

electròniques desenvolupades en la present tesi, s'ha fet servir un DFC $3^3 = 27$ mostres, amb tres nivells de concentració i tres factors (els tres ions considerats: amoni, potassi i sodi) per a generar les mostres d'entrenament. Concretament, es tracta de la llengua electrònica per al monitoratge de la presa IR i la llengua electrònica basada en una matriu de sensors serigrafiada. A la Taula 3.3 es pot observar la composició d'aquestes mostres per al cas de la matriu serigrafiada i a la Figura 3.14, la representació tridimensional dels punts de la Taula 3.3 que dóna com a resultat un espai d'entrenament en forma de cub.

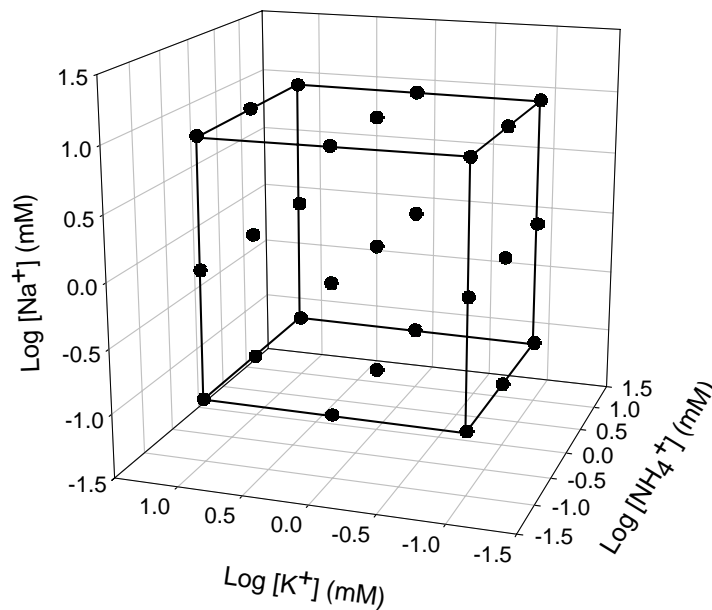


Figura 3.14 Representació tridimensional de l'espai d'entrenament generat a partir d'un DFC 3^3 en l'aplicació de la llengua electrònica serigrafiada.

No obstant això, el nombre d'experiències en un DFC augmenta de manera exponencial amb el nombre de factors, és a dir, amb el nombre d'espècies a determinar. Així, amb quatre analits i dos nivells de concentració, alt i baix, tindríem $2^4 = 16$ experiments i per a un DFC amb tres nivells, el número d'experiències puja fins a 81 ($3^4 = 81$ experiments). El primer cas no definiria correctament el nostre espai d'entrenament mentre que a l'incrementar el nombre de nivells, ràpidament s'arriba a un número d'experiències del tot inviable a la pràctica. És per això que en la resta de sistemes desenvolupats en aquesta tesi s'han considerat els dissenys factorials fraccionats (DFF), en els quals es realitza una selecció dels experiments que conformen el disseny complet. Sempre s'ha optat per escollir un DFF amb 3 nivells de concentració del tipus

$3^{x-y} = 27$ solucions, amb $x =$ nombre d'analits. D'aquesta manera es compleix el compromís que ens havíem fixat anteriorment sobre el nombre de mostres. Aquest és el cas, per exemple, de les llengües electròniques desenvolupades per al monitoratge a l'hivernacle. A la tercera aproximació, el model està format per sis analits: amoni, potassi, sodi, clorur, nitrat i fosfat; per tant el DFF construït ha estat $3^{6-3} = 27$ mostres d'entrenament, la composició de les quals es troba a la Taula 3.4. El software utilitzat per a fer l'elecció de les mostres ha estat el MODDE, versió 8.0, de la casa UMETRICS (Umetrics, NJ, Estats Units).

Taula 3.4 Composició de les 27 solucions d'entrenament, generades a partir d'un DFF 3^{6-3} , utilitzades a la llengua electrònica de la tercera aproximació en el monitoratge dels hivernacles.

Dissolució	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)	[Cl ⁻] (mM)	[NO ₃ ⁻] (mM)	[PO ₄ ³⁻] (mM)
1	0.033	0.31	0.57	0.55	1.49	0.090
2	0.033	0.31	0.56	0.55	4.99	1.49
3	0.031	0.29	0.53	0.52	14.9	15.0
4	0.032	2.98	3.00	2.98	1.46	0.088
5	0.032	2.98	2.99	2.98	4.97	1.49
6	0.030	2.96	2.96	2.95	14.9	15.0
7	0.029	15.0	14.9	14.9	1.33	0.080
8	0.029	15.0	14.9	14.9	4.83	1.48
9	0.027	14.9	14.9	14.9	14.7	15.0
10	1.47	0.30	2.99	14.9	1.44	1.49
11	1.47	0.29	2.97	14.9	4.90	15.0
12	1.47	0.29	2.97	14.9	14.9	0.085
13	1.47	2.98	15.0	0.54	1.45	1.49
14	1.47	2.97	14.9	0.52	4.91	15.0
15	1.47	2.98	14.9	0.53	14.9	0.086
16	1.47	15.0	0.52	2.95	1.37	1.48
17	1.47	15.0	0.50	2.93	4.83	15.0
18	1.47	15.0	0.51	2.93	14.8	0.080
19	15.0	0.29	14.9	2.96	1.41	15.0
20	15.0	0.30	15.0	2.98	4.97	0.088
21	15.0	0.29	14.9	2.97	14.9	1.49
22	15.0	2.96	0.52	14.9	1.36	15.0
23	15.0	2.97	0.53	14.9	4.93	0.085
24	15.0	2.97	0.52	14.9	14.9	1.48
25	15.0	15.0	2.94	0.49	1.31	15.0
26	15.0	15.0	2.96	0.50	4.88	0.082
27	15.0	15.0	2.94	0.49	14.8	1.48

El preu que es paga per disminuir la mida de l'experiment és, doncs, la pèrdua d'informació o l'accés a una part limitada d'aquesta. No obstant, aquest inconvenient es pressuposa que serà corregit per una xarxa neuronal artificial, gràcies a la seva capacitat de generalització per a poder predir punts que no han participat a l'entrenament.

Per altra banda, en moltes situacions del món real, es necessiten més de tres nivells de concentració per a obtenir un model de calibratge o entrenament prou sensible. Existeixen treballs que proposen, com a mínim, 4 o 5 nivells per component de la mostra amb un número d'experiments a realitzar no gaire elevat[22]. D'una manera molt senzilla es poden extrapolar aquestes idees al nostre DFF i fer que no es repeteixi cap concentració de cap espècie, obtenint així un disseny amb 27 nivells per a cadascun dels analits. Aquesta és la estratègia que s'ha fet servir en el cas de les dues llengües electròniques desenvolupades emprant biosensors. A la Taula 3.5 es troba el disseny 3^{5-2} amb 27 nivells de concentració que s'ha fet servir per a entrenar la llengua electrònica per a la determinació simultània d'urea, creatinina i ions alcalins en mostres clíniques.

Taula 3.5 Composició de les 27 solucions d'entrenament, generades a partir d'un DFF 3^{5-2} amb 27 nivells de concentració per a cada espècie, utilitzades a la llengua electrònica per a la determinació simultània d'urea, creatinina i ions alcalins.

Dissolució	[Urea] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)	[Creatinina] (mM)
1	0.10	0.043	1.58	1.57	3.14
2	0.48	0.10	3.29	5.00	2.76
3	0.86	0.16	5.00	3.29	2.38
4	1.24	0.21	1.38	4.81	6.58
5	1.62	0.27	3.10	3.10	6.20
6	2.00	0.33	4.81	1.38	5.82
7	2.38	0.39	1.19	2.91	10.0
8	2.77	0.44	2.91	1.19	9.62
9	3.15	0.50	4.60	4.60	9.24
10	3.53	0.024	1.00	4.40	5.44
11	3.91	0.081	2.72	2.72	5.04
12	4.30	0.14	4.40	1.00	4.68
13	4.70	0.20	0.81	2.53	8.86
14	5.10	0.25	2.53	0.81	8.48
15	5.40	0.31	4.20	4.20	8.10
16	5.80	0.37	0.62	0.62	2.00
17	6.19	0.42	2.33	4.00	1.62
18	6.60	0.48	4.00	2.33	1.24
19	7.00	0.0050	0.43	2.14	7.72
20	7.30	0.062	2.14	0.43	7.34
21	7.70	0.12	3.86	3.86	6.96
22	8.10	0.18	0.24	0.24	0.86
23	8.50	0.23	1.95	3.67	0.48
24	8.90	0.29	3.67	1.95	0.10
25	9.20	0.35	0.050	3.48	4.28
26	9.60	0.40	1.76	1.76	3.90
27	10.0	0.46	3.48	0.050	3.52

Per a poder visualitzar el mètode, considerem per exemple el DFC amb 3 analits i 3 nivells de concentració ($3^3 = 27$ experiments) que s'ha construït anteriorment per a la llengua desenvolupada amb la matriu serigrafiada (Taula 3.3 i Figura 3.14). La idea és obtenir un nou disseny en el qual tinguem tants nivells de concentració com punts experimentals, tenint com a base aquest DFC 3^3 . El que fem és considerar concentracions que cobreixin tot el rang de treball de cada substància i reorganitzar-les segons la matriu d'experiències. L'efecte que veiem en la Figura 3.15, on es representen els punts de la Taula 3.6, és un petit gir sobre 2 eixos del domini experimental, en aquest cas el cub:

Taula 3.6 Concentracions del nou disseny amb 27 nivells construït a partir del DFC 3^3 amb tres nivells de la llengua electrònica desenvolupada amb la matriu serigrafiada.

Dissolució	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)
1	0.10	0.14	0.41
2	0.12	0.24	2.03
3	0.14	0.41	10.0
4	0.17	0.70	0.35
5	0.20	1.19	1.70
6	0.24	2.03	8.38
7	0.29	3.46	0.29
8	0.35	5.88	1.43
9	0.41	10.0	7.02
10	0.49	0.12	0.24
11	0.59	0.20	1.19
12	0.70	0.35	5.88
13	0.84	0.59	0.20
14	1.00	1.00	1.00
15	1.19	1.70	4.92
16	1.43	2.89	0.17
17	1.70	4.92	0.84
18	2.03	8.38	4.12
19	2.42	0.10	0.14
20	2.89	0.17	0.70
21	3.46	0.29	3.46
22	4.12	0.49	0.12
23	4.92	0.84	0.59
24	5.88	1.43	2.89
25	7.02	2.42	0.10
26	8.38	4.12	0.49
27	10.0	7.02	2.42

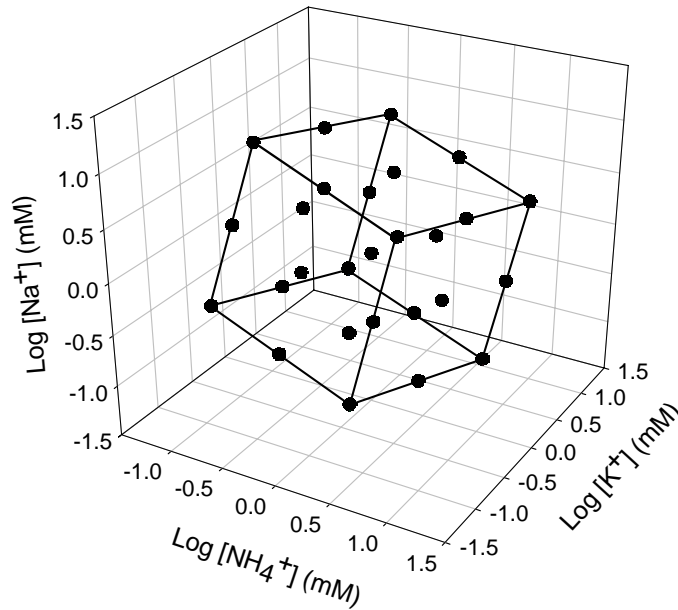


Figura 3.15 Domini experimental del nou disseny.

Altra variable considerada en moltes de les llengües electròniques desenvolupades en aquesta tesi ha estat la temperatura de la solució, en part per que les diferents aplicacions exigeixen que la matriu de sensors estigui exposada a les condicions meteorològiques fora de l'ambient controlat del laboratori. Es pretén cobrir un espai d'entrenament suficientment ampli com per a compensar l'efecte del cicle dia-nit sobre la resposta dels sensors. La manera d'incorporar-la als dissenys experimentals descrits fins ara ha estat passar les mostres en tres torns, cadascun a un nivell de temperatura diferent: un, amb totes elles a temperatura ambient (al voltant dels 24 °C); altre, amb la meitat a una temperatura més baixa (al voltant de 10 °C), i un últim torn amb la meitat de mostres restant a una temperatura superior (al voltant de 35 °C).

Aquesta seqüència experimental es portava a terme en dos o tres dies, per la qual cosa el factor dia de mesura també es va considerar com a variable en la primera aproximació de la llengua electrònica per al monitoratge als hivernacles. Aquest valor és un número sencer (1, 2 o 3), amb el qual s'intenten corregir els efectes d'història que presenten els elèctrodes en forma de deriva de potencial. Per a la resta de llengües electròniques desenvolupades en les quals les mesures no s'han pogut realitzar en un sol dia, la solució proposada per a corregir aquestes derives es basa en la lectura diferencial dels

potencials respecte una solució de referència, de composició coneguda i diferent per a cada aplicació, que es mesurava de manera periòdica.

3.4.3 Tractament de les dades mitjançant xarxes neuronals artificials

Les mesures de potencial obtingudes de les solucions que formen aquests dissenys d'experiments generats per a cada llengua electrònica s'han usat per a construir un model de resposta emprant Xarxes Neuronals Artificials (XNA). Aquesta eina però exigeix un conjunt de mostres que no hagin participat en l'entrenament, anomenat conjunt de validació externa o test, que serveix per a comprovar la capacitat de predicció dels diferents models. Per això, es generen al voltant de 10 mostres més, amb la mateixa metodologia que les mostres d'entrenament, però amb les concentracions dels diferents analits calculades de forma aleatòria i amb la màxima dispersió, per tal de distribuir-les per tot l'espai d'entrenament. L'algorisme emprat, el de Regularització Bayesiana[23], no necessita un tercer grup de mostres (mostres de validació interna) que serveix per a detectar problemes de sobreentrenament de la xarxa i que és típic de la major part d'algorismes, com el descens de gradient. Per altra banda, totes les XNAs construïdes són del tipus unidireccional (*feedforward Neural Network*) i s'entrenen amb retropropagació (*backpropagation*).

En l'elecció de la XNA, hi ha dos factors fixats a priori: el nombre d'entrades, una per a cada senyal, i el nombre de sortides, una per a cada espècie a determinar.

Així, en les tres llengües electròniques desenvolupades per al monitoratge en hivernacles, la XNA de la primera i segona aproximacions està formada per cinc sortides, corresponents a les concentracions dels cinc ions considerats (amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat), mentre que la tercera aproximació té una sortida més per la incorporació del fòsfat al model. També hi ha variació en el número d'entrades, per que si bé totes tres aproximacions consideren els potencials dels elèctrodes (vuit en la primera i segona, i 11 en la tercera) i la temperatura de la solució nutritiva, només la primera considera també el dia de mesura com a entrada (Figura 3.16).

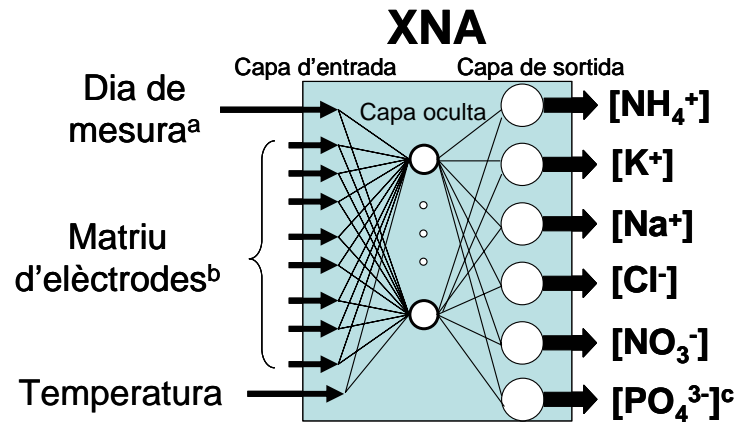


Figura 3.16 Esquema del processat de les XNAs emprades en les llengües electròniques per al monitoratge de la solució de nutrició en els hivernacles. (a) entrada només considerada a la primera aproximació, (b) vuit elèctrodes per a la primera i segona, i 11 per a la tercera aproximació, (c) sortida només considerada a la tercera aproximació.

En les llengües electròniques desenvolupades per a aplicacions mediambientals, totes consideren els potencials dels elèctrodes (nou per al monitoratge de la presa IR, 11 per al monitoratge del RCTA i cinc per a la matriu serigrafada) com a entrades de la xarxa. A més, les dues llengües per al monitoratge consideren també la temperatura de la solució. Pel que fa a les sortides, totes tenen les corresponents als ions amoni, potassi i sodi. A més, la llengua per al monitoratge del RCTA incorpora dues sortides més, les corresponents als anions clorur i nitrat.

Pel que fa a les dues llengües electròniques desenvolupades emprant biosensors, la XNA està formada per 12 entrades, que corresponen als potencials dels 12 elèctrodes que formen la matriu. En canvi, la primera d'elles té quatre sortides, que corresponen a les concentracions de les quatre espècies estudiades (urea, amoni, potassi i sodi), mentre que la segona en té cinc, ja que s'està considerant una espècie més, la creatinina.

En la modelització emprant XNAs, altres paràmetres o característiques estan definits també gràcies a l'experiència prèvia del grup d'investigació en XNAs[24, 25]: totes les dades d'entrada a la xarxa es van normalitzar entre -1 i 1; la funció de transferència de la capa de sortida va ser lineal (*purelin*) i també es van fixar els valors de la velocitat d'aprenentatge $\alpha = 0.1$ i de moment $\beta = 0.4$. A més, s'ha comprovat que les arquitectures amb una sola capa oculta són adequades per als casos tractats en aquesta tesi.

Així doncs, per a tenir complement definit el model caldrà estudiar i posteriorment definir el número de neurones i la funció de transferència de la capa oculta. Els càlculs

d'aquestes estructures s'han realitzat mitjançant uns programes desenvolupats amb rutines disponibles al Neural Network Toolbox (versió 4.0.2, Mathworks, MA, Estats Units) en l'entorn MATLAB (MATLAB 6.1, Mathworks). Aquest software permet un control gairebé absolut sobre els paràmetres que es poden adaptar per tal d'obtenir bons ajustos del model.

La qualitat dels models es determina utilitzant les dades de les mostres de validació externa, les que no han participat en cap moment en l'entrenament. Per una banda, es representen els valors de concentració esperats en front dels predits pel model generat. Com més proper sigui el valor del pendent d'aquesta recta a la unitat i com més proper sigui el valor de la intersecció amb l'ordenada a l'origen a zero, millor. També prestem atenció a la correlació dels punts (r), per a assegurar que realment es troben en una recta. Per altra banda, es busca minimitzar el valor de l'arrel de l'error quadràtic mig (RMSE, de l'anglès *root mean squared error*):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}} \quad (3.8)$$

A on y_i és el valor de concentració trobat per la XNA, \hat{y}_i és el valor esperat i n és el nombre de mostres processades, en aquest cas, les mostres de validació externa o *test-set*.

3.4.4 Tractament de les dades mitjançant la regressió per mínims quadrats parcials

En el desenvolupament de la primera llengua electrònica emprant biosensors per a la determinació simultània d'urea, amoni, potassi i sodi, s'ha considerat una altra eina de calibratge multicomponent per a construir el model, la regressió per mínims quadrats parcials (PLS, de l'anglès *partial least squares*). A diferència de les XNAs, el PLS és un mètode de calibratge lineal. És a dir, que necessita una relació lineal entre la variable dependent i els paràmetres de la regressió, que en aquest cas són els potencials dels elèctrodes de la matriu. És per això que s'ha usat el logaritme decimal de les concentracions com a variable dependent.

Un dels punts amb més dificultat a l'hora de realitzar un PLS és determinar el nombre correcte de components principals o factors en el model, de manera que s'eviti tant el sobreajust com la manca d'ajust[26]. En el estudi realitzat, el mètode usat per a obtenir el nombre de factors està basat en la suma dels quadrats dels errors de predicció (PRESS, de l'anglès *prediction residual error sum of squares*), que es defineix com:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2 \quad (3.9)$$

on n és el nombre de mostres de predicció, en aquest les 10 mostres de validació externa, m és el nombre de variables dependents, que són les quatre espècies a determinar, y és el valor de concentració predit pel model i \hat{y} és el valor esperat. Es parteix de la idea que l'error disminueix a l'augmentar el nombre de components principals que s'utilitzen en el model, fins que arriba un moment que els nous factors introduïts únicament expliquen soroll i la funció PRESS torna a augmentar degut al sobreajust.

El software utilitzat per a construir aquest model és el SIMCA, versió P 8.0, de la casa UMETRICS (Umetrics).

3.5 Bibliografia

- [1] J. Gallardo, S. Alegret, M.A. de Román, R. Muñoz, P.R. Hernández, L. Leija, M. del Valle, *Analytical Letters*, **36** (2003) 2893-2908
- [2] O.G. Davies, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, *The Analyst*, **113** (1988) 497-500
- [3] R. Koncki, A. Radomska, S. Glab, *Analytica Chimica Acta*, **418** (2000) 111-118
- [4] P. Schulthess, Y. Shijo, H.V. Pham, E. Pretsch, D. Ammann, W. Simon, *Analytica Chimica Acta*, **131** (1981) 111-116
- [5] S. Glab, R. Koncki, E. Koczewska, I. Walcerz, A. Hulanicki, *Talanta*, **41** (1994) 1201-1205
- [6] H. Shen, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, *The Analyst*, **123** (1998) 2181-2184
- [7] H. Tamura, T. Shono, K. Kimura, *Analytical Chemistry*, **54** (1982) 1224-1227
- [8] D. Calvo, J. Bartrolí, M. del Valle, *Electrochimica Acta*, **51** (2006) 1569-1575
- [9] R.W. Morton, J.K. Chung, J.L. Miller, J.P. Charlton, R.S. Fager, *Analytical Biochemistry*, **157** (1986) 345-352

- [10] Y. Umezawa, (Ed.), *Handbook of Ion-Selective Electrodes. Selectivity Coefficients*. Boca Raton, FL, CRC Press (1990)
- [11] K. Suzuki, K. Tohda, H. Aruga, M. Matsuzoe, H. Inoue, T. Shirai, *Analytical Chemistry*, **60** (1988) 1714-1721
- [12] A. Legin, S. Makarychev, D. Kirsanov, J. Mortensen, Y. Vlasov, *Analytica Chimica Acta*, **514** (2004) 107-113
- [13] R. Pérez-Olmos, A. Ríos, J.R. Fernández, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, *Talanta*, **53** (2001) 741-748
- [14] I. Isildak, A. Asan, *Talanta*, **48** (1999) 967-978
- [15] D. Sehgal, I.K. Vijay, *Analytical Biochemistry*, **218** (1994) 87-91
- [16] S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoçi, (Eds.), *Sensores electroquímicos*. Bellaterra, Espanya, Universitat Autònoma de Barcelona (2004)
- [17] R. de Marco, C. Phan, *Talanta*, **60** (2003) 1215-1221
- [18] M. Gutiérrez, J.M. Gutiérrez, S. Alegret, L. Leija, P.R. Hernández, L. Favari, R. Muñoz, M. del Valle, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **88** (2008) 103-117
- [19] P.C. Meier, *Analytica Chimica Acta*, **136** (1982) 363-368
- [20] J. Inczèdy, T. Lengyel, A.M. Ure, *Compendium of analytical nomenclature IUPAC*. Oxford, Blackwell Science (1998)
- [21] J. Gallardo, *Llengües electròniques basades en sensors potenciomètrics, Tesi doctoral*. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona (2005)
- [22] R.G. Brereton, *The Analyst*, **122** (1997) 1521-1529
- [23] H. Demuth, M. Beale, (Eds.), *Neural Network Toolbox User's Guide*. Natick, MA, Mathworks (1992)
- [24] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. de Román, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377** (2003) 248-256
- [25] M. Cortina, A. Gutés, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta*, **66** (2005) 1197-1206
- [26] E.R. Malinowski, (Ed.), *Factor Analysis in Chemistry*, 2nd Edition. Nova York, NY, Wiley (1991)

CAPÍTOL 4: DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

Capítol 4

Discussió global dels resultats

4.1 Introducció

Els sensors químics tenen avui dia un renovat interès degut a les creixents necessitats actuals de la societat de disposar de més i millor informació analítica. No obstant, la manca de sensors ideals específics per a una espècie determinada va portar al nostre grup d'investigació a explorar les possibilitats de les llengües electròniques. Aquests sistemes analítics, bioinspirats en el sentit del gust, consideren un conjunt o matriu de sensors i/o biosensors amb selectivitat creuada, i no un únic sensor. La rica i abundant informació obtinguda és posteriorment tractada amb eines de calibratge multivariable, com les xarxes neuronals artificials (XNA) o la regressió per mínims quadrats parcials (PLS), per a extreure la informació analítica útil.

La present tesi doctoral va començar enfocada en el desenvolupament, per primera vegada en el grup, de llengües electròniques potenciomètriques basades en matrius de biosensors. Concretament, es va construir una llengua electrònica per a la determinació simultània d'urea, amoni, potassi i sodi en mostres clíniques. Per això es van haver de

construir i caracteritzar abans diferents biosensors d'urea basats en l'enzim ureasa i estudiar la seva idoneïtat per a ser implementats en la matriu.

No obstant, amb l'experiència adquirida amb aquest primer sistema, es van iniciar i continuar altres diferents aplicacions de les llengües electròniques potenciomètriques, les quals van servir per a abordar tres requisits clau per als sistemes sensors: petites dimensions, baix cost i generació d'informació en temps real i *in-situ*. Per als dos primers aspectes, es va considerar la fabricació de matrius de sensors potenciomètrics mitjançant la tècnica serigràfica (*screen-printing* en anglès) que permet la miniaturització i la producció massiva, en col·laboració amb el *Centro de Investigación y Estudios Avanzados* (CINVESTAV) de Mèxic. Aquesta matriu serigrafiada va servir per a desenvolupar una llengua electrònica per a la quantificació simultània d'ions alcalins en mostres mediambientals. Per al tercer aspecte considerat, es va proposar l'ús per primera vegada d'una llengua electrònica per al monitoratge *on-line* de la composició de la solució nutritiva d'un hivernacle hidropònic, gràcies a una col·laboració amb investigadors de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) de la Generalitat de Catalunya. A més, es va explorar l'aplicabilitat de diferents llengües electròniques en el monitoratge mediambiental *in-line* amb transmissió de dades per radiofreqüència, també en col·laboració amb el grup del CINVESTAV. En totes aquestes aplicacions en camp, es va posar especial èmfasi en corregir l'efecte de la temperatura i les derives de la resposta dels elèctrodes.

Finalment, després d'haver treballat en aquests temes i per tal de tornar a la línia de recerca inicial, es va desenvolupar amb èxit una nova llengua electrònica amb biosensors per a determinar simultàniament urea, creatinina i els ions alcalins amoni, potassi i sodi. En aquest cas els biosensors de creatinina desenvolupats estaven basats en l'enzim creatinina deiminasa.

En aquest capítol, es plantejaran els sistemes desenvolupats en tres grups: llengües electròniques per al monitoratge als hivernacles, llengües electròniques per a aplicacions mediambientals i finalment, llengües electròniques basades en matrius de biosensors.

A continuació es recullen les publicacions que han fet possible aquesta tesi doctoral, també agrupades segons la temàtica, i que es troben en el capítol d'Articles publicats i en els Annexos. Aquestes són:

- 1) Application of a potentiometric electronic tongue to fertigation strategy in greenhouse cultivation.
Computers and Electronics in Agriculture, **57** (2007) 12-22
M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle
- 2) Nutrient solution monitoring in greenhouse cultivation employing a potentiometric electronic tongue.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, en revisió
M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle
- 3) Remote environmental monitoring employing a potentiometric electronic tongue.
International Journal of Environmental Analytical Chemistry, **88** (2008) 103-117
Manuel Gutiérrez, Juan Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Lorenzo Leija, Pablo Rogelio Hernández, Liliana Favari, Roberto Muñoz, Manuel del Valle
- 4) Electronic tongue for the determination of alkaline ions using a screen-printed potentiometric sensor array.
Microchimica Acta, acceptat octubre de 2007, doi: 10.1007/s00604-007-0894-9
Manuel Gutiérrez, Víctor M. Moo, Salvador Alegret, Lorenzo Leija, Pablo R. Hernández, Roberto Muñoz, Manuel del Valle
- 5) Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples.
Biosensors and Bioelectronics, **22** (2007) 2171-2178
Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle
- 6) Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples.
Biosensors and Bioelectronics, **23** (2008) 795-802
Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle

4.2 Llengües electròniques per al monitoratge als hivernacles

Per primera vegada es va plantejar l'ús d'una llengua electrònica en el monitoratge de la concentració de diferents ions en la solució de nutrició d'un hivernacle amb recirculació. Aquest treball es va portar a terme en col·laboració amb investigadors de l'IRTA, concretament del seu centre de Cabrils (Maresme). En la Figura 4.1 es pot observar el lloc exacte on es va inserir *on-line* la matriu de sensors dins del cultiu hidropònic. La paraula hidroponia prové del grec *hydro* (=aigua) i *ponos* (=treball). Bàsicament, en aquesta tècnica hortícola les plantes creixen en solucions minerals o substrats artificials, com la perlita o la fibra de coco, que substitueixen el sòl natural[1]. Per això aquesta tècnica es coneix també com a cultiu sense sòl. Un sistema de bombes, vàlvules i degotadors subministra l'aigua i els nutrients (dissolució nutritiva) a cada planta. No obstant, la protecció mediambiental i l'eficiència del procés demanden que aquests sistemes siguin tancats per a evitar que els lixiviats de la solució de nutrició vagin a parar al sòl[2]. Una solució molt estesa és la recirculació d'aquests lixiviats, els quals un cop regenerats, són usats en diversos cicles. En aquest cas, l'addició de nous ions fertilitzants (amoni, potassi, nitrat, fosfat) i d'aigua fresca està controlada pels valors de conductivitat elèctrica (CE) i pH[3]. Aquest protocol permet controlar automàticament la CE de la solució de nutrició mitjançant la dilució dels lixiviats amb aigua fresca, però no permet dosificar els diferents nutrients en temps real per a respondre a la demanda del cultiu. De fet, aquesta dosificació està basada en anàlisis que es fan periòdicament en un laboratori extern (*off-line*). Això causa un desajust entre la presa de mostra i el reajustament de la dosificació, donat que les condicions meteorològiques així com el progrés del propi cultiu causen importants canvis en la demanda de nutrients[4]. Altre desavantatge d'aquests sistemes és que els ions no essencials per a les plantes com el sodi i el clorur s'acumulen en la solució de nutrició causant un increment de la CE i en conseqüència una disminució de la concentració dels ions fertilitzants si la conductivitat s'ha de mantenir en un valor fix. Per tant, el monitoratge de la concentració de cadascun d'aquests ions en la solució de nutrició en continu i en temps real seria una clara millora del sistema de cultiu.

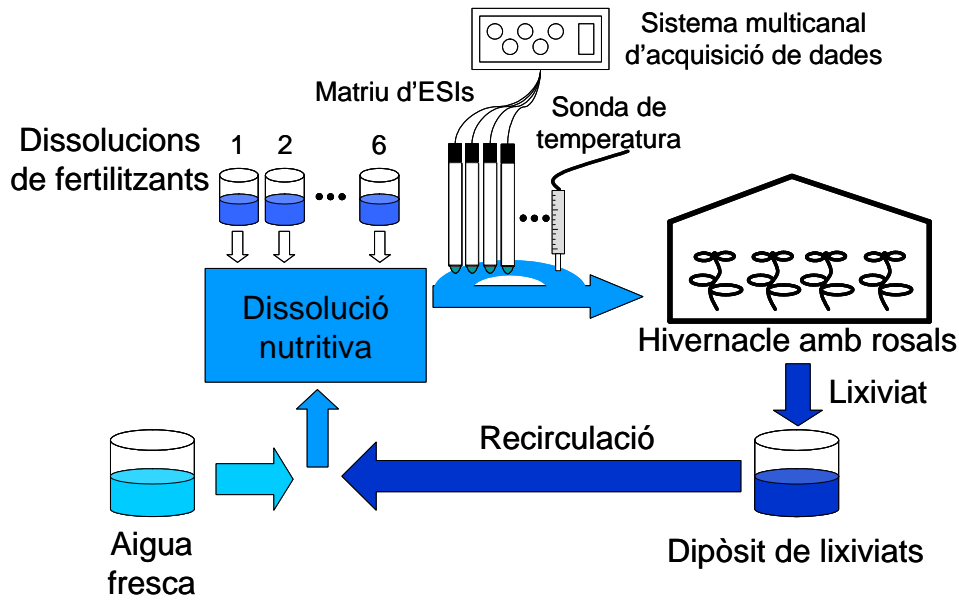


Figura 4.1 Diagrama complet del sistema tancat sense sòl amb la inserció *on-line* de la matriu de sensors i la sonda de temperatura.

Concretament, l'hivernacle en el qual es van portar a terme els nostres experiments tenia una superfície de 270 m², es cultivaven rosers (*Rosa indica* L. cv. Lovelley Red®) i estava situat a les mateixes instal·lacions de Cabrils (41° 25' N, 2° 23' E). Les irrigacions automàtiques es produïen cada cop que la radiació solar acumulada arribava als 200 W·m⁻²·h. La regeneració de la solució de nutrició consistia en la dosificació de lixiviats, aigua fresca i sis solucions concentrades (nitrat de potassi i nitrat d'amoní, sulfat de potassi, dihidrogenfosfat de potassi, nitrat de magnesi, microelements i àcid nítric). Aquesta dosificació de volums estava controlada per un controlador lògic programable Multi Computer Unit (MCU) "Ferti" (FEMCO, França), basant-se, com hem explicat abans, en el pH, mesurat amb un sensor de pH (Broadley James, CA, Estats Units), la CE i unes relacions predefinides entre els volums de les solucions concentrades de fertilitzants. En el nostre cas, les anàlisis externes per a reajustar aquestes relacions es feien cada dues setmanes.

4.2.1 Primera aproximació

4.2.1.1 Primera matriu de sensors

En primera instància es va plantejar una llengua electrònica per al monitoratge simultani dels ions fertilitzants amoni, potassi i nitrat, i dels ions no essencials sodi i clorur en la solució nutritiva. La matriu de sensors usada estava formada per vuit ESIs de diferent selectivitat, segons l'apartat 3.2.1.2: amoni, potassi, sodi i clorur, a més de dos sensors per a nitrat i dos de resposta genèrica, un a ions alcalins amb dibenzo-18-corona-6 en la seva formulació i altre a anions amb bromur de tetraoctilamoni (TOAB). Aquests vuit sensors es van caracteritzar respecte el seu ió principal en aigua bidestil·lada (Taula 4.1). El sensor amb resposta genèrica a alcalins es va calibrar respecte a potassi, i el sensor amb resposta genèrica a anions es va calibrar respecte a nitrat.

Taula 4.1 Resultats de la caracterització dels vuit sensors que formaven la matriu de sensors.

Membrana selectiva a:	Ió principal:	Sensibilitat (mV/dec)	Límit de detecció (M)	r (número de punts)
Amoni	NH ₄ ⁺	56.4	2.2 × 10 ⁻⁵	> 0.999 (27)
Potassi	K ⁺	55.4	1.0 × 10 ⁻⁵	0.998 (27)
Sodi	Na ⁺	59.8	1.1 × 10 ⁻⁵	0.998 (27)
Clorur	Cl ⁻	-53.7	1.4 × 10 ⁻⁵	0.998 (27)
Nitrat (1)	NO ₃ ⁻	-53.7	1.1 × 10 ⁻⁴	> 0.999 (27)
Nitrat (2)	NO ₃ ⁻	-55.4	7.5 × 10 ⁻⁵	> 0.999 (27)
Genèric (I)	K ⁺	50.5	2.0 × 10 ⁻⁵	> 0.999 (27)
Genèric (III)	NO ₃ ⁻	-48.2	2.7 × 10 ⁻⁵	0.999 (27)

Com que el sistema d'adquisició de dades tenia vuit canals, es va decidir duplicar un sensor, en aquest cas el de nitrat donat que era el que presentava un límit de detecció (LD) més elevat.

4.2.1.2 Construcció del model de resposta basat en XNA

Les mostres d'entrenament (27 mostres) i de validació externa (set mostres) van ser preparades fent servir una dilució 1:1 de lixiviat i aigua fresca provinents dels mateixos

hivernacles com a medi iònic, per tal d'imitar les condicions reals de la posterior aplicació en camp. Les lectures absolutes dels vuit sensors, així com la temperatura de la solució i el dia de mesura es van usar com a entrades en una XNA per tal de construir un model de resposta conjunta.

Una bona configuració de XNA és aquella que subministra un error quadràtic mig (RMSE) petit i rectes comparatives entre els valors trobats i els esperats per a les mostres de validació externa amb una bona correlació, pendent unitat i ordenada a l'origen zero. En aquest cas es van estudiar totes les possibles combinacions entre dues funcions de transferència del tipus sigmoïdal després de la capa oculta i el seu nombre de neurones, la qual cosa va suposar un estudi comparatiu de 16 configuracions diferents (Taula 4.2). Es va escollir aquest tipus de funcions de transferència donada la naturalesa no lineal de la resposta dels sensors. La resta de paràmetres estaven fixats a priori.

Taula 4.2 Factors que es van haver d'optimitzar per a obtenir el model usant XNA.

F. transferència capa oculta	Nombre de neurones capa oculta
tansig	entre 3 i 10
logsig	

El primer pas va ser escollir la millor funció de transferència després de la capa oculta. Es van representar els RMSE (el total i l'individual per a cada espècie) en front del nombre de neurones de la capa oculta (Figura 4.2). Aquests RMSE s'obtenen fent la mitja entre tres replicats d'entrenament de la mateixa configuració.

En els gràfics no s'observen grans diferències entre els RMSE de les dues funcions, encara que, en general, s'obtenen errors més petits amb la funció *tansig*.

Un cop escollida la funció de transferència, s'ha de definir el nombre de neurones en la capa oculta. Per això es van representar el pendent, l'ordenada a l'origen i el coeficient de correlació de les rectes comparatives entre els valors trobats i els esperats per a les mostres de validació externa en front del nombre de neurones (Figura 4.3). Aquestes mostres no han participat en cap moment en el procés d'entrenament. Els valors també s'obtenen com a mitja de tres replicats de la mateixa configuració.

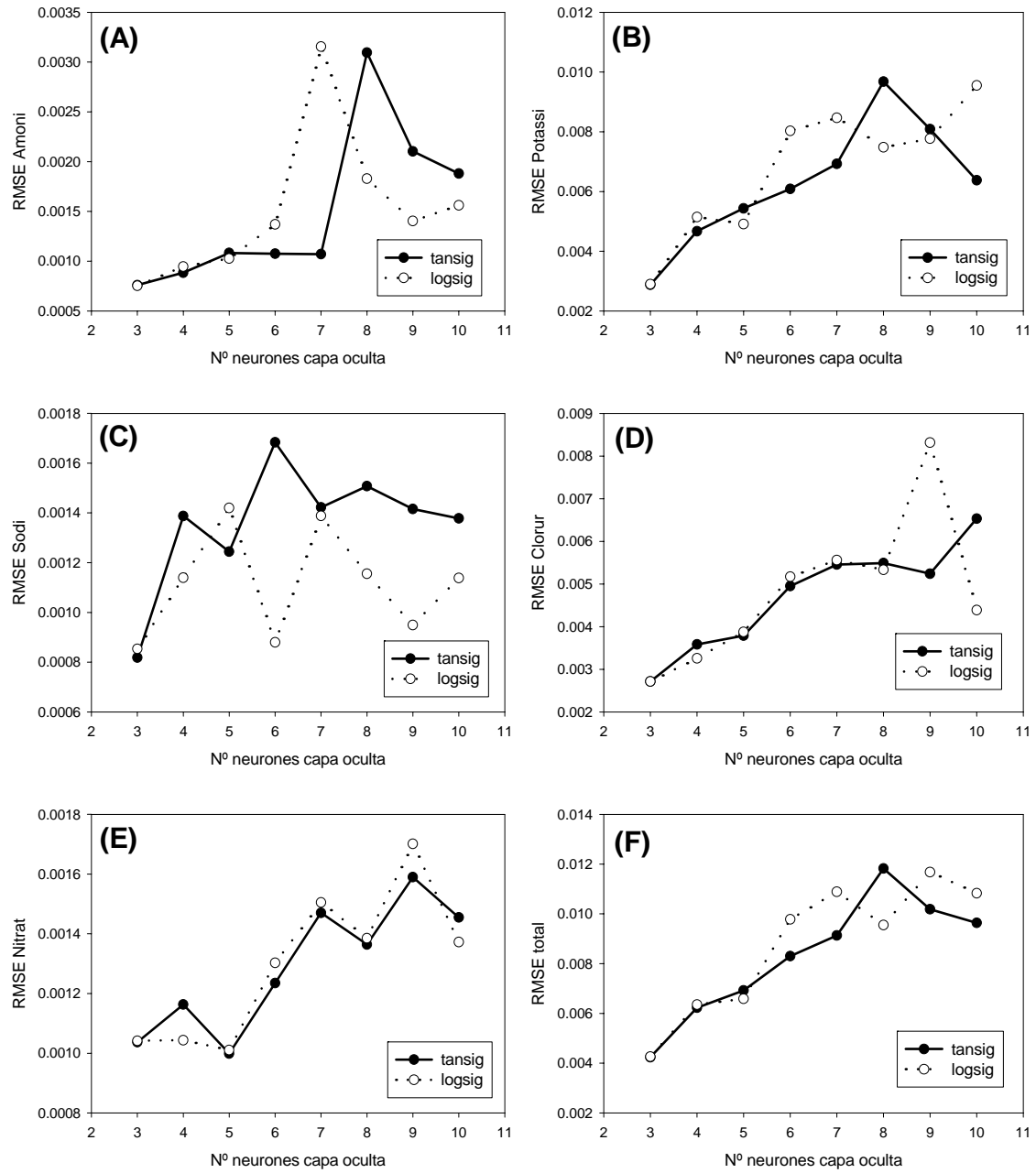


Figura 4.2 Representació dels RMSE (M) en front del nombre de neurones a la capa oculta per a cada espècie: (A) amoni, (B) potassi, (C) sodi, (D) clorur i (E) nitrat; i el total (F).

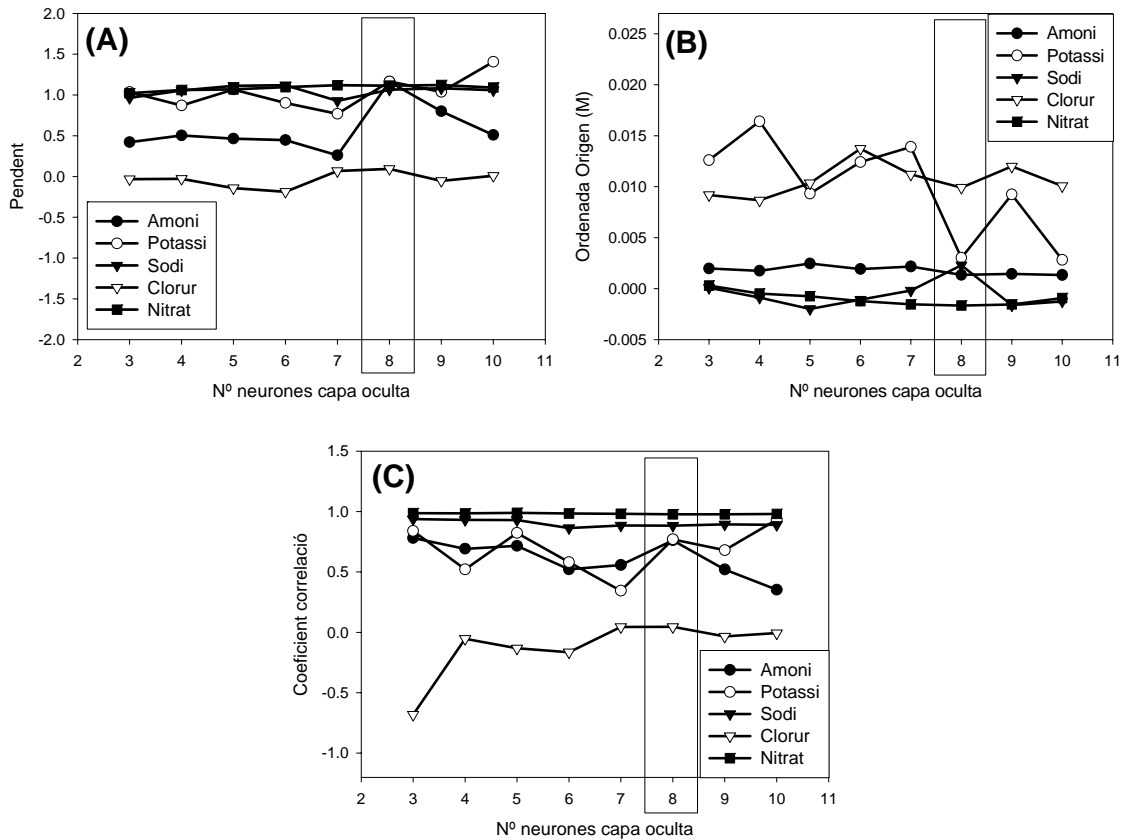


Figura 4.3 Representacions del pendent (A), l'ordenada a l'origen (B) i el coeficient de correlació (C) de les rectes comparatives entre els valors trobats i els esperats per a les mostres de validació externa en funció del nombre de neurones a la capa oculta.

A la vista del mal ajust obtingut per al clorur, es va optar per la configuració de vuit neurones que és la que millor ajusta els altres quatre ions. Per tant, l'arquitectura òptima de la xarxa utilitzava l'algorisme d'entrenament de regularització bayesiana (RB) i constava de vuit neurones a la capa oculta les quals empraven la funció de transferència *tansig*.

Amb aquesta configuració optimitzada, es van representar els valors trobats en funció dels esperats per a les set mostres de validació externa amb l'objectiu de visualitzar la modelització assolida. Com que les mostres es van mesurar en tres torns (un amb totes elles a temperatura ambient, altre amb la meitat a temperatura més elevada i l'últim amb l'altra meitat a temperatura més baixa), en realitat tenim 14 punts de validació externa. La Figura 4.4 mostra aquesta comparativa.

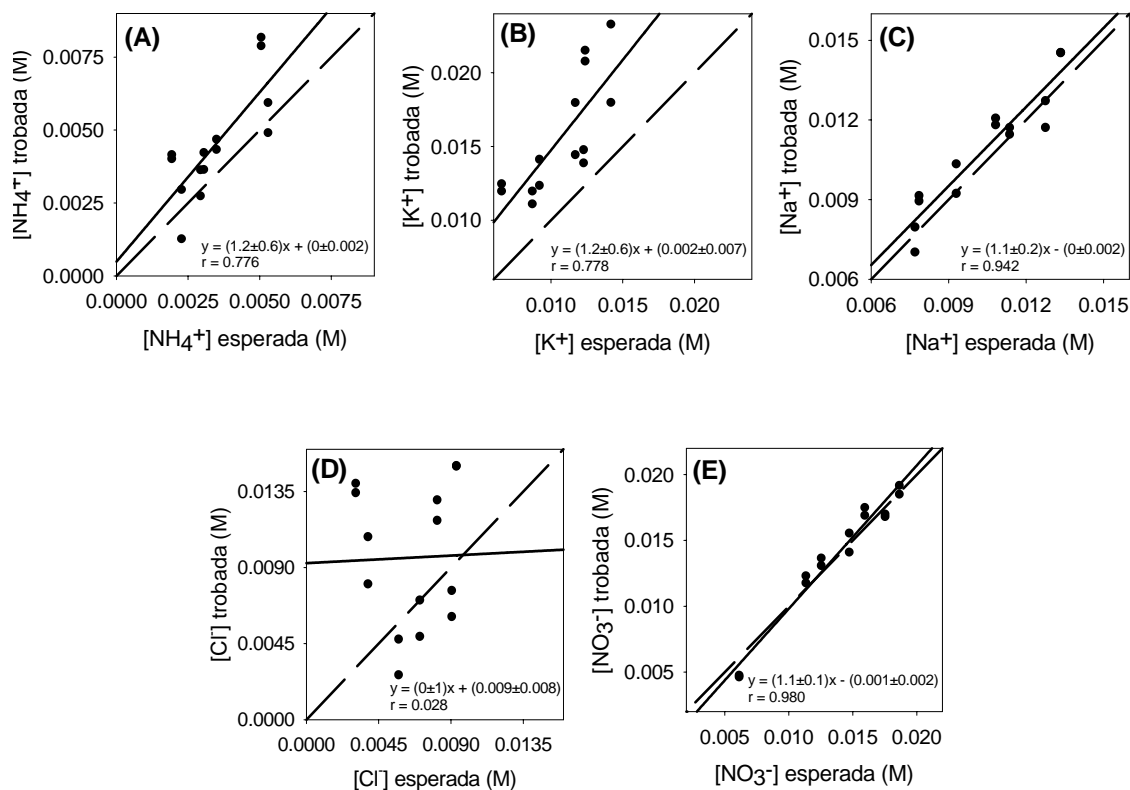


Figura 4.4 Ajustos obtinguts per als ions amoni (A), potassi (B), sodi (C), clorur (D) i nitrat (E) en el conjunt de validació externa. La línia discontinua mostra la idealitat i la sòlida, la recta de regressió experimental, els paràmetres de la qual, calculats a un nivell de confiança del 95 %, es mostren a la mateixa gràfica.

Totes les rectes experimentals són indistingibles de la idealitat, excepte per al clorur.

4.2.1.3 Aplicacions en mostres reals i a l'hivernacle

Aquest mal comportament observat per al clorur es fa més palès amb les mostres reals de solucions de nutrició i lixiviats mostrejades en diferents dies a les instal·lacions de l'IRTA a Cabriels, les quals es van mesurar just abans de fer l'experiment *on-line*. Els valors trobats per la llengua electrònica es van comparar amb els valors determinats per mètodes de referència: les concentracions de referència de l'amoni es van obtenir mitjançant l'ús de l'elèctrode d'amoniac[5] (model 95-12, Thermo Electron), el qual fa servir una membrana hidrofòbica permeable a gasos per tal de separar la mostra de la solució interna de clorur d'amoni de l'elèctrode. L'amoniac dissolt ($\text{NH}_{3(\text{aq})}$ i NH_4^+) es converteix en $\text{NH}_{3(\text{aq})}$ quan s'augmenta el pH per sobre d'11 amb una base forta. El $\text{NH}_{3(\text{aq})}$ es difon a través de la membrana i canvia el pH de la solució interna; aquest

canvi és detectat per un elèctrode de pH. El nivell fix de clorurs en la solució interna és detectat per un ESI que serveix com a elèctrode de referència. En quant a les concentracions de referència de sodi i potassi van ser obtingudes mitjançant l'espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament (ICP-OES)[6]. Finalment, les concentracions de referència de clorur i nitrat van ser obtingudes mitjançant l'electroforesi capil·lar amb detecció per UV[7].

En la Taula 4.3 es mostren els errors relatius del logaritme de la concentració per als cinc ions considerats. El tipus de mostra que va donar millors resultats va ser els lixiviat, que són els que apareixen en la taula. El fet que s'hagin usat lixiviat per a constituir el medi iònic de les mostres d'entrenament en pot ser la causa. També es pot observar que els majors errors s'obtenen en la determinació de l'ió clorur.

Taula 4.3 Errors relatius obtinguts en la determinació dels cinc ions en mostres reals dels hivernacles.

Mostra	Error Rel. (%) NH₄⁺	Error Rel. (%) K⁺	Error Rel. (%) Na⁺	Error Rel. (%) Cl⁻	Error Rel. (%) NO₃⁻
Lixiviat 1	7.5	6.0	-11.0	-11.0	3.4
Lixiviat 2	1.0	-5.9	-8.2	-0.7	-5.2
Lixiviat 3	6.2	12.1	-11.3	-13.0	3.6
Lixiviat 4	1.0	15.0	-9.6	-14.1	-4.5
Lixiviat 5	-2.2	10.8	-7.5	-14.9	-12.5
Lixiviat 6	-2.2	7.4	-6.4	0.6	-1.6
Lixiviat 7	-14.9	0.5	-9.1	-12.1	-9.6
Lixiviat 8	-5.4	2.6	-9.0	-14.9	-14.6
Lixiviat 9	-13.0	4.9	-7.7	-9.1	-14.1
Error relatiu mitjà (%)	5.9	7.2	8.9	10.0	7.7

L'experiment *on-line* per al monitoratge dels cinc ions en la solució de nutrició va durar uns 17 dies, distribuïts en tres tandes de seguiment des del 10 de maig al 13 de juny de 2005. A la Figura 4.5 es mostren les concentracions interpolades per la llengua electrònica en la tanda més representativa, durant la qual es van prendre mesures cada minut. També es mostra la temperatura de la solució nutritiva enregistrada per la sonda Pt100 i que va servir com a entrada a la XNA.

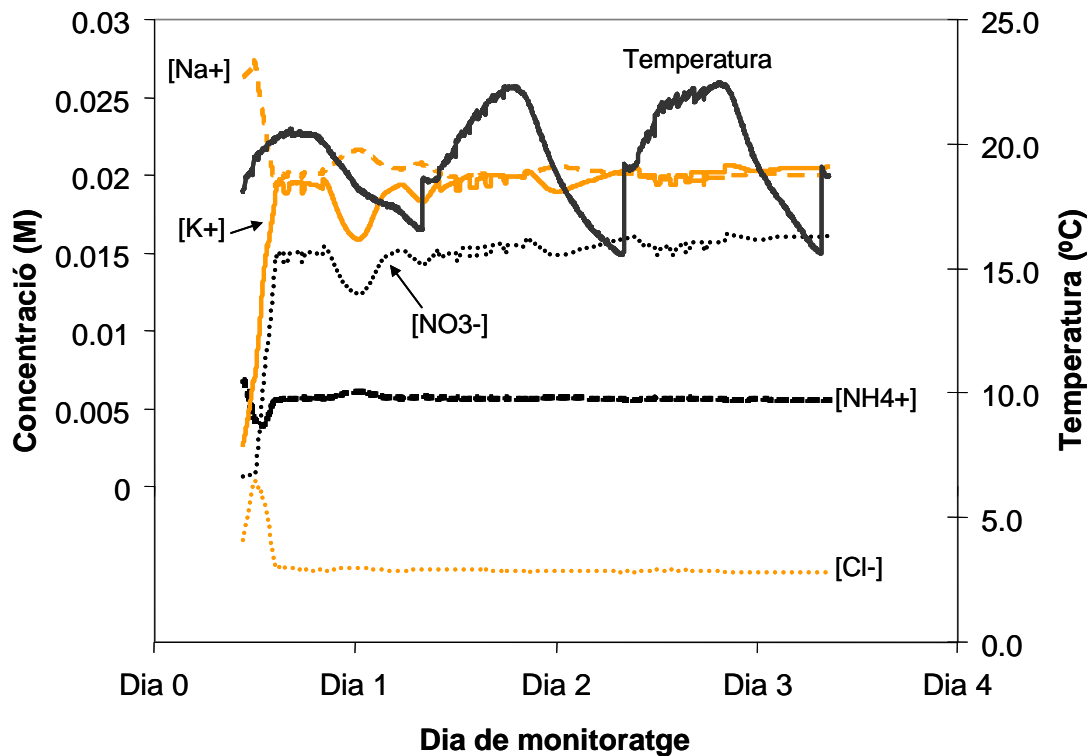


Figura 4.5 Concentracions trobades per la llengua electrònica en el monitoratge dels cinc ions considerats en aquesta primera aproximació: amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat. També es representa la temperatura de la solució de nutrició amb els cicles dia-nit clarament visibles.

Durant les primeres hores de seguiment, s'observa que les concentracions experimenten petites variacions. Donat que el sistema automàtic de recirculació manté els ions en un rang estret de concentracions, això ens confirma que l'efecte de la temperatura està sent corregit. Per a la resta del seguiment, les concentracions no mostren cap tipus de variació, cosa sorprenent ja que les irrigacions són bastant freqüents durant aquests mesos. Una anàlisi més exhaustiva de les dades enregistrades ens mostra que els potencials dels sensors són molt diferents dels enregistrats en les mostres d'entrenament, per la qual cosa la XNA s'està trobant amb condicions que no ha après. També es pot comprovar que la determinació de clorur va donar constantment concentracions errònies inferiors a zero.

4.2.2 Segona aproximació

4.2.2.1 Segona matriu de sensors

Per tal d'aconseguir determinar el clorur es va duplicar l'elèctrode basat en clorur de tridodecilmetilamoni (TDMAC) en aquesta nova aproximació. Així la matriu va ser la mateixa que en l'aproximació anterior, però amb dos elèctrodes de clorur i un únic elèctrode de nitrat.

4.2.2.2 Construcció del model de resposta basat en XNA

Per tal de solucionar els problemes de l'aplicació anterior, les mostres d'entrenament i de validació externa van ser preparades fent servir una dilució 1:2 de solució de nutrició i aigua bidestil·lada com a medi iònic, en comptes d'una dilució de lixiviats. També es va mesurar una solució de referència periòdicament per a poder usar els potencials dels sensors referenciats, en comptes dels valors absoluts i el dia de mesura, com a entrades a la XNA, a més de la temperatura de la solució. La composició d'aquesta solució de referència va ser 10^{-4} M d'amoni i fosfat, i 10^{-3} M de potassi, sodi, clorur i nitrat, que són els valors mínims de concentració que es poden trobar a la solució de nutrició, segons indicacions de l'IRTA.

Després de fer un estudi comparatiu de les configuracions, equivalent al de la aproximació anterior, finalment, es va trobar que la XNA que era capaç de modelar millor el conjunt de dades de partida, és a dir que proporcionava RMSE petits i bones rectes comparatives per a les mostres de validació externa, tenia set neurones a la capa oculta amb la funció de transferència *logsig*.

Per tal de visualitzar la correcta modelització assolida, es van representar els valors trobats en funció dels esperats per a les 10 mostres de validació externa, les quals no van participar en cap moment en el procés d'entrenament. Com en l'aproximació anterior, les mostres es van mesurar en tres torns a diferent temperatura i per tant, en realitat tenim 20 mostres de validació externa. La Figura 4.6 mostra aquesta comparativa.

S'observa que el fet d'haver duplicat el sensor de clorur ens ha servit per a millorar bastant la seva resposta, però no és suficient degut a la forta interferència del nitrat.

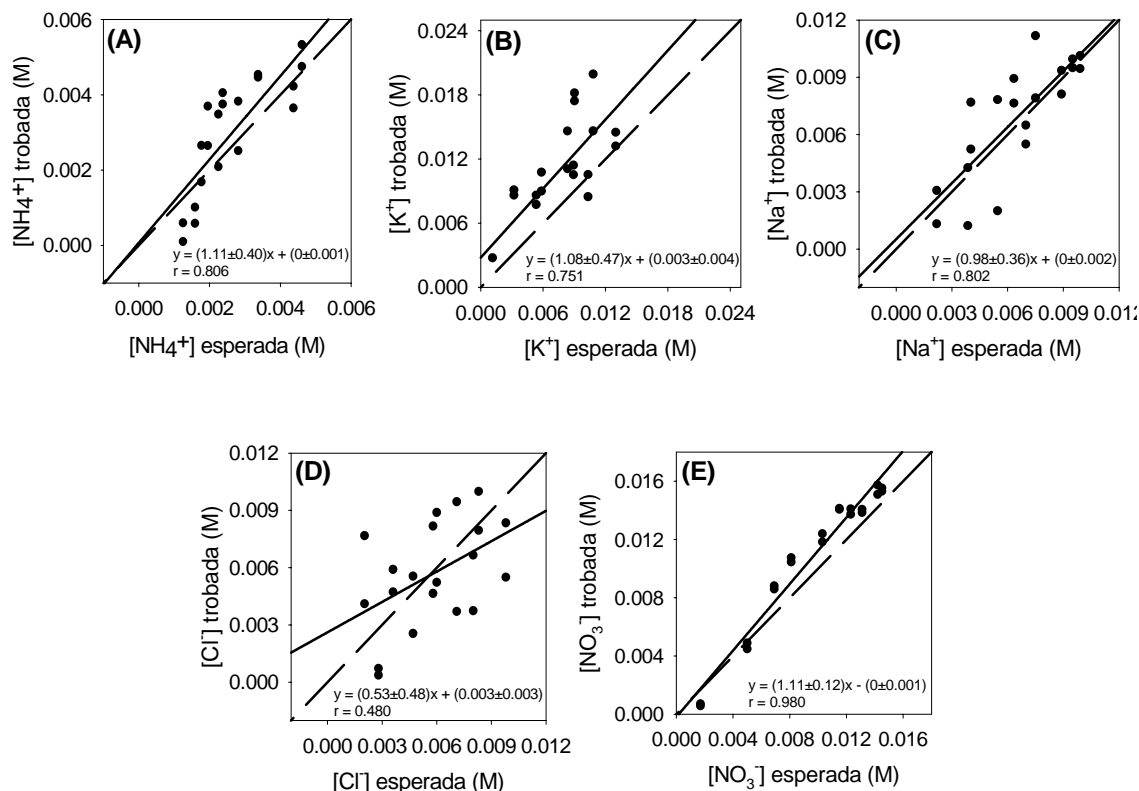


Figura 4.6 Ajustos obtinguts per als ions amoni (A), potassi (B), sodi (C), clorur (D) i nitrat (E) en el conjunt de validació externa. La línia discontinua mostra la idealitat i la sòlida, la recta de regressió experimental, els paràmetres de la qual, calculats a un nivell de confiança del 95 %, es mostren a la mateixa gràfica.

4.2.2.3 Aplicació a l'hivernacle

L'experiment *on-line* es va portar a terme entre el 10 de novembre i el 5 de desembre de 2005, sense interrupció. D'aquests 25 dies, a la Figura 4.7 es mostren els tres dies i mig més representatius, durant els quals es van prendre mesures cada 15 minuts. Bàsicament, el sistema de recirculació és capaç de mantenir les concentracions d'amoni, sodi i nitrat en un rang estret. El potassi en canvi, experimenta un continu descens, que nosaltres hem intentat explicar des del punt de vista fisiològic de les plantes. El fet que els rosers necessitin més potassi, per a la formació de les gemmes[8] i per a protegir-se del fred de l'hivern[9], i que el sistema de dosificació encara no s'hagi reajustat a la nova situació en poden ser la causa.

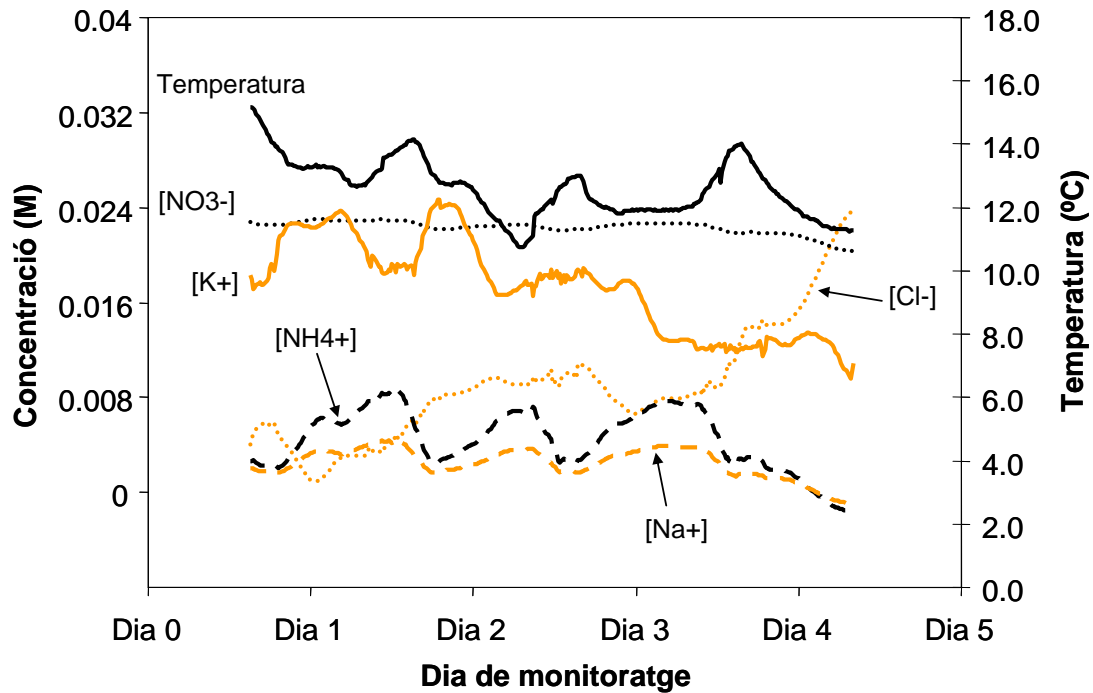
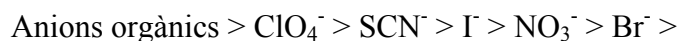


Figura 4.7 Concentracions trobades per la llengua electrònica en el monitoratge dels cinc ions considerats en aquesta segona aproximació: amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat. També es representa la temperatura de la solució de nutrició amb els cicles dia-nit clarament visibles.

Per altra banda, l'ió clorur mostra un augment molt considerable de la seva concentració, que s'atribueix a canvis a nivell de membrana deguts a l'elevada concentració de l'ió nitrat. De fet es va observar una pèrdua gairebé total de la resposta a clorur de l'elèctrode basat en TDMAC després d'aquest experiment *on-line*, acompanyada d'una resposta nerstiana a nitrat (Figura 4.8 i Taula 4.4). El fet és que el nitrat és un ió essencial per al metabolisme de les plantes i aquestes l'absorbeixen en grans quantitats. Per això, l'ió nitrat es troba normalment unes tres vegades més concentrat que l'ió clorur a la solució de nutrició. Per tant, el fet que la concentració de nitrat a la solució de mesura sigui molt més elevada que la de clorur ha provocat un canvi en la selectivitat de la membrana. Per a explicar-lo hem de recórrer a la sèrie de Hoffmeister[10], la qual diu que, en el cas de les membranes selectives a anions basades en ionòfors carregats, aquests mostren preferència pels anions més lipofílics:



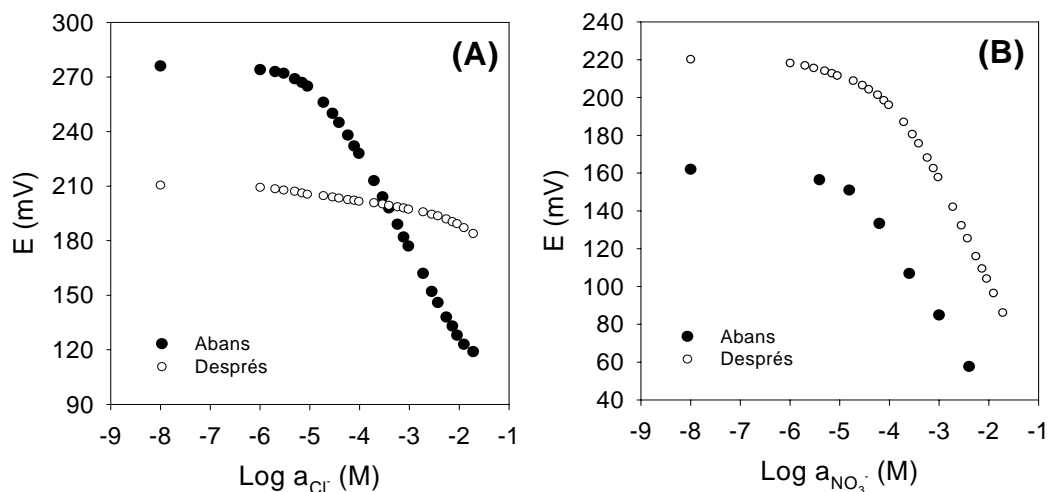


Figura 4.8 Resposta en aigua bidestil·lada de l'elèctrode basat en TDMAC a clorur (A) i a nitrat (B), abans i després de l'experiment *on-line*.

Taula 4.4 Equació dels ajustos obtinguts per als quatre calibratges representats en la Figura 4.8.

Resposta a clorur	
Abans de l'experiment <i>on-line</i>	$E(\text{mV}) = 24.2 - 53.7 \cdot \text{Log}(a_{\text{Cl}^-} + 1.4\text{e-}5)$, $r = 0.998$ ($n = 27$)
Després de l'experiment <i>on-line</i>	$E(\text{mV}) = 176.6 - 6.4 \cdot \text{Log}(a_{\text{Cl}^-} + 1.0\text{e-}5)$, $r = 0.983$ ($n = 27$)
Resposta a nitrat	
Abans de l'experiment <i>on-line</i>	$E(\text{mV}) = -47.5 - 43.9 \cdot \text{Log}(a_{\text{NO}_3^-} + 1.7\text{e-}5)$, $r > 0.999$ ($n = 7$)
Després de l'experiment <i>on-line</i>	$E(\text{mV}) = -6.4 - 54.4 \cdot \text{Log}(a_{\text{NO}_3^-} + 8.3\text{e-}5)$, $r > 0.999$ ($n = 27$)

4.2.3 Tercera aproximació

4.2.3.1 Tercera matriu de sensors

Donats els resultats incorrectes subministrats pels elèctrodes de clorur basats en ionòfors carregats i la necessitat de tenir un seguiment la concentració d'aquest anió, va ser necessari fabricar un elèctrode metàl·lic de segona espècie (Ag/AgCl), que va donar un bon comportament en aigua bidestil·lada tant abans com després de l'experiment *on-line* (Figura 4.9 i Taula 4.5), ja que aquesta variant no es veu afectada per l'ió nitrat.

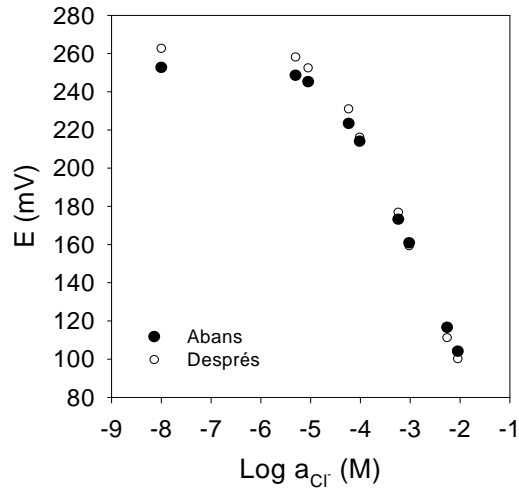


Figura 4.9 Resposta en aigua bidestil·lada de l'elèctrode de clorur basat en Ag/AgCl abans i després de l'experiment *on-line*.

Taula 4.5 Equació dels ajustos obtinguts per als dos calibratges representats en la Figura 4.9.

Resposta a clorur	
Abans de l'experiment <i>on-line</i>	$E(\text{mV}) = -16.3 - 58.9 \cdot \text{Log}(a_{Cl^-} + 2.7e-5)$, $r > 0.999$ ($n = 9$)
Després de l'experiment <i>on-line</i>	$E(\text{mV}) = -51.0 - 67.9 \cdot \text{Log}(a_{Cl^-} + 2.4e-5)$, $r > 0.999$ ($n = 9$)

Per altra banda, en aquesta última aproximació es va haver d'incorporar al model, apart dels ja existents (amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat), un sisè analit. Es tracta de l'ió fertilitzant fosfat. Davant la manca d'un ionòfor comercial de qualitat per a aquest anió, es va optar per fabricar un elèctrode metàl·lic de cobalt, el qual es va veure que era molt dependent del pH del medi (Figura 4.10). Mentre que el calibratge en aigua bidestil·lada dóna una corba que no es va poder ajustar, el calibratge en hidrogenfitalat a pH = 4 dóna un comportament gairebé nerstià.

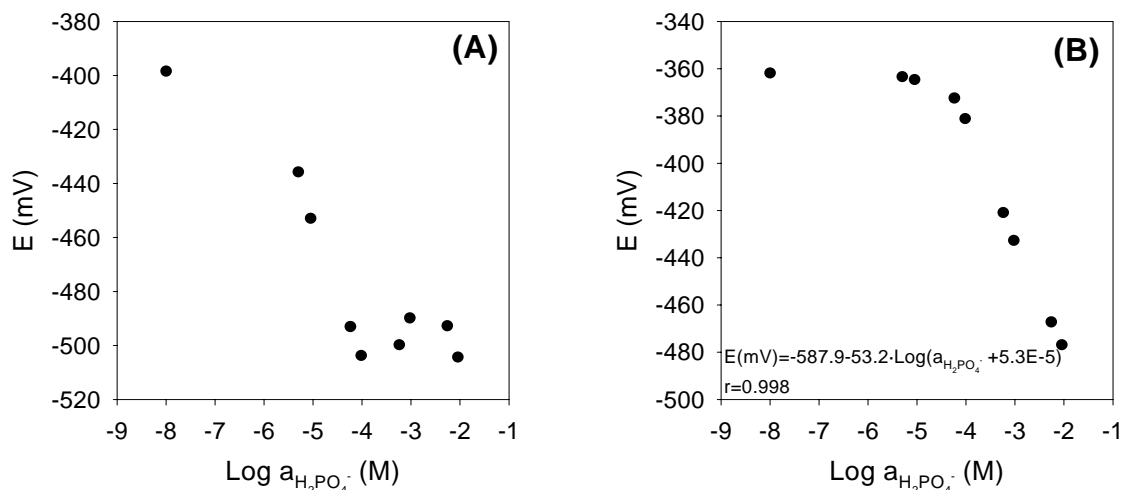


Figura 4.10 Calibratges en aigua bidestil·lada (A) i en hidrogenftalat de potassi 0.025 M a pH = 4 (B) realitzats a l'elèctrode de fosfat basat en cobalt.

Així doncs la matriu usada en aquesta última aproximació estava formada pels elèctrodes comuns a les matrius anteriors: amoni, potassi, sodi, nitrat i els sensors de resposta genèrica basats en dibenzo-18-corona-6 i TOAB, un elèctrode de clorur basat en Ag/AgCl i un elèctrode de fosfat basat en cobalt. A aquests vuit sensors es va afegir un elèctrode de pH basat en l'ionòfor tridodecilamina (TDDA) per tal de corregir la influència que té aquest paràmetre sobre la resposta de l'elèctrode de fosfat. Finalment i per tal de completar els 11 canals del sistema d'adquisició de dades usat, es van afegir dos sensors de calci, un basat en tetronasina i altre en bis(bis(4-1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil)fosfat de calci (BBTP), amb l'objectiu de corregir l'efecte d'aquest catió divalent sobre la resposta de la resta de sensors de la matriu.

4.2.3.2 Construcció del model de resposta basat en XNA

Com en el cas anterior, les mostres d'entrenament i de validació externa van ser preparades fent servir una dilució 1:2 de solució de nutrició i aigua bidestil·lada com a medi iònic, a més de mesurar la solució de referència periòdicament amb la mateixa composició que la usada en l'aproximació anterior. Així, les entrades a la XNA van ser els potencials referenciats dels 11 elèctrodes i la temperatura.

Després de fer un estudi comparatiu de les configuracions, equivalent al de les aproximacions anteriors, finalment, es va trobar que la configuració que donava millors resultats va ser la que tenia set neurones amb la funció de transferència *logsig*.

Per tal de visualitzar la correcta modelització assolida, es van representar els valors trobats en funció dels esperats per a les 10 mostres de validació externa, les quals no van participar en cap moment en el procés d'entrenament. Com en les aproximacions anteriors, les mostres es van mesurar en tres torns a diferent temperatura i per tant, en realitat tenim 20 punts de validació externa. La Figura 4.11 mostra aquesta comparativa. Com es pot comprovar, totes les rectes experimentals són indistingibles de la idealitat donat que inclouen el pendent unitat i l'ordenada zero dintre de l'interval de confiança. El resultat obtingut per al clorur és molt satisfactori, resolent la problemàtica observada a les dues aproximacions anteriors, i l'obtingut per al fòsfat també és acceptable.

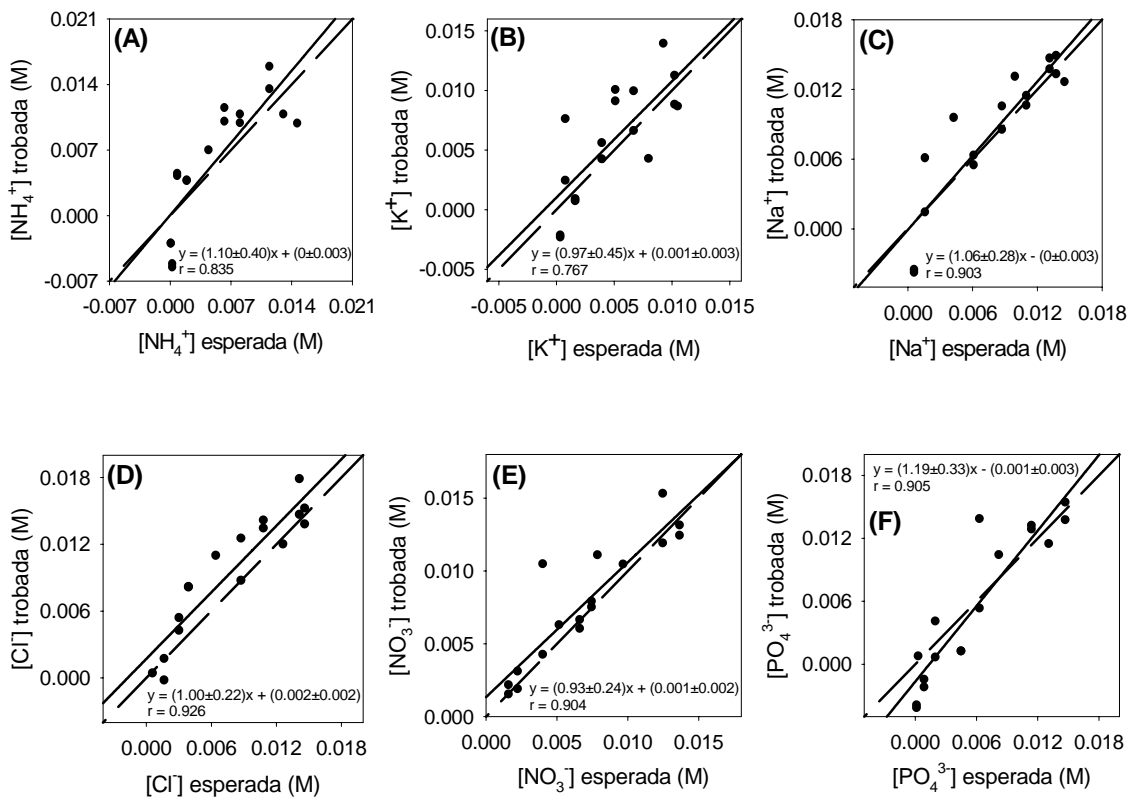
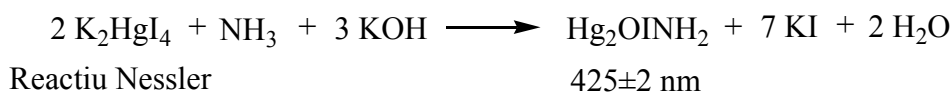


Figura 4.11 Ajustos obtinguts per als ions amoni (A), potassi (B), sodi (C), clorur (D), nitrat (E) i fòsfat (F) en el conjunt de validació externa. La línia discontinua mostra la idealitat i la sòlida, la recta de regressió experimental, els paràmetres de la qual, calculats a un nivell de confiança del 95 %, es mostren a la mateixa gràfica.

4.2.3.3 Aplicacions en mostres reals i a l'hivernacle

Durant aquesta última experiència als hivernacles, es va voler validar la llengua electrònica mesurant diverses mostres reals de solucions de nutrició i lixiviats en la mateixa cel·la de mesura *on-line* i no al laboratori com es va fer durant la primera aproximació. Per tal d'obtenir una major variabilitat de concentracions, també es van preparar i mesurar diverses dilucions de solucions de nutrició. Els valors trobats per la llengua electrònica es van comparar amb els valors determinats per mètodes de referència, proporcionats per l'IRTA. Les concentracions de referència de l'amoni es van obtenir mitjançant la reacció de Nessler. En aquest mètode, el reactiu de Nessler (K_2HgI_4) reacciona amb l'amoniac present a la mostra (en medi fortament bàsic) per a produir una espècie de color groc, la qual és mesurada espectrofotomètricament a 425 ± 2 nm[11]:



Les referències de sodi i potassi van ser obtingudes mitjançant l'espectroscòpia d'absorció atòmica i finalment, les referències de clorur, nitrat i fosfat, mitjançant cromatografia iònica. La Taula 4.6 mostra els errors relatius del logaritme de la concentració per als sis ions considerats. Els resultats no són gaire satisfactoris per al fosfat, amb un error relatiu mitjà del 31.9 % ni per a l'amoni, amb un 23.8 %. Per tant, aquests dos ions només es poden determinar semiquantitativament.

L'experiment *on-line* per al monitoratge dels sis ions en la solució nutritiva va durar uns 13 dies, del 13 al 26 de juliol de 2006. A la Figura 4.12 es mostren els tres dies més representatius, durant els quals es van prendre mesures cada minut. En aquest cas, el sistema de recirculació és capaç de mantenir en un rang les concentracions d'amoni, sodi, clorur, nitrat i fosfat. El potassi presenta un comportament oposat a l'observat en l'aproximació anterior, realitzada a les portes de l'hivern. L'explicació fisiològica la trobem en el fet que durant l'estiu, la formació de tot l'aparell fotosintètic (fase heteròtrofa del roser), durant la qual es consumeix preferentment potassi, és curta i té lloc al començament de l'estació per a aprofitar més i millor la llum solar (fase autòtrofa del roser). Per tant, probablement el seguiment que s'observa a la Figura 4.12 correspon a un període en el qual la fase heteròtrofa ja ha acabat però el sistema de dosificació encara no s'ha actualitzat. Altra diferència que s'observa entre aquest seguiment i el

realitzat en l'aproximació anterior és l'augment de la concentració dels ions no essencials sodi i clorur, causat probablement per la major evapotranspiració dels rosers durant l'estiu[4]. L'augment d'aquests ions, i per tant de la CE, i la major activitat fotosintètica diürna[12], han provocat també un descens de la concentració de nitrat a la solució nutritiva.

Taula 4.6 Errors relatius obtinguts en la determinació dels sis ions en mostres reals dels hivernacles mesurades a la mateixa cel·la de mesura *on-line*.

Mostra	Error Rel. (%) NH₄⁺	Error Rel. (%) K⁺	Error Rel. (%) Na⁺	Error Rel. (%) Cl⁻	Error Rel. (%) NO₃⁻	Error Rel. (%) PO₄⁻
SN 1	-10.5	10.9	-2.9	-4.0	13.4	59.1
L 1	-26.6	-2.0	3.8	-4.1	9.9	35.0
SN 2	-15.9	11.4	1.6	12.3	12.1	30.8
SN:AF 1:1	-14.6	11.1	-1.6	-3.5	13.5	20.4
SN:AF 2:1	-13.4	8.5	-8.3	6.9	14.2	25.5
SN 3	26.0	19.0	13.0	12.3	18.1	40.3
SN:AF 3:1	21.4	17.4	12.7	12.0	21.5	29.1
SN:AF 1:1	14.7	17.6	12.5	11.7	25.8	20.9
SN:AF 2:1	13.2	14.7	12.7	11.9	22.1	25.3
SN:AF 3:1	12.5	12.6	12.7	12.0	20.4	28.2
SN:AF 2:1	11.1	12.4	12.7	11.9	22.1	26.5
SN 4	17.6	7.1	13.0	12.3	15.9	49.7
L 2	-9.1	-1.7	24.4	28.5	11.5	28.4
SN 5	-16.2	-3.0	-3.2	-6.1	14.0	41.7
SN 6	-8.5	23.9	16.0	14.4	20.8	31.5
SN 7	31.5	28.3	16.7	15.4	11.6	41.8
SN:AF 1:1	22.0	30.9	13.2	11.9	22.9	22.6
SN:AF 2:1	29.3	32.1	14.4	13.2	20.9	25.8
SN:AF 3:1	55.3	33.5	15.0	13.7	19.3	25.9
SN 8	49.5	17.6	16.7	15.4	7.3	34.9
L 3	23.2	12.0	27.2	-3.2	16.4	26.4
L 4	13.1	7.0	41.3	0.6	13.1	25.9
SN 9	46.8	17.2	-14.5	15.4	-2.9	45.1
SN:AF 3:1	49.1	5.3	-16.0	-7.7	6.6	35.9
SN:AF 2:1	36.4	-13.5	-18.0	-15.2	10.2	29.7
SN:AF 1:1	31.8	-35.4	-19.7	-17.0	11.0	23.6
Error relatiu mitjà (%)	23.8	15.6	14.0	11.3	15.3	31.9

SN: solució de nutrició; L: lixiviat; AF: aigua fresca.

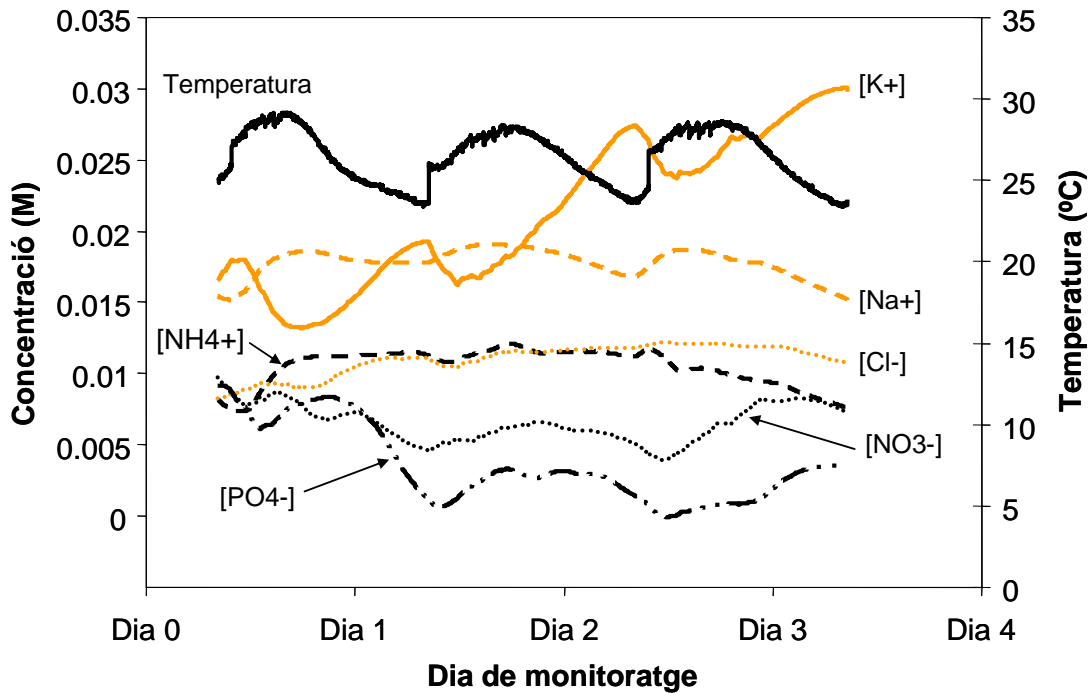


Figura 4.12 Concentracions trobades per la llengua electrònica en el monitoratge dels sis ions considerats durant aquesta tercera aproximació: amoni, potassi, sodi, clorur, nitrat i fosfat. També es representa la temperatura de la solució de nutrició amb els cicles dia-nit clarament visibles.

Durant els darrers 5 dies de monitoratge d'aquesta última aproximació es va introduir deliberadament una configuració errònia en el sistema automàtic de dosificació. Aquesta experiència és molt interessant ja que ens permet avaluar el comportament de la llengua electrònica quan les concentracions no es troben controlades. A la Figura 4.13 es mostra el seguiment obtingut. Clarament, s'observa una banda que afecta la composició de la solució. Aquesta anomalia consisteix en una disminució molt important de la concentració de potassi, juntament amb un augment de la concentració dels ions salins sodi i clorur. Això pot ser degut a una proporció excessiva de lixivians en la reformulació de la solució de nutrició. Cal dir que aquest tipus d'anomalia seria indetectable pel sistema automàtic de dosificació, que basa les seves mesures en el pH i la CE, i que es trigaria fins a dues setmanes a corregir-la, depenent de la freqüència de les anàlisis externes.

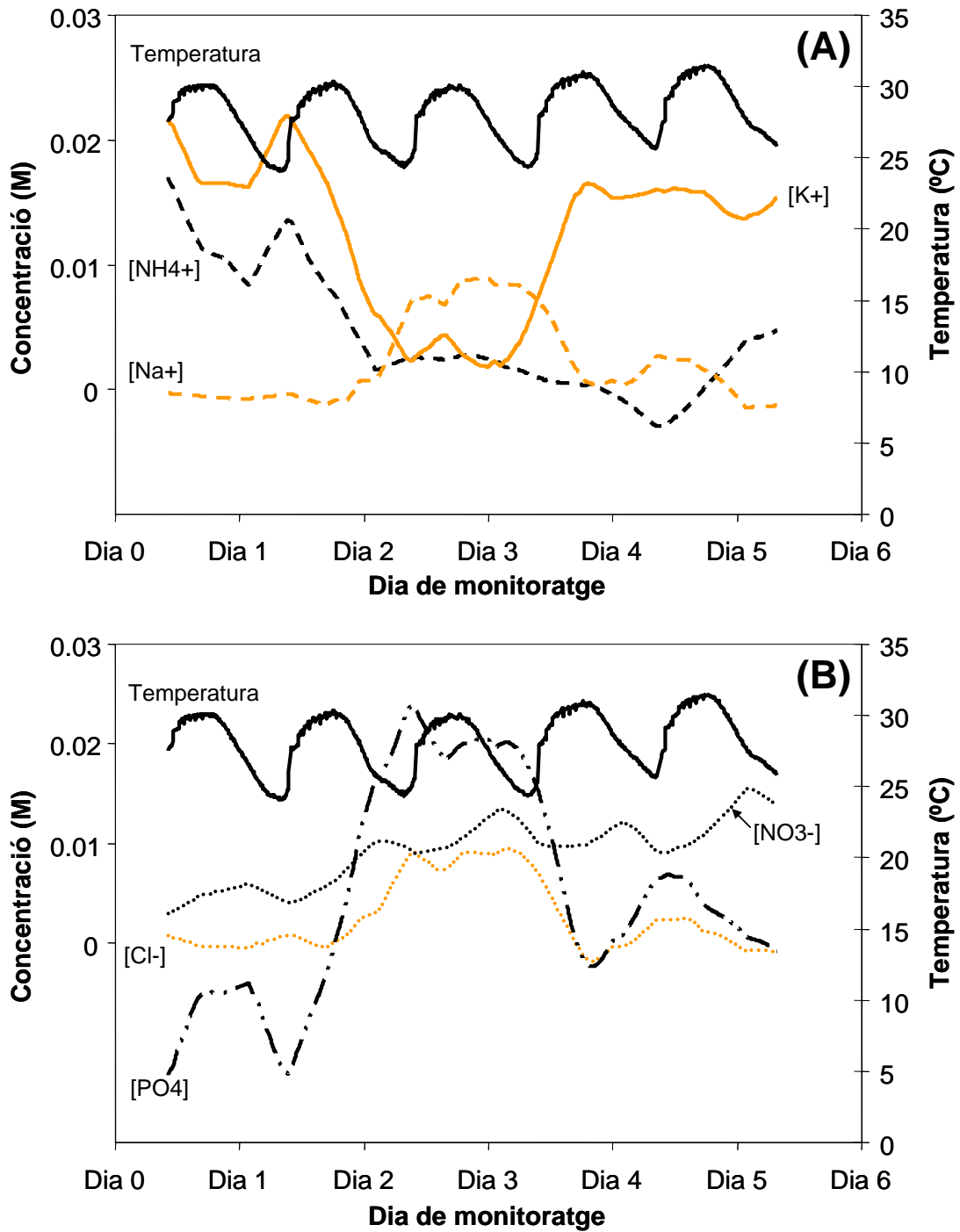


Figura 4.13 Concentracions trobades per la llengua electrònica en el monitoratge dels tres cations (A) i tres anions (B) considerats durant la configuració errònia del sistema de dosificació. També es representa la temperatura de la solució de nutrició amb els cicles dia-nit clarament visibles.

4.3 Llengües electròniques per a aplicacions mediambientals

Aprofitant l'experiència en la determinació d'ions alcalins i anions obtinguda amb la llengua per al monitoratge als hivernacles i l'experiència inicial del grup en el desenvolupament de llengües electròniques[13], es va plantejar l'ús de diferents sistemes en el monitoratge mediambiental. Una primera llengua electrònica es va aplicar en el monitoratge simultani d'amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat en un reactor continu de tanc agitat (RCTA) que simulava una aigua superficial. L'objectiu era poder avaluar l'efecte de la biodegradació natural sobre aquestes espècies. Una segona aplicació va ser el monitoratge simultani d'amoni, potassi i sodi en la presa Ignacio Ramírez (IR) (Mèxic). En aquestes primeres dues aplicacions es va usar la transmissió de dades per radiofreqüència entre el punt de mesura dels sensors i l'ordinador on es recollien i emmagatzemaven les lectures. Finalment, es va optimitzar la fabricació manual d'una matriu serigrafiada de cinc sensors, la qual es va aplicar posteriorment a la determinació simultània d'amoni, potassi i sodi en mostres sintètiques i aigua de la mateixa presa IR.

4.3.1 Llengua electrònica per al monitoratge de la concentració d'ions alcalins i anions en un RCTA

4.3.1.1 Construcció del model de resposta basat en XNA

En aquesta primera aplicació mediambiental, la matriu de sensors usada estava formada per 11 sensors de diferent selectivitat: dos sensors per amoni, dos per potassi, dos per sodi, un per nitrat i un per clorur basat en Ag/AgCl. La matriu la completaven tres sensors de resposta genèrica: dos a ions alcalins basats en dibenzo-18-corona-6 i lasalocida, respectivament, i un a anions, basat en TOAB.

Les entrades a la XNA van ser en aquest cas els potencials referenciats dels 11 elèctrodes i la temperatura. La solució de referència que es mesurava periòdicament era una aigua superficial sintètica preparada al laboratori, que també es va usar com a medi iònic per a preparar les mostres d'entrenament i de validació externa.

Es van estudiar les 16 configuracions diferents que resulten de combinar les funcions de transferència *tansig* i *logsig*, i un nombre de neurones en la capa oculta entre tres i 10. La resta de paràmetres estaven fixats a priori.

Primer, per a escollir la millor funció de transferència després de la capa oculta, es van representar els RMSE (el total i l'individual per a cada espècie) en front del nombre de neurones de la capa oculta (Figura 4.14). Aquests RMSE s'obtenen fent la mitja entre tres replicats d'entrenament de la mateixa configuració.

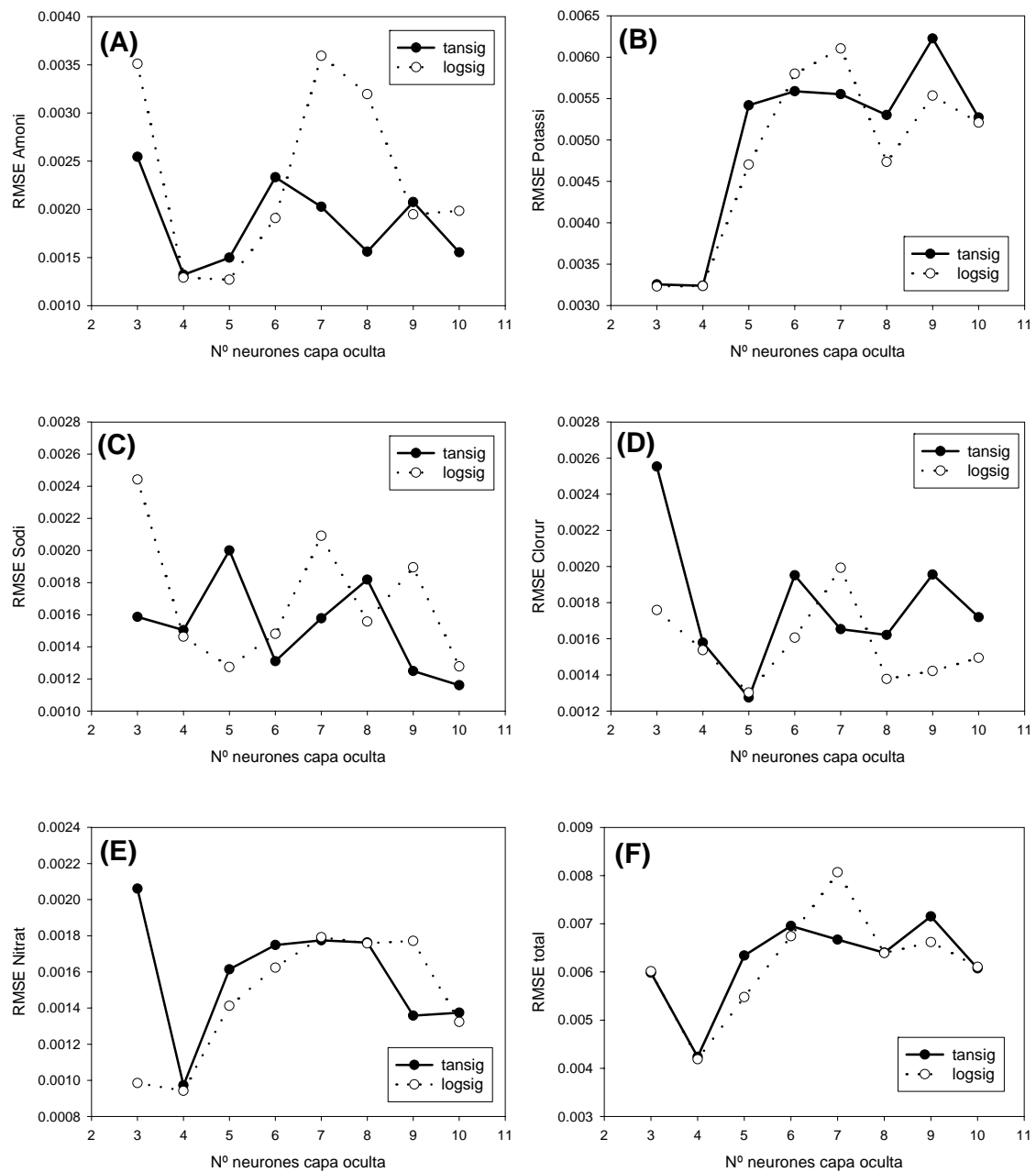


Figura 4.14 Representació dels RMSE (M) en front del nombre de neurones a la capa oculta per a cada espècie: (A) amoni, (B) potassi, (C) sodi, (D) clorur i (E) nitrat; i el total (F).

En els gràfics no s'observen grans diferències entre els RMSE de les dues funcions, encara que, en general, s'obtenen errors més petits amb la funció *tansig*.

El segon pas va consistir a representar el pendent, l'ordenada a l'origen i el coeficient de correlació de les rectes comparatives entre els valors trobats i els esperats per a les mostres de validació externa en front del nombre de neurones (Figura 4.15). Els valors també s'obtenen com a mitja de tres replicats de la mateixa configuració.

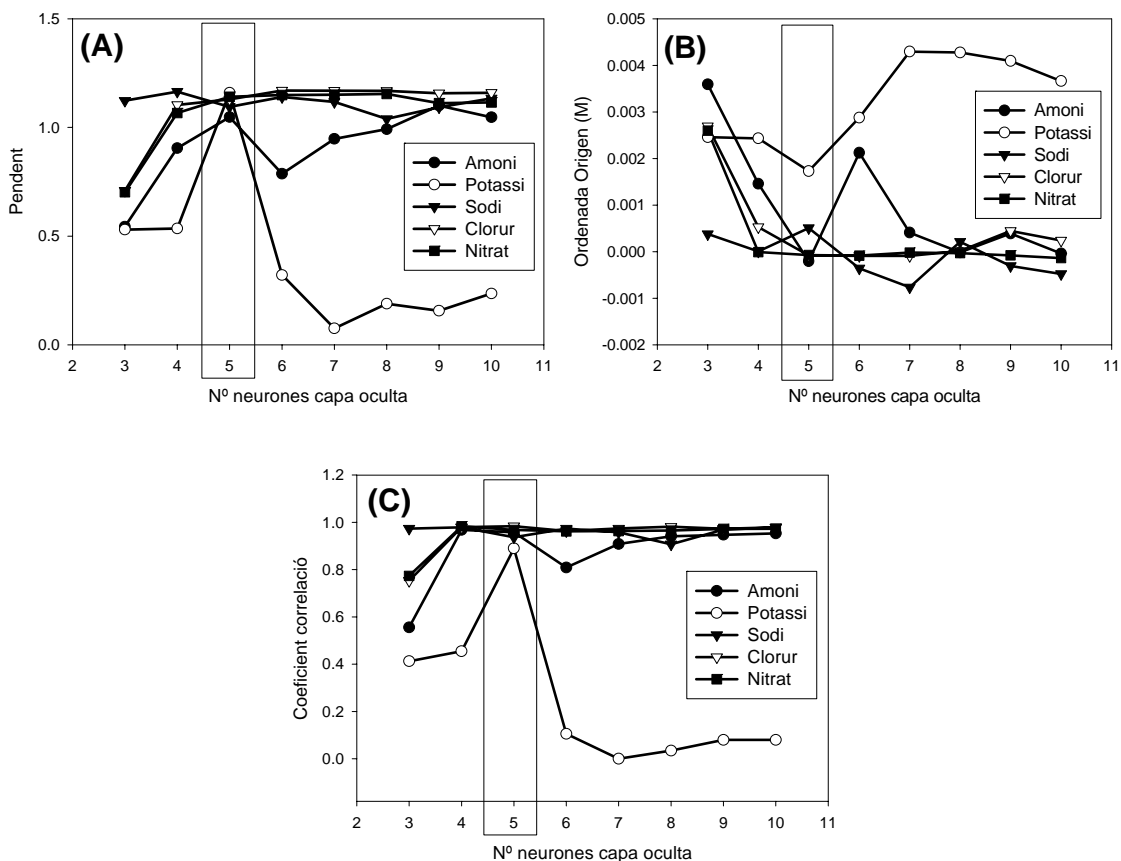


Figura 4.15 Representacions del pendent (A), l'ordenada a l'origen (B) i el coeficient de correlació (C) de les rectes comparatives entre els valors trobats i els esperats per a les mostres de validació externa en funció del nombre de neurones a la capa oculta.

En aquest cas es va escollir la configuració amb cinc neurones ja que és la que proporciona millors resultats en el cas de l'ió potassi, amb un pendent molt proper a la unitat, una ordenada a l'origen per sota de 0.002 i un coeficient de correlació molt significatiu. Per tant, l'arquitectura òptima de la xarxa utilitzava l'algorisme d'entrenament de RB i constava de cinc neurones a la capa oculta les quals empraven la funció de transferència *tansig*.

Per tal de visualitzar la correcta modelització assolida, es van representar els valors trobats en funció dels esperats per a les 10 mostres de validació externa, les quals no van participar en cap moment en el procés d'entrenament. Les mostres es van mesurar en tres torns a diferent temperatura (un amb totes elles a temperatura ambient, altre amb la meitat a temperatura més elevada i l'últim amb l'altra meitat a temperatura més baixa) i per tant, en realitat tenim 20 punts de validació externa. La Figura 4.16 mostra aquesta comparativa.

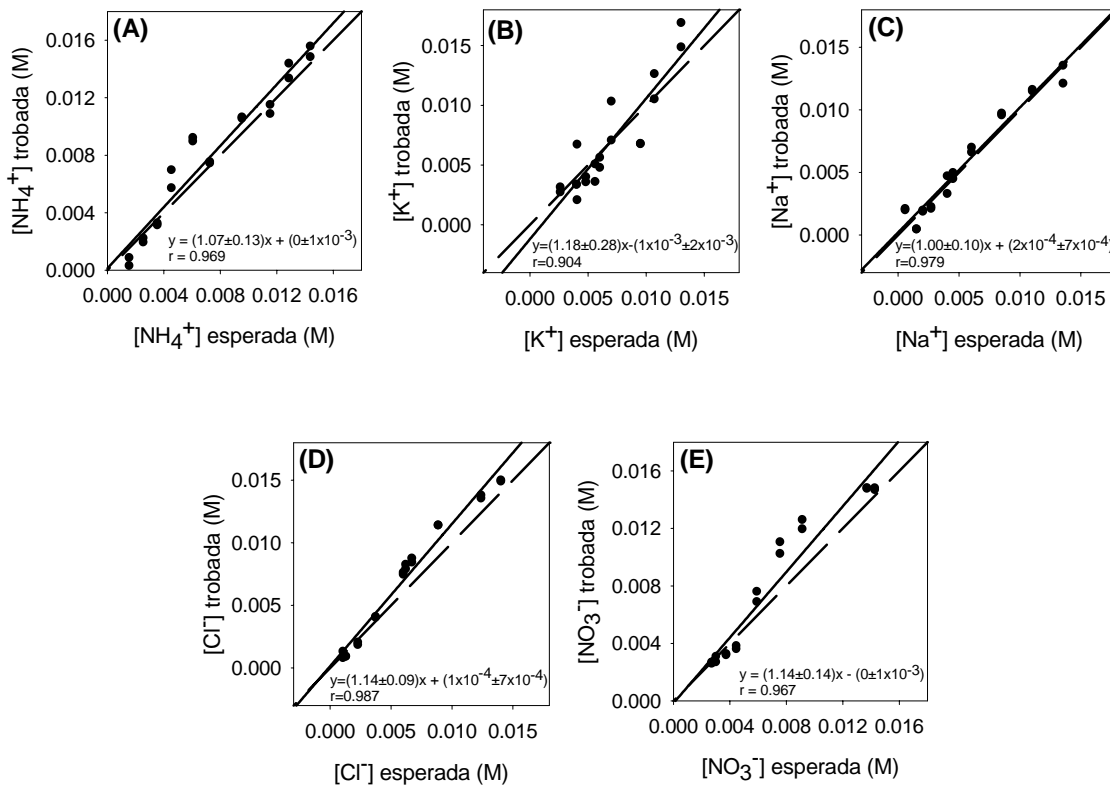


Figura 4.16 Ajustos obtinguts per als ions amoni (A), potassi (B), sodi (C), clorur (D) i nitrat (E) en el conjunt de validació externa. La línia discontinua mostra la idealitat i la sòlida, la recta de regressió experimental, els paràmetres de la qual, calculats a un nivell de confiança del 95 %, es mostren a la mateixa gràfica.

Com es pot comprovar, totes les rectes experimentals són indistingibles de la idealitat donat que inclouen el pendent unitat i l'ordenada zero dintre de l'interval de confiança.

4.3.1.2 Aplicació en un RCTA

Una vegada demostrada l'aplicabilitat del model, es va aplicar la llengua electrònica en el monitoratge de la concentració d'amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat en un RCTA que conté la mateixa aigua superficial sintètica que es va usar anteriorment com a medi de fons en les mostres d'entrenament. A la Figura 4.17 es mostra el sistema complet.

En un RCTA el volum és constant i per tant el cabal d'entrada (Q_1) és igual al cabal de sortida (Q_2). En aquestes condicions, l'equació que relaciona la concentració de les espècies dins el reactor amb el temps és una exponencial negativa (4.1):

$$C(t) = C_0 \exp\left(-\frac{Q}{V}t\right) \quad (4.1)$$

on $C(t)$ és la concentració al temps t , C_0 és la concentració inicial, Q és el cabal i V és el volum del tanc. A partir d'aquí es defineix la constant de temps del sistema τ (4.2):

$$\tau = \frac{V}{Q} \quad (4.2)$$

Sota condicions de mescla perfecta, aquesta constant de temps és el temps de residència mitjà, és a dir, el temps mitjà que una espècie passa dins del tanc abans de sortir-ne.

En el muntatge experimental proposat, el volum del tanc va ser 1.5 l i es va omplir amb l'aigua superficial sintètica. Els cabals d'entrada i sortida estaven controlats per una bomba peristàltica de quatre canals (Gilson Minipuls 2, França) i es van fixar tots dos a 1.0 ml/min. Per tant, el temps de residència en aquest RCTA era de 1.04 dies. Finalment, el tanc es va inocular amb 10 ml d'aigua provinent de la riera de Nespres, al seu pas pel poble de Mura (Barcelona), per tal d'imitar les condicions de biodegradació naturals. Quan el sistema es va estabilitzar, s'hi van abocar al tanc 15 ml d'un fertilitzant líquid concentrat a base de guano (Compo, Espanya) i es van prendre mesures cada 20 minuts. Els potencials de la matriu de sensors, un cop filtrats i amplificats, van ser transmesos per radiofreqüència a l'ordinador.

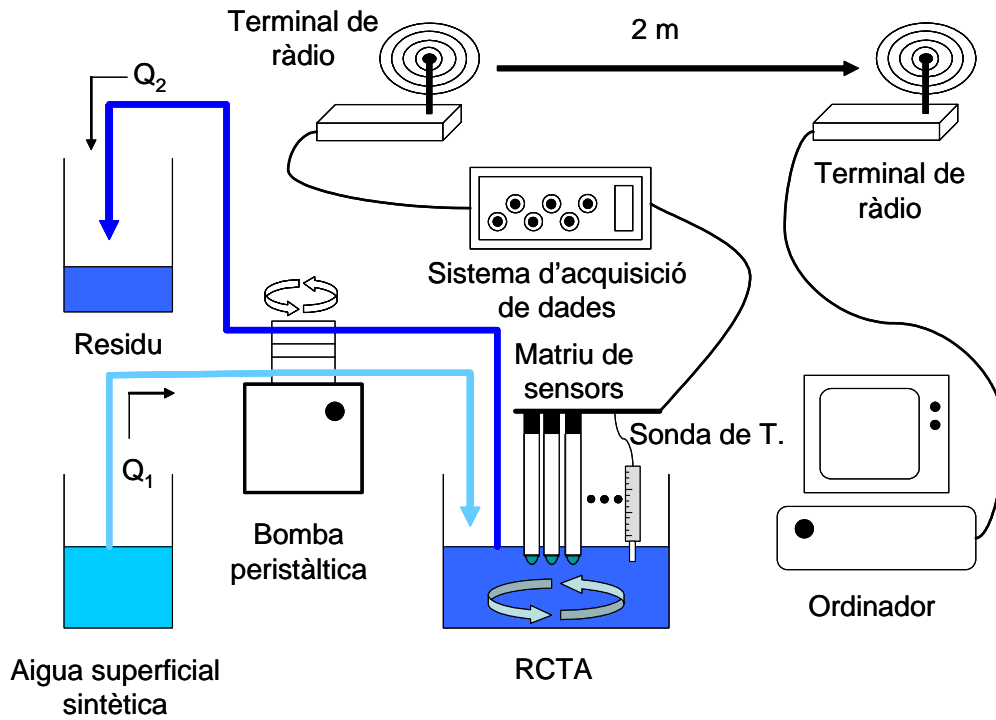


Figura 4.17 Diagrama complet del sistema proposat per al monitoratge d'amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat en un RCTA.

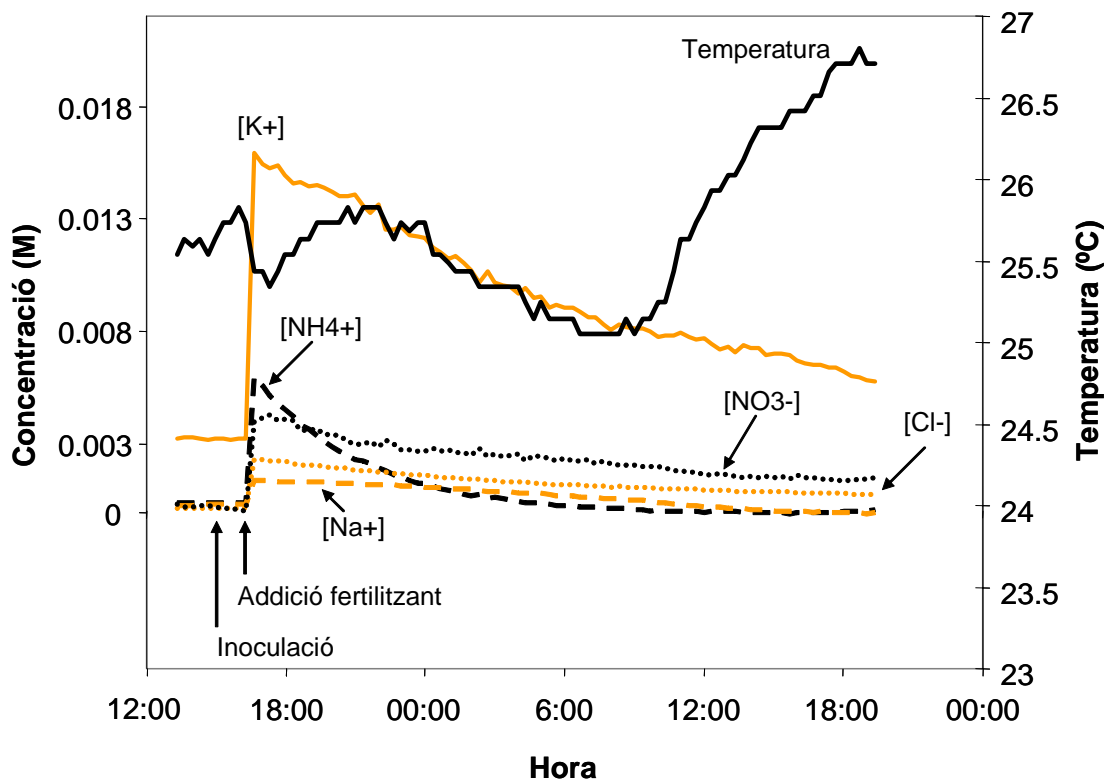


Figura 4.18 Representació de les concentracions trobades per la llengua electrònica pels cinc ions considerats: amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat, en el RCTA durant les primeres 24 hores de monitoratge. La variació de la temperatura de la solució també està representada.

Amb la XNA que hem optimitzat prèviament, les dades primàries va ser transformades en informació analítica. La Figura 4.18 representa les primeres 24 h de monitoratge amb la concentració trobada per la llengua electrònica dels cinc ions considerats, juntament amb la temperatura de la solució. L'experiment es va dur a terme els dies 4 i 5 de maig de 2006, que són els dos dies que apareixen a la gràfica. Els resultats demostren que la llengua electrònica és capaç de corregir l'efecte de la temperatura, ja que no s'observen grans variacions en la tendència de les concentracions. També s'observa que l'amoni desapareix més ràpidament que la resta d'ions del tanc. Per a comprovar aquest fet, es van ajustar aquests valors experimentals a l'equació (4.1) linealitzada, mitjançant el software Sigmaplot 8.0:

$$\ln C(t) = \ln C_0 - \frac{Q}{V}t \quad (4.3)$$

A partir d'aquestes rectes es va obtenir el temps de residència per a cada ió considerat, els quals es mostren a la Taula 4.7. Mentre que els ions potassi, clorur i nitrat tenen un temps de residència pràcticament indistingible del fixat pel nostre sistema (1.04 dies), el temps de residència de l'ió amoni és molt inferior, demostrant que es veu més afectat per la biodegradació natural provocada pels microorganismes introduïts al tanc.

Taula 4.7 Valors del temps de residència obtinguts a partir de l'ajust de les dades experimentals, amb un nivell de confiança del 95 %, per als cinc ions considerats a l'estudi.

Analit	Temps de residència trobat (Dies)	Coefficient de regressió (r)
Amoni	0.170±0.004	0.999
Potassi	1.08±0.03	0.994
Sodi	0.62±0.05	0.935
Clorur	0.99±0.02	0.995
Nitrat	1.02±0.02	0.984

Per altra banda, s'ha de destacar que la transmissió de dades per radiofreqüència va funcionar sense problemes durant tot l'experiment.

4.3.2 Llengua electrònica per al monitoratge de la concentració d'amoni, potassi i sodi en la presa IR (Mèxic)

4.3.2.1 Construcció del model de resposta basat en XNA

En aquesta segona aplicació mediambiental només es van tenir en consideració els tres cations amoni, potassi i sodi i per tant, la matriu usada va ser més simple. Estava formada per nou sensors en total: dos sensors per amoni, dos per potassi, dos per sodi i dos sensors de resposta genèrica a ions alcalins basats en dibenzo-18-corona-6. Finalment es va afegir un sensor de pH basat en TDDA per a completar els nou canals del sistema d'adquisició de dades.

Les entrades a la XNA van ser en aquest cas els potencials referenciats dels nou elèctrodes i la temperatura. La composició de la solució de referència que es mesurava periòdicament va ser 5×10^{-5} M d'amoni, potassi i sodi en medi 0.01 M d'imidazole. Les mostres d'entrenament i de validació externa van ser preparades fent servir una dilució 1:2 d'aigua de la mateixa presa IR i aigua Milli-Q com a medi iònic.

Després de fer un estudi comparatiu de les configuracions, equivalent al de la aplicació anterior, finalment, es va trobar que la configuració que donava millors resultats va ser la que tenia nou neurones amb la funció de transferència *tansig*.

Per tal de visualitzar la correcta modelització assolida, es van representar els valors trobats en funció dels esperats per a les 10 mostres de validació externa, les quals no van participar en cap moment en el procés d'entrenament. Les mostres es van mesurar en tres torns a diferent temperatura però, a diferència de totes les experiències anteriors, les 37 mostres (27 d'entrenament i 10 de validació externa) es van mesurar a tres temperatures (temperatura ambient, alta i baixa). Per tant, en aquest cas tenim 30 punts de validació externa. La Figura 4.19 mostra aquesta comparativa.

Com es pot comprovar, totes les rectes experimentals són indistingibles de la idealitat donat que inclouen el pendent unitat i l'ordenada zero dintre de l'interval de confiança.

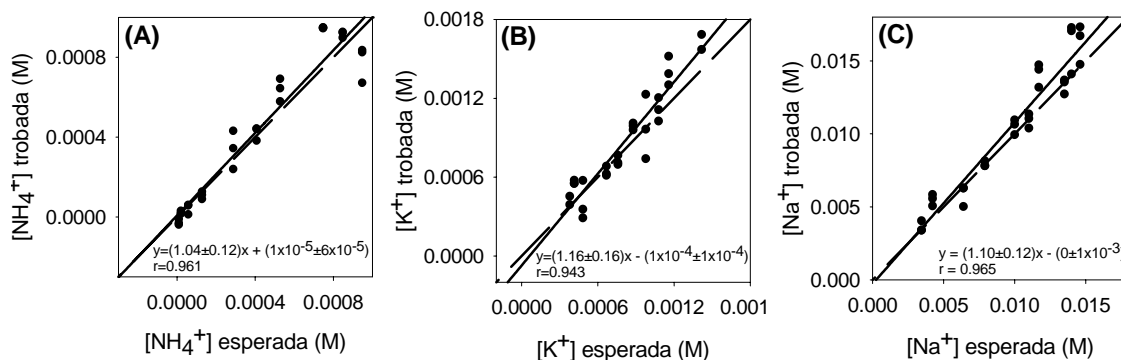


Figura 4.19 Ajustos obtinguts per als ions amoni (A), potassi (B) i sodi (C) en el conjunt de validació externa. La línia discontinua mostra la idealitat i la sòlida, la recta de regressió experimental, els paràmetres de la qual, calculats a un nivell de confiança del 95 %, es mostren a la mateixa gràfica.

4.3.2.2 Aplicacions en mostres reals i a la presa IR

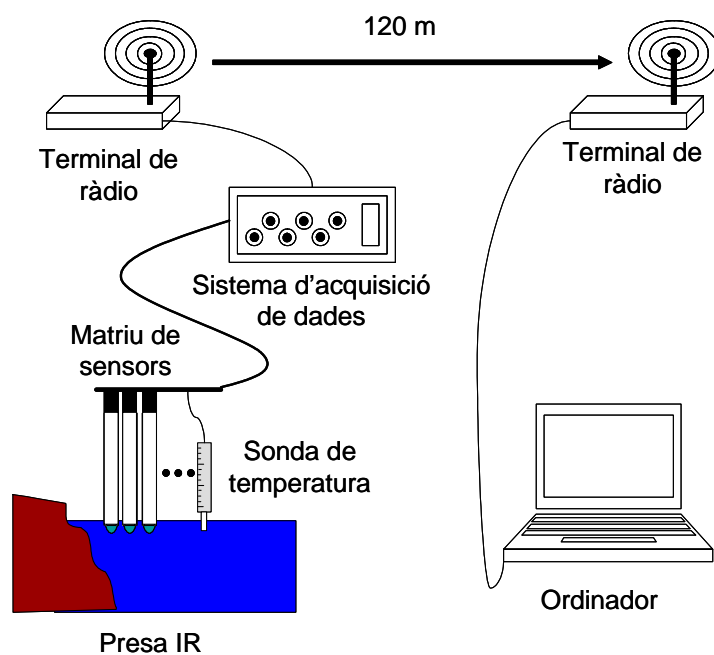
La presa Ignacio Ramírez ocupa una superfície de 500 Km² i va ser construïda al 1964 al riu La Gavia, a l'Estat de Mèxic (Mèxic). El nivell de les seves aigües és fluctuant i es localitza en un medi rural, envoltat d'explotacions agràries i ramaderes. El sòl al seu voltant està molt exposat a l'erosió i molts sediments van a parar a les seves aigües. A més, el clima a la zona és subhúmit, amb pluges des del juliol fins al setembre [14]. Per tant, per les seves característiques, aquesta presa es presenta com un medi ideal per a comprovar la robustesa i viabilitat de la nostra llengua electrònica.

Abans de fer l'experiment en camp, la llengua electrònica es va aplicar a mostres reals procedents de la presa IR. Els valors trobats per la llengua electrònica es van comparar amb els valors determinats per mètodes de referència. Les concentracions de referència de l'amoni es van obtenir mitjançant el mètode de Nessler i les de potassi i sodi, mitjançant l'espectroscòpia d'absorció atòmica.

Pel que fa a les mostres, van ser mostrejades en quatre punts diferents de la presa. Un cop filtrades, es van fer diferents dilucions 3:2 i 2:3 amb aigua Milli-Q. En la Taula 4.8 es mostren els errors relatius del logaritme de la concentració per als tres ions considerats. També es van mesurar les mostres sense diluir i es van obtenir uns errors relatius mitjans del 7.0 % per a l'amoni, del 13.1 % per al potassi i del 24.5 % per al sodi. S'observa doncs que els pitjors resultats s'obtenen en la determinació de l'ió sodi.

Taula 4.8 Errors relatius obtinguts en la determinació dels tres ions en mostres reals de la presa IR.

Mostra	Dilució	Error Rel. (%) NH_4^+	Error Rel. (%) K^+	Error Rel. (%) Na^+
Real 1	3:2	-1.6	-7.9	-10.7
Real 2	2:3	0.2	-2.6	-8.5
Real 3	2:3	-2.2	-2.0	-11.2
Real 4	2:3	-1.4	-1.2	-3.5
Real 1	3:2	12.9	-4.7	-9.7
Real 2	2:3	-2.2	-2.1	-7.9
Real 3	2:3	7.3	-1.1	-12.0
Real 4	2:3	11.9	-0.4	-3.6
Real 1	3:2	1.2	-8.9	-11.0
Real 2	2:3	-2.2	-2.6	-8.1
Real 3	2:3	-2.2	-3.2	-11.4
Real 4	2:3	-5.9	-2.3	-3.3
Error relatiu mitjà (%)		4.3	3.2	8.4

**Figura 4.20** Diagrama complet del sistema proposat per al monitoratge d'amoní, potassi i sodi en la presa Ignacio Ramírez.

Una vegada demostrada l'aplicabilitat del model amb mostres reals, es va aplicar la llengua electrònica en el monitoratge de la concentració d'amoni, potassi i sodi directament en la presa IR. A la Figura 4.20 es mostra el sistema complet. Es van prendre mesures cada minut. Els potencials un cop filtrats i amplificats, van ser transmesos per radiofreqüència a l'ordinador. Amb la XNA que hem optimitzat prèviament, les dades primàries va ser transformades en informació analítica. La Figura 4.21 representa les gairebé 2 hores de monitoratge que es van fer amb la concentració trobada per la llengua electrònica dels tres ions considerats, juntament amb la temperatura de la solució.

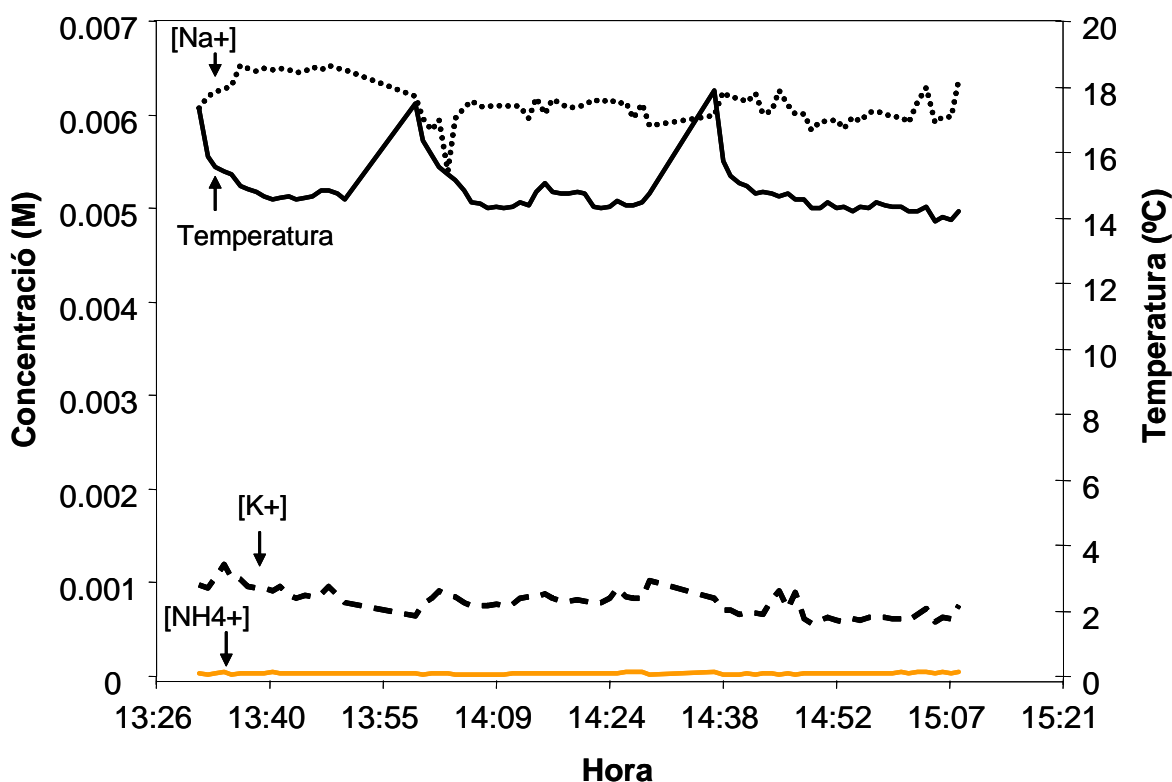


Figura 4.21 Representació de les concentracions trobades per la llengua electrònica pels cations considerats: amoni, potassi i sodi, durant el monitoratge a la presa IR. La temperatura de l'aigua també es troba representada.

Aquest experiment es va dur a terme el dia 6 de desembre de 2006. Els augments sobtats de temperatura que s'observen al gràfic i que són deguts al pas periòdic de la solució de referència, la qual es trobava a una temperatura superior, no alteren la tendència de les concentracions. Per tant, en aquest cas també podem afirmar que la

llengua electrònica és capaç de corregir l'efecte de la temperatura sobre la resposta dels sensors. Pel que fa als valors trobats, aquests són molt estables, cosa que era d'esperar en un experiment de només 2 hores. Però el més important és que tant els valors d'amoni com els de potassi són força semblants als trobats en les mostres reals per mètodes ben establerts: la concentració de potassi, al voltant de 0.001 M i la d'amoni, al voltant de 2.5×10^{-5} M. Per al sodi, en canvi, el valor trobat durant el seguiment (al voltant de 0.006 M) era gairebé un 40 % inferior al determinat per absorció atòmica, que estava al voltant de 0.01M. Això pot ser degut a la saturació del propi elèctrode de sodi en un medi tant concentrat d'ions i interferències.

Per altra banda, la transmissió de dades per radiofreqüència va funcionar sense problemes durant tot l'experiment.

4.3.3 Llengua electrònica per a la determinació d'ions alcalins emprant una matriu de sensors serigrafada

4.3.3.1 Caracterització dels sensors serigrafats

Abans de la preparació de la matriu serigrafada de cinc sensors, es va avaluar la reproductibilitat del mètode de fabricació descrit a l'apartat 3.2.1.3. Per això, cinc sensors individuals, amb membranes basades en l'ionòfor dibenzo-18-corona-6, van ser calibrats en funció de la concentració de potassi mitjançant el mètode de les addicions conegudes (apartat 3.4.1). També es va avaluar la repetibilitat de la resposta fent cinc calibratges successius a un d'aquests sensors. La Figura 4.22 mostra les gràfiques dels dos estudis i la Taula 4.9, les equacions ajustades per a cada calibratge. A partir d'aquestes equacions, es va calcular la desviació estàndard relativa o coeficient de variació, considerant la sensibilitat a potassi d'aquests sensors. En el cas de la reproductibilitat del procés de fabricació es va obtenir un valor de 0.96 %, mentre que en l'estudi de repetibilitat, el valor va ser de 0.58 %.

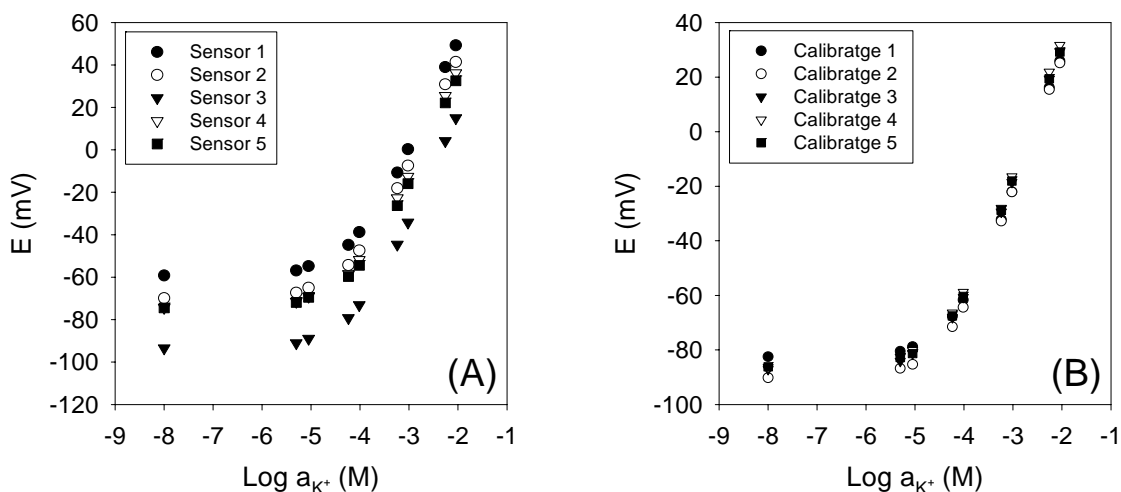


Figura 4.22 Calibratges obtinguts en els estudis de reproductibilitat (A) i repetibilitat de la resposta (B) dels sensors serigrafats individuals.

Taula 4.9 Ajustos obtinguts en els calibratges realitzats en els estudis de reproductibilitat i repetibilitat.

Reproductibilitat (n = 9)	
Sensor 1	$E(\text{mV}) = 154.7 + 51.5 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 7.4e-5)$, $r > 0.999$
Sensor 2	$E(\text{mV}) = 145.4 + 50.9 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 6.2e-5)$, $r > 0.999$
Sensor 3	$E(\text{mV}) = 119.6 + 51.3 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 7.3e-5)$, $r > 0.999$
Sensor 4	$E(\text{mV}) = 138.8 + 50.3 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 6.1e-5)$, $r > 0.999$
Sensor 5	$E(\text{mV}) = 135.8 + 50.6 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 7.4e-5)$, $r > 0.999$
Repetibilitat (n = 9)	
Calibratge 1	$E(\text{mV}) = 129.1 + 50.4 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 6.4e-5)$, $r > 0.999$
Calibratge 2	$E(\text{mV}) = 127.2 + 49.8 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 4.4e-5)$, $r > 0.999$
Calibratge 3	$E(\text{mV}) = 132.0 + 50.1 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 4.4e-5)$, $r > 0.999$
Calibratge 4	$E(\text{mV}) = 134.9 + 50.4 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 4.3e-5)$, $r > 0.999$
Calibratge 5	$E(\text{mV}) = 130.2 + 49.8 \cdot \text{Log}(a_{K^+} + 4.4e-5)$, $r > 0.999$

Finalment, es va avaluar el temps de vida i, sobretot, l'adherència de la membrana de PVC als diferents materials usats per a fabricar la matriu serigrafada. La Figura 4.23 mostra l'evolució de la sensibilitat i del LD dels tres sensors, també amb dibenzo-18-corona-6 a la seva formulació, que es van tenir en solució durant 37 dies naturals. En els sis calibratges realitzats no s'observen grans variacions d'aquests dos paràmetres.

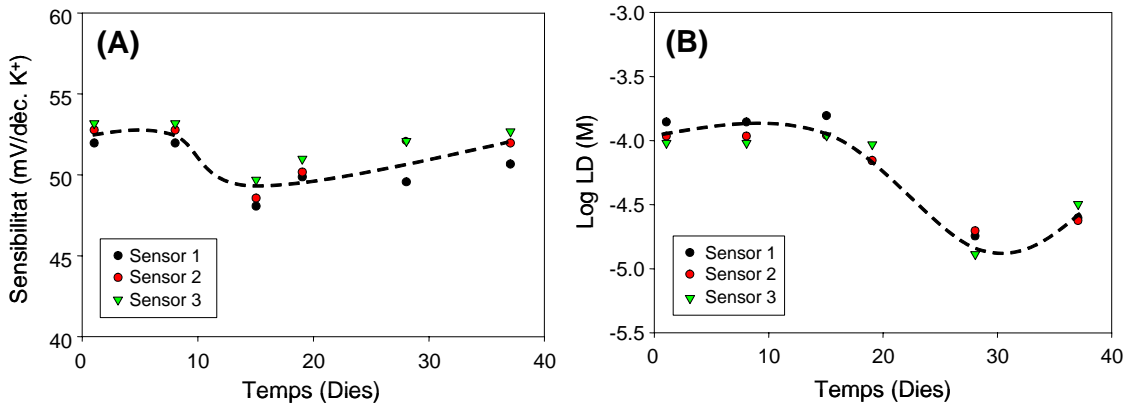


Figura 4.23 Variació de la sensibilitat (A) i del LD (B) al llarg del temps per als tres sensors serigrafiats usats en el seguiment de l'adherència de la membrana. La tendència es representa amb una línia discontinua. Solució de treball: aigua bidestil·lada.

4.3.3.2 Construcció del model de resposta basat en XNA

En aquesta aplicació mediambiental només es van tenir en consideració els tres cations amoni, potassi i sodi. La matriu serigrafiada estava formada per cinc sensors en total: un sensor per a l'amoni, un per al potassi, un per al sodi i dos sensors de resposta genèrica a ions alcalins basats un en dibenzo-18-corona-6 i l'altre en lasalocida.

Les entrades a la XNA van ser en aquest cas els potencials referenciats dels cinc elèctrodes. La composició de la solució de referència que es mesurava periòdicament va ser 5×10^{-5} M d'amoni, potassi i sodi en medi 0.01 M d'imidazole. Les mostres d'entrenament i de validació externa van ser preparades també en medi imidazole 0.01 M a $\text{pH} = 6.6$.

Després de fer un estudi comparatiu de les configuracions, equivalent al de les aplicacions anteriors, finalment, es va trobar que la XNA que era capaç de modelar millor el conjunt de dades de partida, és a dir que proporcionava RMSE petits i bones rectes comparatives per a les mostres de validació externa, tenia tres neurones a la capa oculta amb la funció de transferència *tansig*.

Per tal de visualitzar la correcta modelització assolida, es van representar els valors trobats en funció dels esperats per a les 10 mostres de validació externa, les quals no van participar en cap moment en el procés d'entrenament. En aquest cas no es va considerar la temperatura i les 37 mostres (27 de training i 10 de validació externa) es

van mesurar una única vegada a temperatura ambient. Per tant, els punts de validació externa són 10. La Figura 4.24 mostra aquesta comparativa.

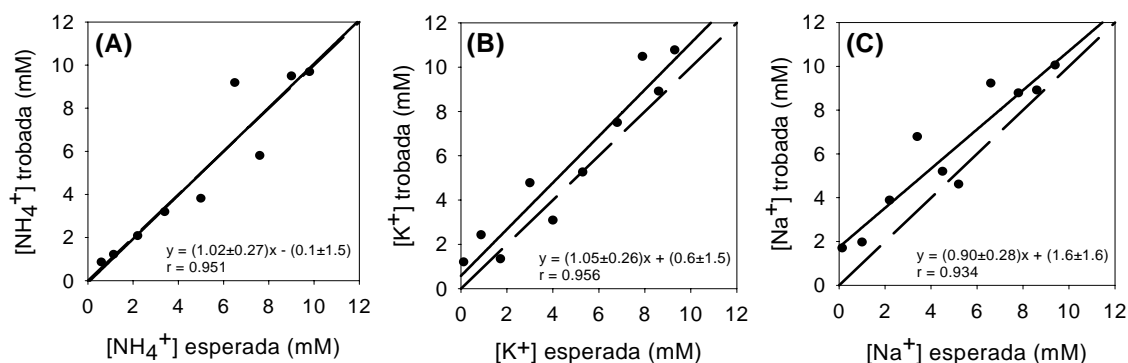


Figura 4.24 Ajustos obtinguts per als ions amoni (A), potassi (B) i sodi (C) en el conjunt de validació externa. La línia discontinua mostra la idealitat i la sòlida, la recta de regressió experimental, els paràmetres de la qual, calculats a un nivell de confiança del 95 %, es mostren a la mateixa gràfica.

Com es pot comprovar, totes les rectes experimentals són indistingibles de la idealitat donat que inclouen el pendent unitat i l'ordenada zero dintre de l'interval de confiança.

4.3.3.3 Aplicacions en mostres sintètiques i mostres reals

La primera aplicació de la llengua electrònica desenvolupada va ser amb cinc mostres sintètiques preparades al laboratori seguint la metodologia de preparació de les mostres d'entrenament. Per tant, es tracta de diferents mesclades amb amoni, potassi i sodi en el mateix tampó d'imidazole. Després es va fer l'aplicació amb mostres reals de la presa IR, mostrejades en cinc punts diferents de la presa. Una vegada filtrades, a 40 ml de cada mostra se li van afegir 10 ml de tampó imidazole 0.05 M a pH = 6.60, per a imitar el medi iònic de les mostres d'entrenament. Per tal d'obtenir una major variabilitat de les concentracions, es van preparar 10 *spiked samples* afegint diferents quantitats d'amoni, potassi i sodi a dilucions 1:2 i 1:3 de les mostres reals. Els valors trobats per la llengua electrònica es van comparar amb els valors determinats per mètodes de referència. Les concentracions de referència de l'amoni es van obtenir mitjançant la reacció de Nessler i les de potassi i sodi, mitjançant l'espectroscòpia d'absorció

atòmica. La Taula 4.10 mostra els resultats obtinguts en la determinació dels tres ions considerats tant en les mostres sintètiques com en les reals.

Taula 4.10 Resultats obtinguts en la determinació d'amoni, potassi i sodi en les mostres sintètiques i reals.

Mostres Sintètiques						
Mostra	Valors Esperats			Valors Llengua Electrònica		
	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)
Sintètica 1	0.31	4.7	5.9	0.15	3.7	4.2
Sintètica 2	5.4	0.40	3.4	7.9	0.45	1.4
Sintètica 3	2.2	0.86	0.62	2.8	0.37	0.26
Sintètica 4	9.0	6.5	0.35	10.8	8.1	0.10
Sintètica 5	3.3	10.0	7.9	5.8	9.5	7.5
Mostres Reals						
Mostra	Valors Mètodes de Referència			Valors Llengua Electrònica		
	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)
Real 1	0.036	1.2	14.4	0.026	0.59	0.47
Real 2	0.019	0.91	10.4	0.021	0.60	0.46
Real 3	0.016	0.87	14.4	0.024	0.59	0.62
Real 4	0.019	0.92	12.0	0.026	0.58	0.51
Real 5	0.017	0.89	8.0	0.024	0.59	0.57
Spiked 1	0.48	0.61	7.2	0.38	0.55	0.31
Spiked 2	5.0	0.46	5.2	7.3	0.68	0.35
Spiked 3	0.97	0.45	7.2	1.1	0.53	0.32
Spiked 4	9.9	0.46	6.0	7.0	1.1	0.10
Spiked 5	0.068	0.44	4.0	0.053	0.60	0.52
Spiked 6	3.0	1.2	8.6	4.7	3.3	4.1
Spiked 7	7.0	0.54	8.8	9.1	0.42	0.10
Spiked 8	0.48	0.93	5.1	0.40	0.98	0.36
Spiked 9	0.99	8.1	10.3	0.0017	9.2	8.4
Spiked 10	8.0	5.1	5.0	9.2	10.0	2.5

Per a demostrar l'aplicabilitat de la llengua electrònica, es va aplicar un test *t* de mostres aparellades tant a les mostres sintètiques com a les mostres reals. Aquest estudi estadístic serveix per a determinar mostra per mostra si existeixen diferències significatives. La Taula 4.11 mostra el valor de la *t* d'Student trobat i també el tabulat a un nivell de confiança del 95 % per als dos conjunts de mostres. Es pot apreciar que en

les mostres sintètiques, els valors trobats són en tots els casos inferiors al valor tabulat, confirmant així que no existeixen diferències significatives entre elles. En el cas de les mostres reals, el valor trobat per al sodi sí que supera, i de molt, el valor de la t tabulat al 95 %. De fet, si ens fixem a la Taula 4.10, les concentracions de sodi trobades amb la llengua electrònica són en tots els casos molt inferiors a les determinades pel mètode de referència. Això pot ser degut a les mateixes causes que hem comentat en el cas del monitoratge de la presa IR: la matriu d'aquesta presa és molt complexa, a més de tenir els ions sodi i potassi a unes concentracions molt elevades. No obstant, els valors trobats per als altres dos ions, amoni i potassi, sí que demostren que poden ser determinats amb el sistema proposat, compensant la forta interferència del sodi i dels altres ions.

Taula 4.11 Valors de la t d'Student calculats i tabulats per a l'estudi de mostres aparellades.

Mostres Sintètiques (n = 5)		
Espècie	Valor t calculat	Valor t tabulat al 95 %
Amoni	2.71	
Potassi	0.13	2.78
Sodi	2.52	
Mostres Reals (n = 15)		
Espècie	Valor t calculat	Valor t tabulat al 95 %
Amoni	1.03	
Potassi	1.33	2.14
Sodi	7.27	

4.3.3.4 Implementació en un sistema de flux

L'aplicació final que s'havia pensat per a la matriu serigrafiada preparada era la seva implementació en un sistema de flux. Com a primer pas, es va pensar en un sistema d'anàlisi tipus de flux aturat. Aprofitant l'estada a la Ciutat de Mèxic i el taller del que disposen en la *Sección de Bioelectrónica* del CINVESTAV, es va dissenyar i construir una cel·la de metacrilat per a la matriu de cinc sensors. L'esquema d'aquesta cel·la es mostra a la Figura 4.25.

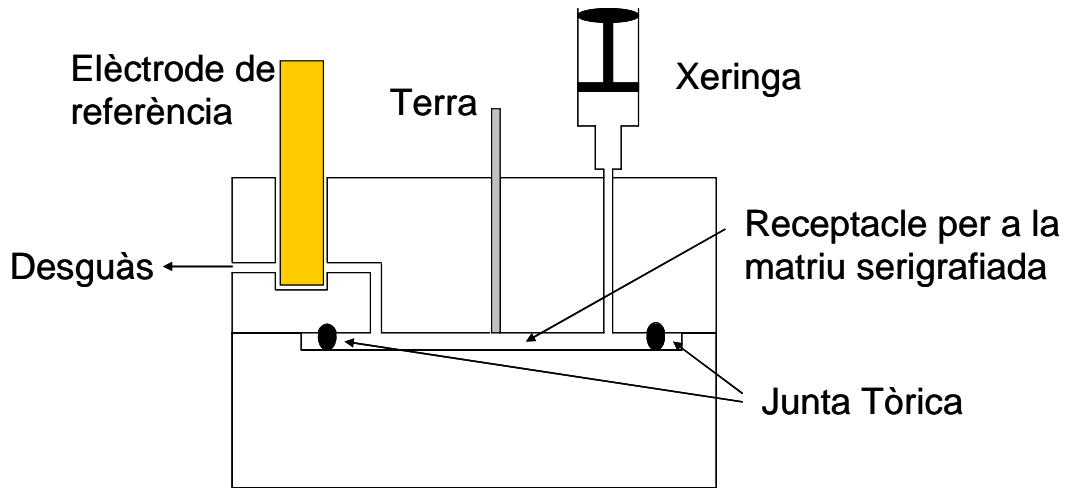


Figura 4.25 Esquema de la cel·la de metacrilat fabricada.

Un cop es va comprovar l'estanqueïtat del sistema es van fer calibratges amb els tres ions considerats: amoni, potassi i sodi. Donat que el volum mort, determinat pel gruix de la tòrica, era de $400\ \mu\text{l}$ es va considerar que un volum d'injecció de $2\ \text{ml}$ era suficient per a desplaçar la mostra anterior i evitar els efectes de memòria dels sensors. A la Figura 4.26 es mostra una fotografia de la cel·la construïda en un moment dels calibratges i a la Figura 4.27 es mostren les corbes obtingudes. Es pot observar que abans de que comenci la zona lineal de resposta, entre 10^{-4} i $10^{-3}\ \text{M}$, la lectura és inestable, sobretot en el cas del sensor de sodi.

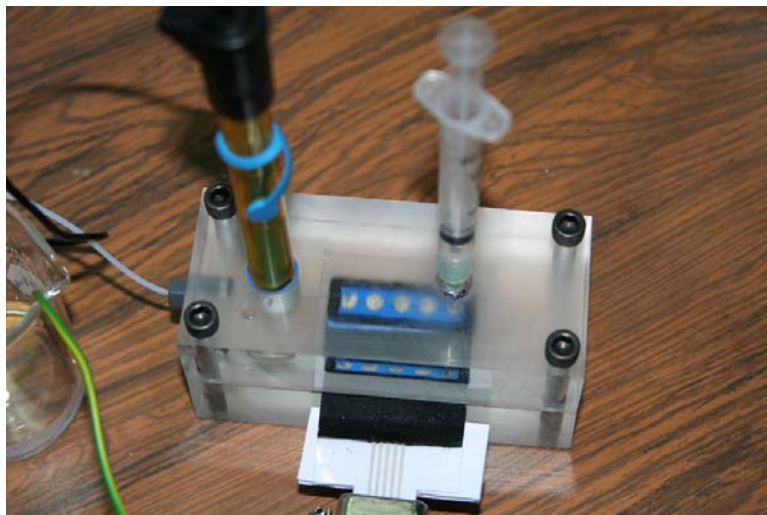


Figura 4.26 Fotografia de la cel·la de flux aturat en funcionament.

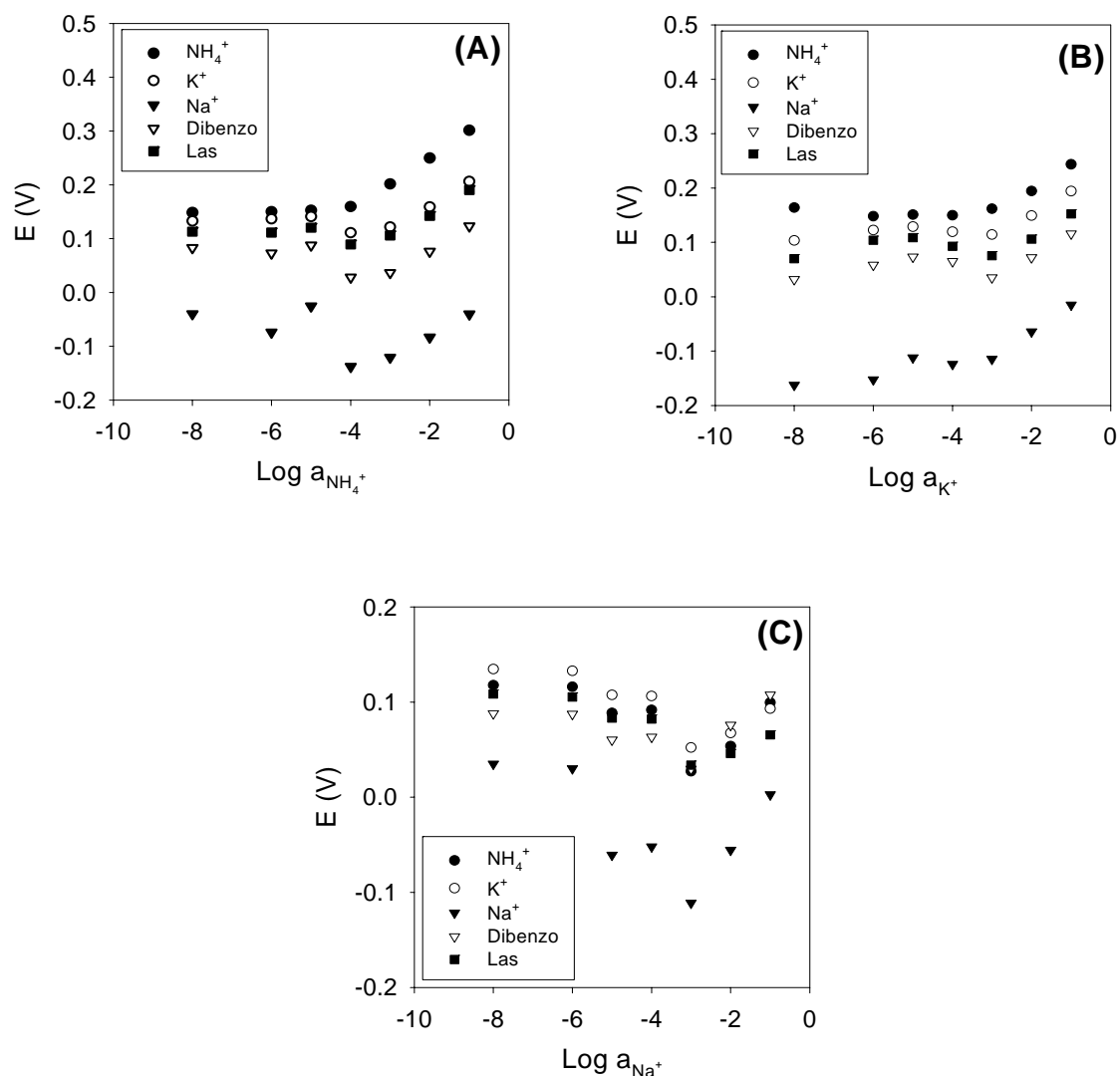


Figura 4.27 Calibratges de la matriu serigrafiada obtinguts per a amoni (A), potassi (B) i sodi (C) usant la cel·la de flux aturat.

El fet que es formin bombolles d'aire dins la cel·la i els efectes de memòria dels elèctrodes en poden ser els causants. Per això, es va polir la part superior del receptacle per a la matriu de sensors i eliminar així les possibles cavitats que afavoreixen l'aparició de bombolles. També es va augmentar el volum mort fins als 800 μl (i el volum d'injecció fins als 5 ml) amb una tòrica més gruixuda. Amb aquests canvis, es van tornar a realitzar els calibratges i, tot i que no es van observar millores respecte al comportament descrit anteriorment, el calibratge amb potassi en sentit ascendent i descendent de concentració va mostrar una resposta molt reproducible (Figura 4.28).

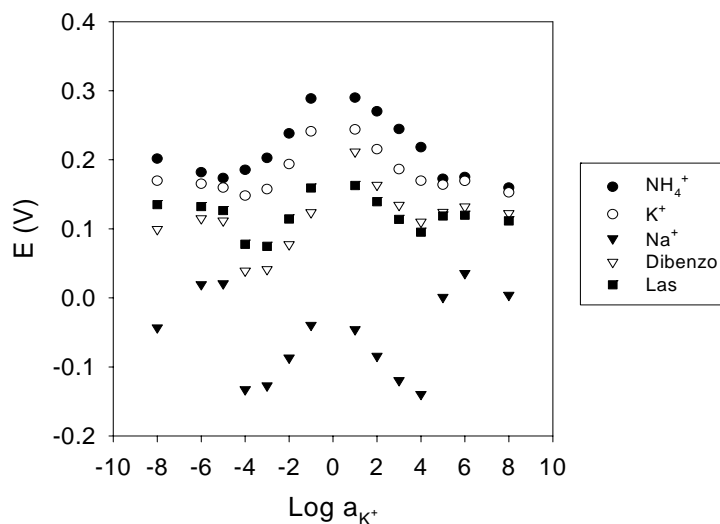


Figura 4.28 Calibratge amb potassi en sentit ascendent i descendent de concentració, realitzat a la matriu serigrafiada amb la cel·la de flux aturada millorada.

El fet que aquest comportament només s'observés quan la matriu estava implementada en flux fa pensar en els efectes de pressió com a possibles causants. Amb tot, estudis posteriors han demostrat que el tetrahidrofuran en el qual es dissol la membrana sensora és capaç de travessar la capa de grafit i atacar directament la pista conductora de plata provocant-hi fractures.

4.4 Llengües electròniques basades en matrius de biosensors

4.4.1 Llengua electrònica per a la determinació d'urea i ions alcalins en mostres clíniques

Es va aplicar un sistema analític per a la determinació d'urea, amoni, potassi i sodi, que utilitzava un conjunt de sensors i biosensors químics de resposta no específica, els quals generaven un conjunt multivariable de dades, que posteriorment va ser tractat per a l'obtenció de resultats útils.

La novetat d'aquest treball era el fet que per primera vegada al grup s'incorporaven biosensors a una llengua electrònica potenciomètrica. Concretament, la matriu estava formada per quatre biosensors d'urea, dos amb transductor d'amoni i dos amb

transductor de pH. Aquests biosensors estaven basats en l'enzim ureasa, el qual es trobava immobilitzat covalentment a la membrana sensora mitjançant la reacció de la carbodiimida. La matriu es completava amb vuit ESIs de diferent selectivitat en funció de l'ionòfor emprat, tal i com es detalla en l'apartat 3.2.1.2: dos per a l'amoni, dos per al potassi, dos per al sodi, un per a pH i un de resposta genèrica a alcalins del tipus Genèric (I). En total 12 elèctrodes. La modelització de la resposta conjunta a les quatre espècies es va efectuar mitjançant dues eines quimiomètriques, les XNAs i el PLS, amb l'objectiu de comparar els resultats obtinguts.

4.4.1.1 Caracterització dels biosensors d'urea

Com ja s'ha dit amb anterioritat, els dispositius que formen part d'una matriu de sensors han de mantenir estables els seus paràmetres de resposta[15]. Per tant, el primer va ser comprovar l'estabilitat dels biosensors. La Taula 4.12 mostra els paràmetres de calibratge dels biosensors replicats (dispositius A i B, construïts amb la mateixa metodologia i de manera paral·lela). Així mateix, en la Figura 4.29 es mostra la variació de la sensibilitat i del LD dels mateixos dispositius amb el temps durant 20 dies naturals d'estudi.

Taula 4.12 Paràmetres de calibratge dels diferents biosensors d'urea en tampó tris(hidroximetil)aminometà (TRIS) 0.05 M a pH 7.5, $E = A + B \cdot \log([\text{urea}] + LD)$. Entre parèntesis s'indiquen les desviacions estàndard. El LD està calculat segons es recomana a potenciometria[16].

Transductor	Dispositiu	A (s)	B (s)	LD (s)	r
		mV	mV/dèc	M	
Amoni	A	144.7 (2.9)	29.8 (0.9)	1.2E-04 (5.3E-05)	0.992
	B	126.8 (2.0)	32.2 (1.2)	1.0E-04 (3.9E-05)	0.998
pH	A	102.9 (1.5)	-8.9 (0.6)	1.6E-04 (2.0E-05)	0.991
	B	97.0 (1.0)	-11.2 (0.9)	1.6E-04(2.6E-05)	0.993

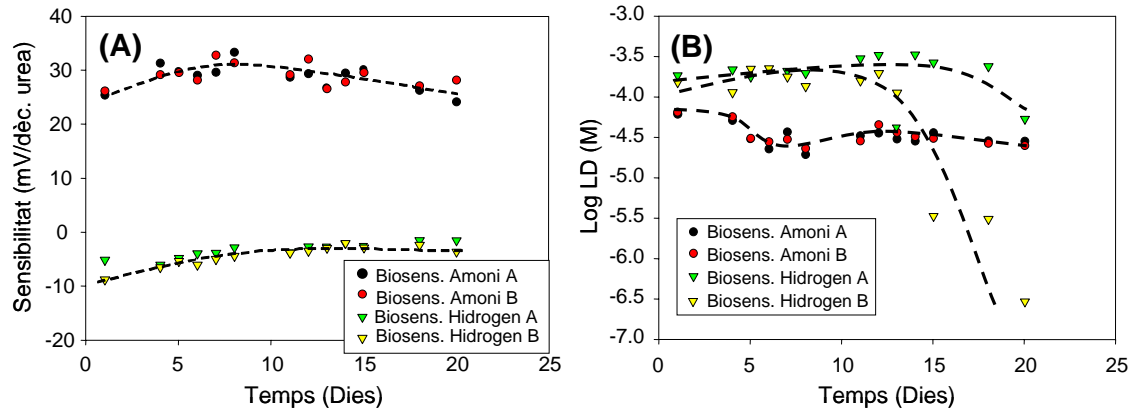


Figura 4.29 Variació de la sensibilitat (A) i del LD (B) al llarg del temps per als dos tipus de biosensors d'urea amb dades dels dispositius replicats. La tendència es representa amb una línia discontinua. Solució de treball: tampó TRIS 0.05 M a pH 7.5.

S'observa que els biosensors amb transductor potenciomètric d'amoni presenten un pendent al voltant de 30 mV/dècada. Aquest pendent és inferior al teòric (59.16 mV/déc.) a causa de la cinètica enzimàtica. A més d'aquest control de la cinètica sobre la termodinàmica de l'elèctrode, la conveniència de tenir el medi tamponat al pH òptim de treball de l'enzim fa que el biosensor amb transductor de pH tingui un pendent al voltant de -10 mV/dècada. Pel que fa al seguiment de la sensibilitat, s'ha de destacar que els de transductor de pH perden més del 50 % de la seva sensibilitat inicial en els primers dies, a diferència dels d'amoni. També s'observa un comportament diferent en el cas de l'evolució del LD: mentre que els biosensors amb membrana selectiva a amoni el mantenen pràcticament constant des de l'inici, els biosensors amb membrana selectiva a ió H^+ presenten molta variació i, de fet, en els últims cinc dies d'estudi es fa molt petit en el cas del biosensor B (es fa gran el Log).

4.4.1.2 Construcció dels dos models de resposta: XNA i PLS

Les dades que es van usar com a entrades a la XNA i com a variables independents en el PLS van ser en aquest cas els potencials dels 12 elèctrodes que formen la matriu. Com a medi iònic per a preparar les mostres d'entrenament i de validació externa es va usar tampó TRIS 0.05 M a pH 7.5.

En la configuració de la XNA, es van estudiar les 16 configuracions diferents que resulten de combinar les funcions de transferència *tansig* i *logsig*, i un nombre de neurones en la capa oculta entre tres i 10. La resta de paràmetres estaven fixats a priori. Primer per a escollir la millor funció de transferència després de la capa oculta es van representar els RMSE (el total i l'individual per a cada espècie) en front del nombre de neurones de la capa oculta (Figura 4.30). Aquests RMSE s'obtenen fent la mitja entre tres replicats d'entrenament de la mateixa configuració.

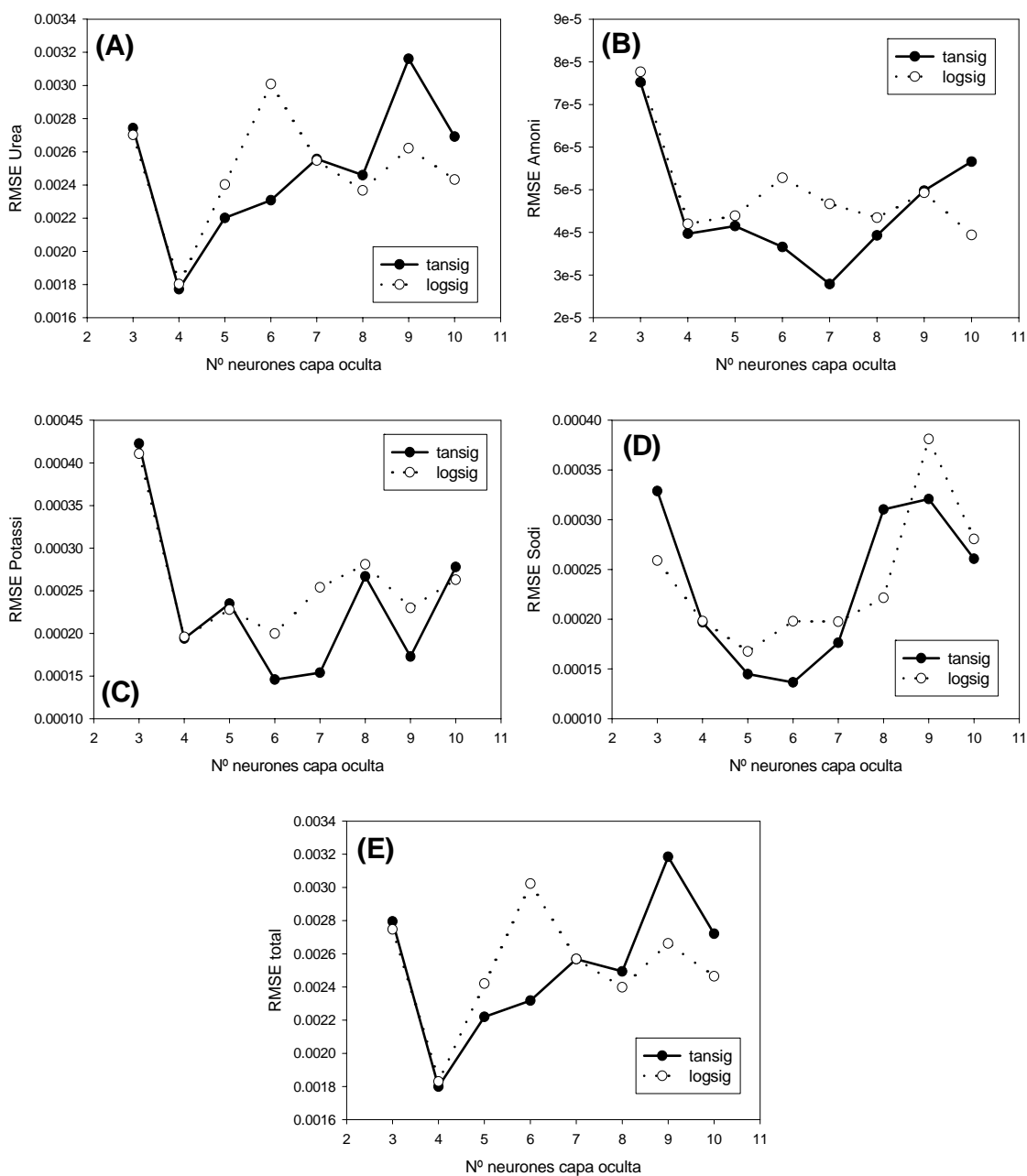


Figura 4.30 Representació dels RMSE (M) en front del nombre de neurones a la capa oculta per a cada espècie: (A) urea, (B) amoni, (C) potassi i (D) sodi; i el total (E).

Tot i no haver una gran diferència entre els RMSE de les dues funcions, en general s'obtenen errors més petits amb la funció *tansig*.

Ara un cop escollida la funció de transferència, s'ha de definir el nombre de neurones en la capa oculta. Per això es representen el pendent, l'ordenada a l'origen i el coeficient de correlació de les rectes comparatives entre els valors trobats i els esperats per a les mostres de validació externa en front del nombre de neurones (Figura 4.31). Els valors també s'obtenen com a mitja de tres replicats de la mateixa configuració.

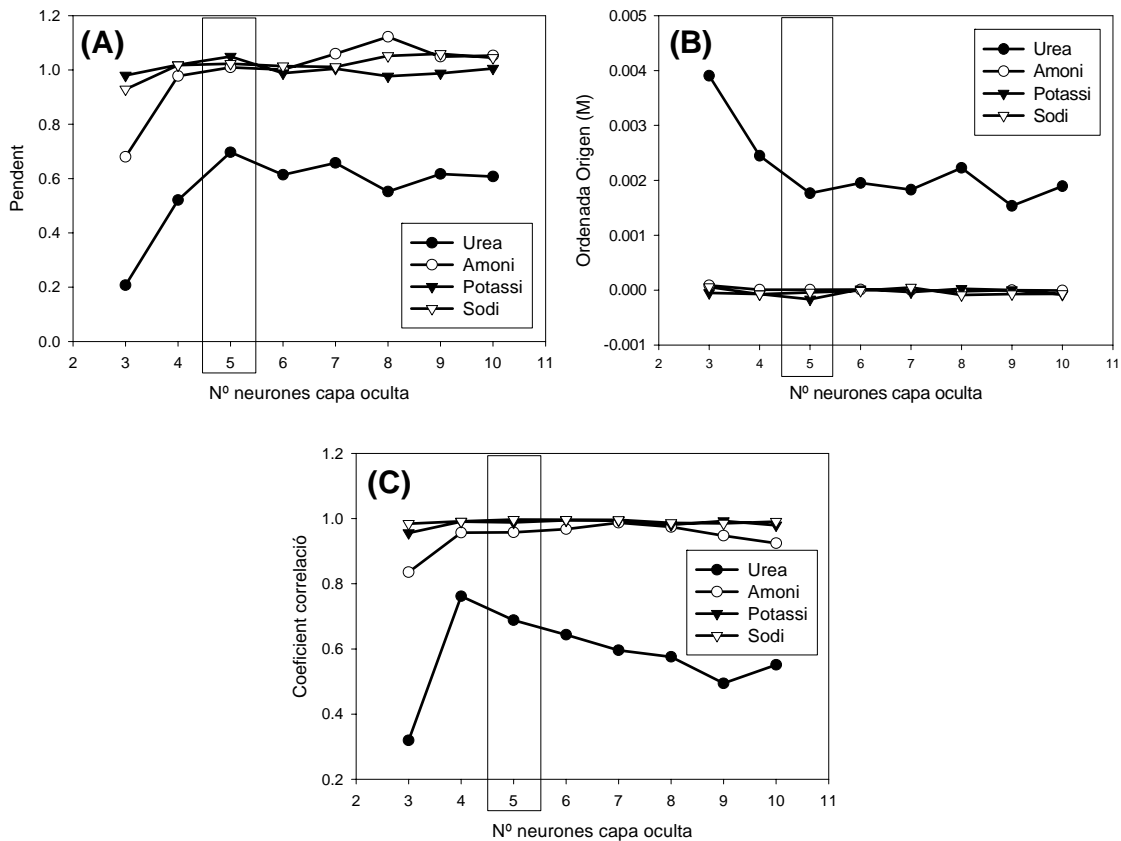


Figura 4.31 Representacions del pendent (A), l'ordenada a l'origen (B) i el coeficient de correlació (C) de les rectes comparatives entre els valors trobats i els esperats per a les mostres de validació externa en funció del nombre de neurones a la capa oculta.

A la vista d'aquests resultats, es va optar per la configuració amb cinc neurones ja que és la que presenta el millor pendent en el cas de la urea, així com una ordenada a l'origen per sota de 0.002 i un coeficient de correlació prou significatiu. Per tant, l'arquitectura òptima de la xarxa utilitzava l'algorisme d'entrenament de RB i constava de cinc neurones a la capa oculta amb la funció de transferència *tansig*.

A la modelització PLS, es va realitzar un model independent per a cada analit. El primer pas va ser decidir el nombre de components o factors en cadascun dels quatre models. Per a fer això s'utilitzen els errors de predicció (PRESS) (Figura 4.32). A partir de les dades d'aquesta figura, es pren el nombre de factors que minimitza l'error per a cada model (Taula 4.13).

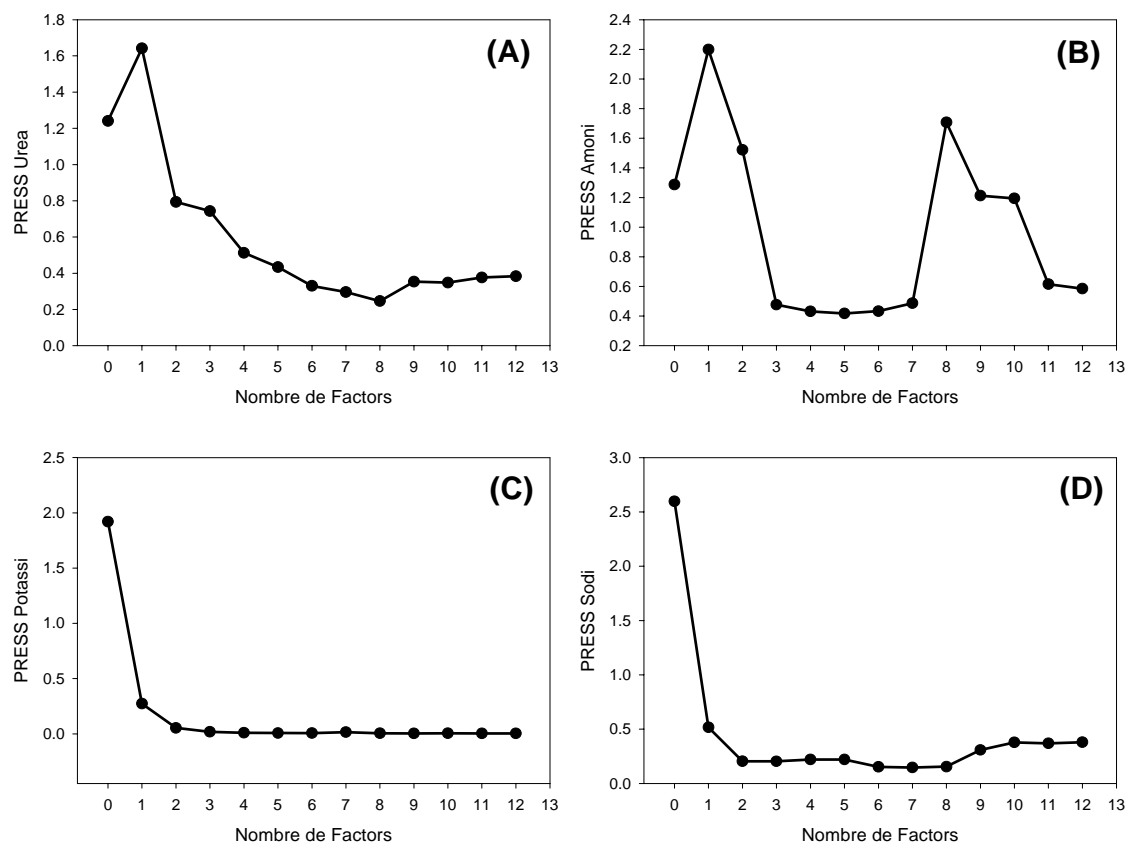


Figura 4.32 Funció PRESS en front del nombre de factors per a cada espècie: (A) urea, (B) amoni, (C) potassi i (D) sodi.

Taula 4.13 Nombre de factors escollits per a generar els models de resposta PLS després d'analitzar l'evolució de la funció PRESS en funció del nombre de factors.

Analit	Nombre de factors
Urea	8
Amoni	3
Potassi	2
Sodi	2

Amb aquestes condicions optimitzades, es va visualitzar la correcta modelització assolida pels dos models, representant els valors trobats en funció dels valors esperats per al conjunt de validació externa, dades que no intervenen en cap moment en la generació del model de resposta. La comparativa de la bondat dels ajustos es mostra en la Taula 4.14 i la Taula 4.15, on les rectes ajustades són indistingibles de les ideals. No obstant, comparant els dos models es troben intervals de confiança més grans i coeficients de correlació menys significatius en el cas del PLS.

Taula 4.14 Resum dels paràmetres corresponents als ajustos obtinguts en el conjunt de validació externa usant el model XNA (n = 10).

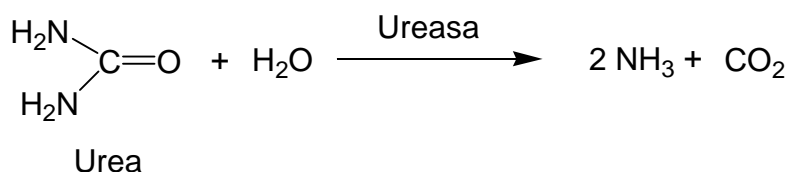
		Pendent	Ordenada (M)
Urea	r = 0.819	0.82 ± 0.47	0.001 ± 0.003
NH₄⁺	r = 0.978	0.91 ± 0.16	0.00004 ± 0.00004
K⁺	r = 0.995	0.94 ± 0.08	0.0002 ± 0.0002
Na⁺	r = 0.992	1.00 ± 0.10	0 ± 0.0003

Taula 4.15 Resum dels paràmetres corresponents als ajustos obtinguts en el conjunt de validació externa usant el model PLS (n = 10).

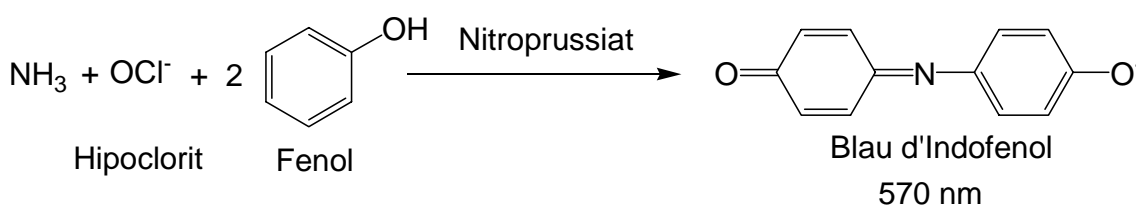
		Pendent	Ordenada (M)
Urea	r = 0.727	0.91 ± 0.72	0 ± 0.004
NH₄⁺	r = 0.818	0.99 ± 0.64	0 ± 0.0002
K⁺	r = 0.944	1.22 ± 0.35	0 ± 0.001
Na⁺	r = 0.919	1.34 ± 0.53	0 ± 0.001

4.4.1.3 Aplicació dels models en mostres reals

A continuació, es va comprovar la viabilitat d'ambdós models en la determinació d'aquestes espècies en tres mostres d'orina pures i 18 *spiked samples*, comparant els resultats obtinguts amb mètodes de referència. La concentració de referència d'urea es va determinar mitjançant la reacció del Blau d'Indofenol o reacció de Berthelot[17]. El mètode es basa en la hidròlisi de la urea per acció de la ureasa:



Seguidament, l'amoníac generat reacciona amb hipoclorit i fenol en presència d'un catalitzador, el nitroprussiat sòdic $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, per a formar el blau d'indofenol, el qual és mesurat espectrofotomètricament a 570 nm:



Les concentracions de referència de l'amoníac es van obtenir mitjançant l'ús de l'elèctrode d'amoníac i les de sodi i potassi, mitjançant ICP-OES.

A la Taula 4.16 i a la Taula 4.17 es resumeixen els paràmetres de les regressions valors obtinguts per la llengua en front valors obtinguts pels mètodes de referència usant el model basat en XNA i el basat en PLS, respectivament. Comparant els resultats, s'obtenen millors pendents, ordenades i errors en el cas de les XNAs. També amb el model XNA, és possible determinar la concentració d'urea sense necessitat d'eliminar les interferències alcalines.

Taula 4.16 Resum dels paràmetres corresponents als ajustos obtinguts en el conjunt de mostres reals usant el model XNA (n = 21).

		Pendent	Ordenada (M)
Urea	r = 0.871	1.35 ± 0.36	0.001 ± 0.002
NH ₄ ⁺	r = 0.983	0.58 ± 0.05	-0.00002 ± 0.00002
K ⁺	r = 0.877	1.27 ± 0.33	0 ± 0.0002
Na ⁺	r = 0.987	1.32 ± 0.10	-0.0001 ± 0.0001

Taula 4.17 Resum dels paràmetres corresponents als ajustos obtinguts en el conjunt de mostres reals usant el model PLS (n = 21).

		Pendent	Ordenada (M)
Urea	r = 0.848	1.92 ± 0.59	-0.001 ± 0.002
NH₄⁺	r = 0.964	0.39 ± 0.05	0 ± 0.00001
K⁺	r = 0.943	1.06 ± 0.18	-0.0001 ± 0.0001
Na⁺	r = 0.988	1.94 ± 0.15	-0.0004 ± 0.0002

4.4.2 Llengua electrònica per a la determinació d'urea, creatinina i ions alcalins en mostres clíniques

Una vegada desenvolupada la llengua electrònica per a la determinació d'urea, es va pensar en una segona llengua amb biosensors incloent altre metabòlit en el model. L'opció més immediata va ser la creatinina, també present en els fluids biològics. En aquest cas, la matriu també estava formada per vuit ESIs de diferent selectivitat en funció de l'ionòfor emprat, tal i com es detalla en l'apartat 3.2.1.2: dos per a l'amoni, dos per al potassi, dos per al sodi i dos de resposta genèrica a alcalins, un del tipus Genèric (I) basat en dibenzo-18-corona-6 i un del tipus Genèric (II) basat en lasalocida. A més, es van incorporar quatre biosensors, dos per a urea i dos per a creatinina. Tots quatre biosensors estaven basats en un transductor d'amoni. Els biosensors amb transductor de pH no van ser inclosos per que la seva resposta es veia limitada per efecte del tampó TRIS, com s'ha vist en l'apartat 4.4.1.1.

El model de resposta per a aquest nou sistema per a la determinació simultània d'urea, creatinina, amoni, potassi i sodi es va construir a partir d'una XNA.

4.4.2.1 Caracterització dels biosensors de creatinina

A la Taula 4.18 es mostra la caracterització dels biosensors de creatinina replicats (dispositius A i B, construïts amb la mateixa metodologia i de manera paral·lela). Així mateix, en la Figura 4.33 es mostra la variació de la sensibilitat i el LD d'aquests mateixos dispositius amb el temps durant 27 dies naturals d'estudi.

Taula 4.18 Paràmetres de calibratge dels biosensors de creatinina en tampó TRIS 0.05 M a pH 7.5, $E = A + B \cdot \log([\text{creatinina}] + \text{LD})$. Entre parèntesis s'indiquen les desviacions estàndard. El LD està calculat segons es recomana a potenciometria [16].

Dispositiu	A (s)	B (s)	LD (s)	r
	mV	mV/dèc	M	
A	216.1 (5.1)	53.5 (2.0)	1.4E-4 (1.8E-5)	0.999
B	189.3 (4.7)	54.4 (1.8)	8.5E-5 (1.3-05)	0.999

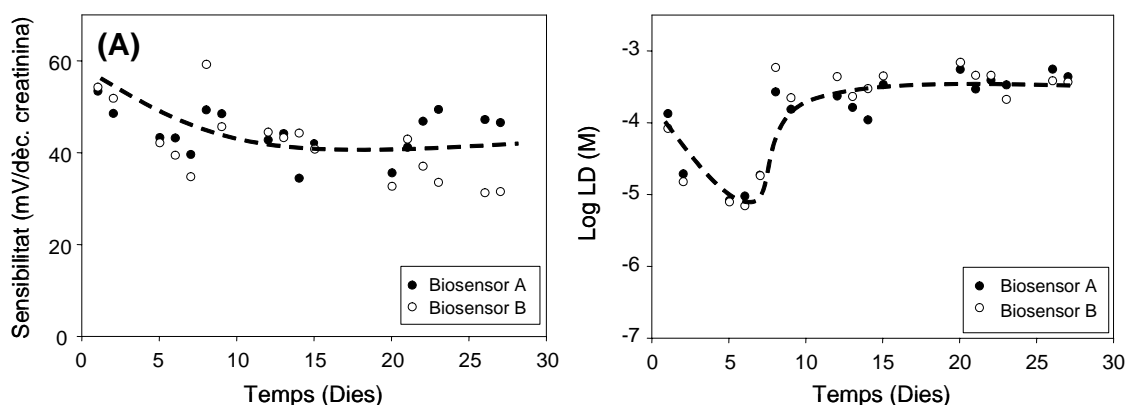


Figura 4.33 Variació de la sensibilitat (A) i del LD (B) al llarg del temps per als biosensors de creatinina amb dades dels dispositius replicats. La tendència es representa amb una línia discontinua. Solució de treball: tampó TRIS 0.05 M a pH 7.5.

S'observa que aquests biosensors amb transductor potenciomètric d'amoni presenten un pendent molt proper al nerstia, al voltant de 50 mV/dècada. La variació observada durant els 27 dies naturals d'estudi va ser inferior al 15 %. Per tant, l'estabilitat de la resposta ens permet incloure'ls a la matriu.

4.4.2.2 Construcció del model de resposta basat en XNA

Al igual que en l'aplicació anterior, les entrades a la XNA van ser els potencials dels 12 elèctrodes que formen la matriu i es va usar tampó TRIS 0.05 M a pH 7.5 com a medi iònic per a preparar les mostres d'entrenament i de validació externa.

Es van estudiar les 20 configuracions diferents que resulten de combinar les funcions de transferència *tansig* i *logsig*, i un nombre de neurones en la capa oculta entre tres i 12. La resta de paràmetres estaven fixats a priori. Es va trobar que la XNA que era capaç de

modelar millor el conjunt de dades de partida utilitzava l'algorisme d'entrenament de RB i tenia sis neurones a la capa oculta emprant la funció de transferència *tansig*. Per tal de visualitzar la correcta modelització assolida, es van representar els valors trobats en funció dels esperats per a les 13 mostres de validació externa (Figura 4.34).

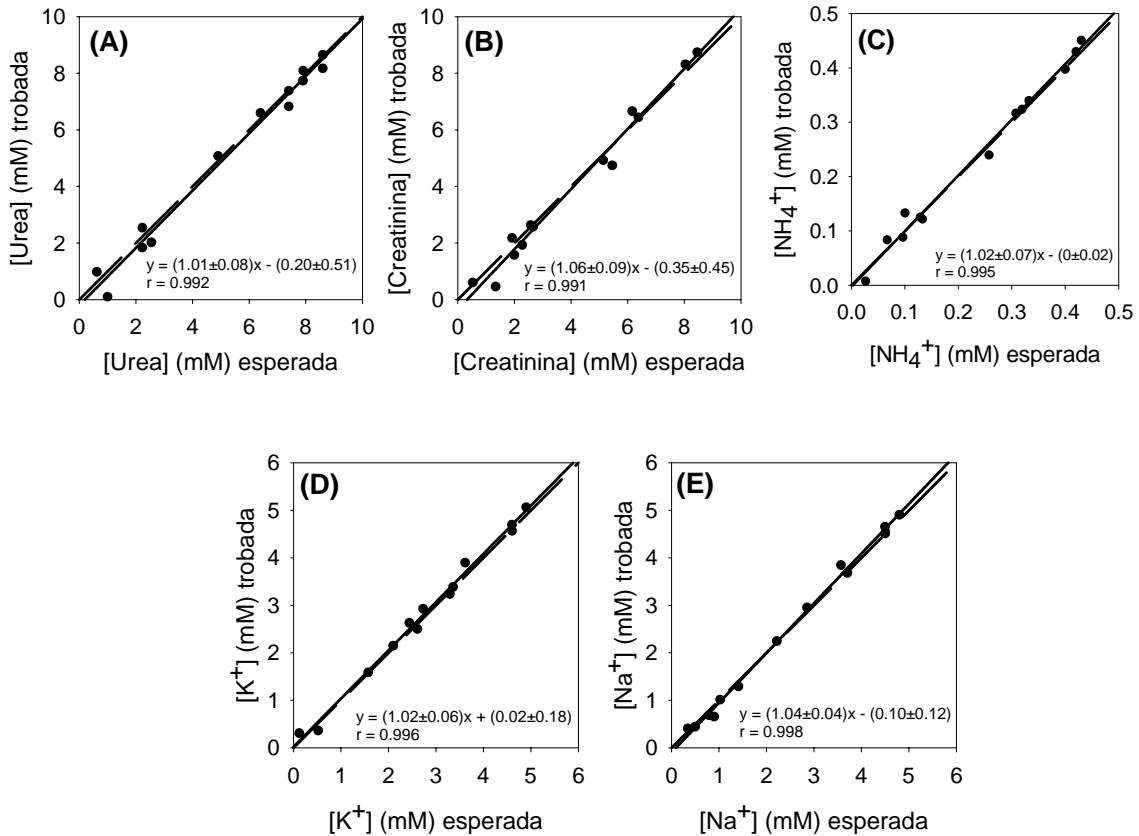


Figura 4.34 Gràfics de comparació entre les concentracions trobades i les esperades d'urea (A), creatinina (B), amoni (C), potassi (D) i sodi (E) per al conjunt de validació externa.

4.4.2.3 Aplicació en mostres reals

Seguidament, es va aplicar aquest sistema en la determinació d'aquestes cinc espècies en tres mostres d'orina pures i vuit *spiked samples*, comparant els resultats obtinguts amb mètodes de referència (Apartat 4.3.1.3). La concentració de referència de creatinina va ser obtinguda mitjançant el mètode de Jaffé, que consisteix en la reacció de la creatinina amb una solució alcalina de picrat per a formar un complex de color vermell-taronja, fàcilment mesurable espectrofotomètricament a 500 nm[18]. Les gràfiques

comparatives utilitzant la XNA seleccionada per a les 11 mostres reals, juntament amb els paràmetres de les regressions, es mostren en la Figura 4.35.

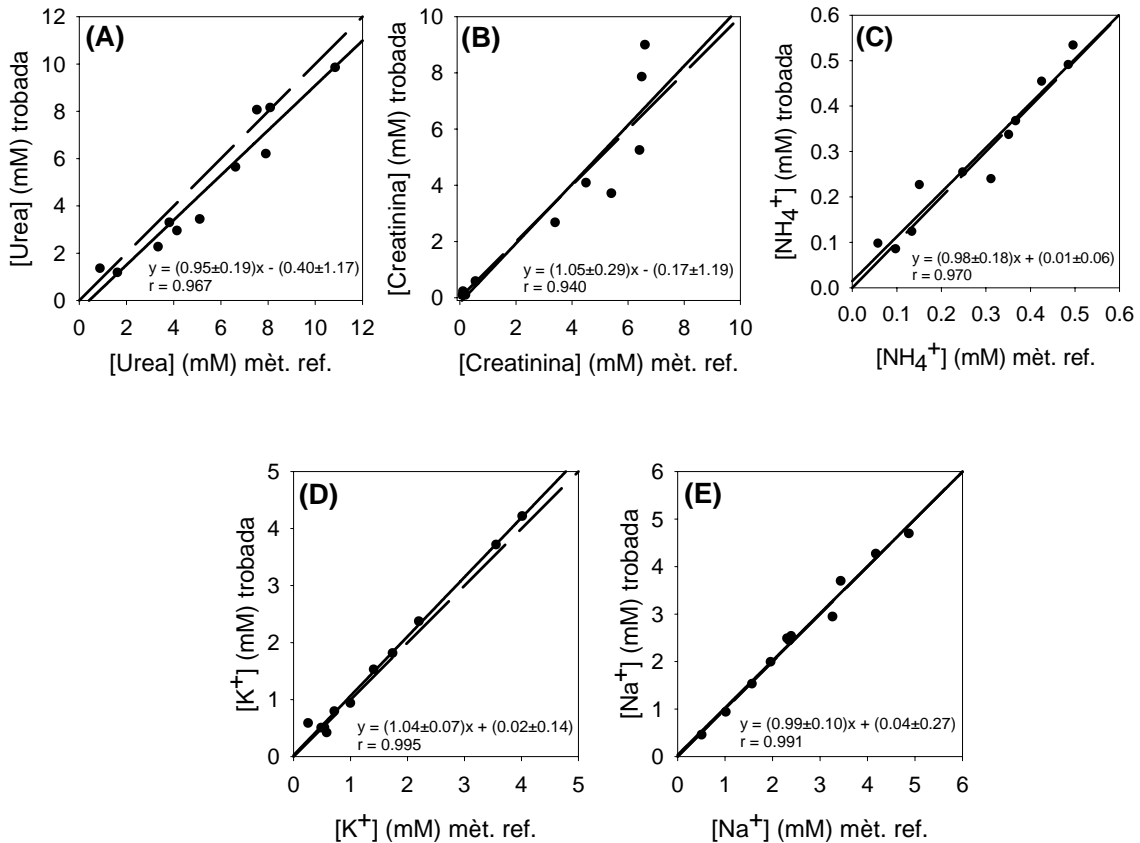


Figura 4.35 Gràfics de comparació entre les concentracions trobades per la llengua electrònica i per mètodes de referència d'urea (A), creatinina (B), amoni (C), potassi (D) i sodi (E) en les 11 mostres reals.

Els resultats obtinguts amb aquest sistema milloren clarament els de la llengua electrònica anterior, per la qual cosa queda demostrada la importància d'una bona elecció dels sensors que conformaran la matriu per a obtenir un bon model. Així doncs, amb aquest sistema ja optimitzat, el següent pas és contactar amb un hospital per a realitzar un estudi amb mostres de pacients amb disfuncions renals.

4.5 Bibliografia

- [1] M. Urrestarazu, Bases y sistemas de los cultivos sin suelo. En: A. Alarcón, (Ed.), *Cultivos sin suelo*. Reus, Ediciones de Horticultura S.L. (2006) 23-41
- [2] F.G. Schröder, J.H. Lieth, Irrigation control in hydroponics. En: D. Savvas, H. Passam, (Eds.), *Hydroponic production of vegetables and ornamentals*. Atenes, Embryo (2002) 263-298
- [3] D. Savvas, Nutrient solution recycling. En: D. Savvas, H. Passam, (Eds.), *Hydroponic production of vegetables and ornamentals*. Atenes, Embryo (2002) 299-344
- [4] O. Marfà, J. Casadesús, R. Cáceres, Recirculación en cultivos sin suelo. En: A. Alarcón, (Ed.), *Cultivos sin suelo*. Reus, Ediciones de Horticultura S.L. (2006) 175-190
- [5] L.S. Clesceri, A.D. Eaton, A.E. Greenberg, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 20th edition. Whashington, DC, American Public Health Association Publications (1998)
- [6] US EPA Method 200.7, Revision 4.4. *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples-Supplement I*, EPA-600/R-94-111, Maig 1994
- [7] L. Gross, E.S. Yeung, *Journal of Chromatography A*, **480** (1989) 169-178
- [8] R. Gutiérrez, *Caracterización y modelización del crecimiento del rosal en cultivos con arqueado de tallos*. *Tesi Doctoral*. València, Universitat Politècnica de València (2002) p 161
- [9] C.R. Adams, K.M. Bamford, M.P. Early, *Principles of Horticulture*. Londres, William Heinemann (1984)
- [10] J. Koryta, *Analytica Chimica Acta*, **139** (1982) 1-51
- [11] L.S. Clesceri, A.D. Eaton, A.E. Greenberg, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 18th edition. Whashington, DC, American Public Health Association Publications (1992)
- [12] J. Le Bot, S. Adamowicz, P. Robin, *Scientia Horticulturae*, **74** (1998) 47-82
- [13] J. Gallardo, *Llengües electròniques basades en sensors potenciomètrics*. *Tesi doctoral*. Bellaterra, Univiersitat Autònoma de Barcelona (2005)
- [14] L. Favari, E. López, L. Martínez-Tabche, E. Díaz-Pardo, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **51** (2002) 177-186
- [15] D. Diamond, (Ed.), *Principles of Chemical and Biological Sensors*. New York, Wiley-Interscience (1998)
- [16] IUPAC Analytical Chemistry Division, *Compendium of analytical nomenclature. Definitive rules 1997*, Cap. 8: Electrochemical analysis. Edició on-line: http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/. Consulta realitzada: Setembre 2007
- [17] A.L. Chaney, E.P. Marback, *Clinical Chemistry*, **8** (1962) 130-132
- [18] J.D. Bauer, *Clinical laboratory methods*. St. Louis, MI, Mosby (1982)

CAPÍTOL 5: CONCLUSIONS GENERALS

Capítol 5

Conclusions generals

Les conclusions es poden agrupar de la mateixa manera com ho hem fet amb els objectius i els resultats, segons el camp d'aplicació. En el camp agrícola, les conclusions són:

1. S'ha desenvolupat una llengua electrònica per al monitoratge *on-line* de les concentracions dels ions amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat en la solució de nutrició d'un hivernacle hidropònic mitjançant una matriu d'ESIs amb membrana de PVC i tècniques de processament avançat com són les XNAs.
 - Amb la XNA optimitzada, la capacitat de predicció de la llengua electrònica és bona pel que fa als ions amoni, potassi, sodi i nitrat en el conjunt de validació externa, però no així per a l'ió clorur.
 - La llengua electrònica construïda mostra bons errors relatius en la determinació d'amoni, potassi, sodi i nitrat en mostres reals de lixiviats provinents dels hivernacles quan es comparen els resultats amb mètodes

de referència. Com era d'esperar, els pitjors resultats es troben en la determinació de clorur.

- S'ha comprovat que els elèctrodes de TDMAC perden pràcticament tota la seva resposta a clorur degut a canvis en la membrana provocats per l'elevada concentració de l'ió nitrat.
- El fet d'incloure el dia de mesura com a una entrada més en la XNA no resulta un bon mètode per corregir l'efecte de les derives de potencial, per la qual cosa es planteja l'opció d'utilitzar lectures referenciades.

2. S'ha desenvolupat una nova llengua electrònica basada en l'anterior però amb un analit més en el model, l'ió fosfat, per aplicar-la en el mateix hivernacle.

- S'han desenvolupat i incorporat a la matriu elèctrodes metàl·lics basats en Ag/AgCl, els quals han demostrat tenir una bona resposta a clorur i no afectar-los la presència d'una elevada concentració de nitrat.
- Donada la manca d'un ionòfor comercial adequat per a l'ió fosfat, s'han desenvolupat i incorporat a la matriu elèctrodes metàl·lics basats en cobalt, els quals han demostrat tenir una resposta molt dependent del pH del medi. Per aquesta raó s'ha incorporat a la matriu un elèctrode de pH basat en TDDA.
- Amb la XNA optimitzada, la capacitat de predicció de la llengua electrònica és bona per als sis ions considerats en el conjunt de validació externa.
- La llengua electrònica construïda mostra errors relatius acceptables en la determinació de potassi, sodi, clorur i nitrat en mostres reals dels hivernacles quan es comparen els resultats amb mètodes de referència. Els ions amoni i fosfat només poden determinar-se semiquantitativament.
- Tant en aquesta llengua electrònica com en l'anterior, el fet d'incloure la temperatura de la solució com a una entrada més a la XNA ens ha permès corregir el seu efecte.
- S'han interpretat fisiològicament les concentracions interpolades en les diferents tandes de monitoratge, les quals s'han dut a terme en diferents estacions de l'any i, per tant, en diferents fases de creixement dels rosers.

- S'ha comprovat que la llengua electrònica construïda és capaç de detectar al moment una recomposició errònia de la solució de nutrició que el sistema automàtic trigaria setmanes a reformular.

En el camp mediambiental, les conclusions són:

3. S'ha desenvolupat una llengua electrònica per al monitoratge *in-line* de les concentracions dels ions amoni, potassi, sodi, clorur i nitrat en un RCTA que simula les condicions de biodegradació natural d'una aigua superficial mitjançant una matriu d'ESIs i XNAs.
 - Amb la XNA optimitzada, la capacitat de predicció de la llengua electrònica és bona per als cinc ions considerats en el conjunt de validació externa.
 - Amb les concentracions interpolades per la XNA, és possible ajustar l'equació que relaciona la concentració de les espècies dins el reactor amb el temps de residència de cada espècie.
 - Comparant el temps de residència fixat per nosaltres (1.04 dies) amb els trobats s'observa que el de l'ió amoni és molt inferior (0.170 dies) demostrant que es veu afectat per la biodegradació natural provocada pels microorganismes inoculats al tanc. Per a la resta d'ions considerats, els valors trobats són pràcticament indistingibles del fixat.
4. S'ha desenvolupat una llengua electrònica per al monitoratge *in-line* de les concentracions dels ions amoni, potassi i sodi en la presa IR mitjançant una matriu d'ESIs de membrana de PVC i XNAs.
 - Amb la XNA optimitzada, la capacitat de predicció de la llengua electrònica és bona per als tres ions considerats en el conjunt de validació externa.
 - La llengua electrònica construïda mostra bons errors relatius en la determinació dels tres ions en dilucions 3:2 i 2:3 de mostres reals d'aigua de la presa quan es comparen els resultats amb mètodes de referència. Quan es processen les mostres sense diluir s'obté un error del 24.5 % per a l'ió sodi.

- Durant el monitoratge de 2 hores en la presa IR, es van trobar valors molt semblants als determinats per mètodes de referència tant per a l'ió amoni ($\sim 2.5 \times 10^{-5}$ M) com per a l'ió potassi ($\sim 10^{-3}$ M). Per a l'ió sodi, en canvi, el valor trobat (6×10^{-3} M) està per sota del real (~ 0.1 M) degut amb tota probabilitat a la saturació de l'elèctrode de sodi.
 - Tant en aquesta llengua electrònica com en l'anterior, el fet d'incloure la temperatura de la solució com a una entrada més a la XNA ens ha permès corregir el seu efecte.
5. La connexió per radiofreqüència entre l'ordinador que rep i emmagatzema les dades i la matriu de sensors ha demostrat un funcionament robust en les dues aplicacions anteriors i per tant, els sistemes descrits poden aplicar-se al monitoratge inalàmbic per a aplicacions mediambientals.
6. S'ha desenvolupat una llengua electrònica per a la determinació dels ions amoni, potassi i sodi en mostres d'aigua de la presa IR mitjançant una matriu integrada de cinc sensors fabricada per serigrafia i XNAs.
- Els sensors serigrafiats individuals basats en dibenzo-18-corona-6 han presentat unes molt bones característiques de resposta: coeficients de variació del 0.96 % en l'estudi de reproductibilitat del procés de fabricació i del 0.58 % en el de repetibilitat, considerant en ambdós casos la sensibilitat a potassi, i un temps de vida superior als 37 dies naturals.
 - És possible construir una matriu integrada de cinc sensors basats en una membrana de PVC usant la tècnica serigràfica de manera manual.
 - Amb la XNA optimitzada, la capacitat de predicció de la llengua electrònica és bona per als tres ions considerats en el conjunt de validació externa.
 - El test *t* de mostres aparellades demostra que és possible la determinació simultània d'amoni, potassi i sodi en mostres sintètiques. En el cas de les mostres reals de la presa, el mateix test *t* troba diferències significatives en la determinació de sodi degut, al igual que en l'aplicació de monitoratge *in-line* en la presa IR, a la saturació de l'elèctrode.

- La implementació en flux de la matriu serigrafiada va presentar problemes d'estabilitat de la resposta degut a efectes de la pressió i a problemes de conductivitat en la pista de plata provocats per efecte del THF.

En el camp clínic, les conclusions són:

7. S'ha desenvolupat una llengua electrònica per a la determinació simultània d'urea, amoni, potassi i sodi en mostres clíniques, concretament d'orina, mitjançant una matriu basada en biosensors potenciomètrics d'urea juntament amb d'altres ESIs, i dues eines quimiomètriques, les XNAs i el PLS.
 - S'han desenvolupat i incorporat a la matriu biosensors d'urea basats en l'enzim ureasa amb transductor potenciomètric d'amoni. La caracterització d'aquests biosensors ha reportat una sensibilitat de 30 mV/dècada d'urea, un LD de 10^{-4} M i un temps de vida superior als 20 dies naturals.
 - També s'han desenvolupat i incorporat a la matriu biosensors d'urea amb transductor potenciomètric de pH, però la seva sensibilitat (-10 mV/dècada) i el seu temps de vida (~ 5 dies naturals) es veuen fortament influenciats per la capacitat tamponadora del medi.
 - El model construït amb XNAs ha demostrat tenir millor capacitat de predicció que el construït mitjançant PLS en el conjunt de validació externa. Aquest fet deixa de manifest que les XNAs modelitzen millor el problema plantejat que no pas el PLS a causa de l'alt component no lineal present en la resposta dels sensors.
 - En general, el model amb XNAs mostra millors resultats en la determinació de les quatre espècies considerades en mostres reals quan es comparen els resultats amb mètodes de referència. I, el que és més important, només amb XNAs és possible determinar la concentració d'urea sense necessitat d'eliminar les interferències alcalines.

8. S'ha desenvolupat una nova llengua electrònica basada en l'anterior, però incloent un nou metabòlit al model, la creatinina, per aplicar-la també en mostres clíniques d'orina.

- S'han desenvolupat i incorporat a la matriu biosensors de creatinina basats en l'enzim creatinina deiminasa amb transductor potenciomètric d'amoni. La caracterització d'aquests biosensors ha reportat una sensibilitat per sobre de 50 mV/dècada de creatinina, un LD de 10^{-4} M i un temps de vida superior als 27 dies naturals.
- No s'han inclòs en la matriu biosensors amb transductor de pH per que la seva resposta es veu molt limitada pel tampó.
- Amb la XNA optimitzada, la capacitat de predicció de la llengua electrònica és bona per a les cinc espècies considerades (urea, creatinina, amoni, potassi i sodi) en el conjunt de validació externa.
- La llengua electrònica desenvolupada mostra bones correlacions en la determinació de les cinc espècies en mostres reals d'orina quan es comparen els resultats amb mètodes de referència, demostrant l'aplicabilitat del sistema.
- Els resultats milloren clarament els de la llengua electrònica anterior, el que demostra la importància d'escollir bé els sensors que formen la matriu.
- El sistema desenvolupat es considera a punt per a passar a una fase de proves en mostres clíniques provinents de processos d'hemodiàlisi, així com proves pilot de monitoratge en un hospital, tasques que hauran de formar part d'una futura tesi doctoral seguint la línia aquí encetada.

Pel que fa a les qüestions quimiomètriques plantejades, no només s'ha demostrat que l'ajust obtingut amb XNAs és millor que usant PLS, com s'ha vist en la llengua electrònica per a la determinació d'urea, sinó que també s'ha comprovat que els dissenys d'experiments desenvolupats en les llengües electròniques amb biosensors amb 27 nivells de concentració (un per mostra), han donat bons resultats, a la vista dels ajustos obtinguts.

CAPÍTOL 6: ARTICLES PUBLICATS

Capítol 6

Articles publicats

- I. Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples.**
Biosensors and Bioelectronics, 22 (2007) 2171-2178
Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle

- II. Application of a potentiometric electronic tongue to fertigation strategy in greenhouse cultivation.**
Computers and Electronics in Agriculture, 57 (2007) 12-22
M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle

- III. Remote environmental monitoring employing a potentiometric electronic tongue.**
International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 88 (2008) 103-117
Manuel Gutiérrez, Juan Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Lorenzo Leija, Pablo Rogelio Hernández, Liliana Favari, Roberto Muñoz, Manuel del Valle

IV. Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples.

Biosensors and Bioelectronics, 23 (2008) 795-802

Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle

Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples[☆]

Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle^{*}

Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

Received 20 April 2006; received in revised form 5 September 2006; accepted 9 October 2006
Available online 13 November 2006

Abstract

Urea biosensors based on urease covalently immobilized on to ammonium and hydrogen ion-selective electrodes were included in arrays together with ammonium, potassium, sodium, hydrogen and generic response to alkaline sensors. Response models based on artificial neural network (ANN) and partial least squares (PLS1) were built, tested and compared for the simultaneous determination of urea, ammonium, potassium and sodium. The results show that it is possible to obtain good ANN and PLS calibration models for simultaneous determination of these four species, but with better prediction capability when the ANN are used. The developed bioelectronic tongue was applied to multidetermination in urine samples. The ANN model showed again better agreement with reference methods, allowing a simple direct determination of urea in the real samples without the necessity of eliminating the alkaline interferences, or compensating endogenous ammonium.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Biosensor array; Electronic tongue; Urea; Artificial neural networks; Partial least squares

1. Introduction

Determination of urea has numerous applications: in pharmaceutical industry, in food industry, production of fertilizers, environmental protection, but the most important application of urea determination is in clinical analysis. This is performed in serum, urine and specially for the control of dialysis efficiency. As the final product of proteins and amino acids metabolism, urea monitoring allows to appraise the renal function of kidneys. Determination of urea usually employs the enzyme urease. Urea is hydrolysed by urease according to the reaction $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^-$. In conventional potentiometric urea biosensors, pH electrodes (Ruzicka et al., 1979; Vadgama et al., 1982; Karube et al., 1986) and NH_4^+ -selective electrodes (Guilbault and Montalvo, 1969; Campanella et al., 1990; Eggenstein et al., 1999) have been used to detect hydrogen ions or ammonium ions,

respectively, produced in the enzymatic reaction. The major problem for pH-sensitive electrodes is that the sensor response is strongly dependent on the buffer capacity of the sample. The pH change produced in the course of the enzyme-catalysed reaction is suppressed by the buffer used, leading to a narrow dynamic range and a loss in sensor sensitivity (Ruzicka et al., 1979). All-solid-state non-actin-based ammonium ion-selective electrodes are among the most adequate transducers for the development of potentiometric urea biosensors, due to their fast and reproducible response (Alegret and Martínez-Fábregas, 1989) and their long lifetime, up to 12 months (Rosario et al., 1990). Matrix correction in the determination of urea in urine by such potentiometric biosensors is necessary due to the variable ion composition of the matrix. Ammonium, potassium and sodium ions, which are present in urine, may interfere. Several strategies have been used to overcome these interferences; for instance, differential measurements can be used (Petersson, 1988; Yasuda et al., 1984) or separation by gas diffusion (Krawczynski vel Krawczyk et al., 1994). An alternative generic approach evaluated in the present work consists in using an electronic tongue, an analytical instrument comprising an array of non-specific, poorly selective, chemical sensors with partial specificity (cross-sensitivity) to different compounds in

[☆] This communication was presented at the 9th World Congress on Biosensors (Toronto, May 2006).

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 93 5811017; fax: +34 93 5812379.
E-mail address: manel.delvalle@uab.es (M. del Valle).

a solution, and an appropriate chemometric tool for the data processing (Holmberg et al., 2004). In our case a biosensor array formed by biosensors for urea and ion selective electrodes, and multivariate calibration models were used. This approach intends the correction of the contributions of other ions to the response of the biosensors, and simultaneous determination of urea and its most severe interferences, ammonium, potassium and sodium ion, being these of biological interest too. Ion selective electrode arrays and multivariate calibration models have already proved to be effective for increasing the selectivity and allowing the simultaneous determination of several species in different types of samples, ranging from biological fluids (Forster et al., 1991) to natural waters (Sales et al., 1999). The inclusion of partially selective electrodes in the array provides cross-response between the sensors and improves the models for chemometric analysis of the responses. For the application sought, the proposed system comprised sensors of an all-solid-state type employing polymeric matrix membranes. These electrodes incorporated as recognition elements neutral carriers belonging to the family of the ionophoric antibiotics. In this work, two different types of membranes were employed: PVC and carboxylated PVC (PVC-COOH). The last one is used to build covalently immobilized urea biosensors, as this choice will yield biosensors with better stability (Glab et al., 1994). The stability of the response during the working time is a necessary characteristic of the urea biosensors having in mind their later implementation in an array of sensors of an electronic tongue. As the second component in the bioelectronic tongue, two different multivariate calibration techniques were considered and compared as the data processing tool: multilayer artificial neural network (ANN) and partial least squares (PLS1). From the two, the use of ANN models is better suited for systems with higher non-linear characteristics. Once the viability for the determination of the species was proven, the array was evaluated for the analysis of urea and the interfering ions in urine samples and spiked samples using the ANN model and the PLS model.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All used reagents were of high purity, analytical grade, pro analysis or equivalent. All solutions were prepared with deionized and highly purified water (16–18 M Ω resistivity, Milli-Q, Millipore). Materials used for the preparation of the inner solid

contact of the electrodes were the epoxy resin components Araldite M and HR hardener (both from Uneco, Spain) and graphite powder (50 μ m, BDH, UK) as the conducting filler.

For the preparation of the ion-selective membranes, the ionophore, the plasticizer, the polymer and, in some cases, the ionic additive were dissolved in tetrahydrofuran (THF, Fluka, Switzerland). Ionophores used were nonactin (nonactin from *Streptomyces*, Fluka), tetradodecylamine (TDDA, hydrogen ionophore I, Fluka), valinomycin (potassium ionophore I, Fluka), dibenzo(18-crown-6) (Fluka) and bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-methylmalonate (bis(12-crown-4), Dojindo). Plasticizers used were bis(1-butylpentyl)adipate (BPA), dioctyl sebacate (DOS) and 2-nitrophenyloctylether (NPOE) (all obtained from Fluka). Two different polymers were used: high molecular weight poly(vinyl chloride) (PVC, Fluka) and carboxylated PVC (PVC-COOH, Aldrich, USA). PVC-COOH was used for the covalent enzyme immobilization. Finally, the used ionic additive was potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KpCIPB, Fluka).

The used enzyme was urease (EC 3.5.1.5, Sigma, USA, 82,800 U/g). For the covalent immobilization on the selective membrane, *N*-(-3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC, Sigma) was used.

For the characterization of the constructed electrodes, the substances urea (Fluka), potassium chloride (Fluka), ammonium chloride (Panreac, Spain), sodium chloride (Merck), sodium hydroxide (Panreac) and hydrochloric acid (Panreac) were added. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris, Merck, Germany) buffer was used as background solution.

2.2. Biosensor array

The sensors used were all-solid-state ion selective electrodes (ISEs) with a solid electrical contact made from a conductive composite. These are the habitual configuration in our laboratories (Alegret and Martínez-Fábregas, 1989). The PVC and the PVC-COOH membranes were formed by solvent casting the sensor cocktail. The formulation of the different membranes used is outlined in Table 1.

For the immobilization of the enzyme and assembling of the biosensors, four milligrams of EDAC plus ten milligrams of urease were dissolved in 1 mL of deionized water, and 60 μ L of this solution was placed on the surface of the PVC-COOH membrane. Both ammonium and hydrogen transducers were used as the base element for the two different urea biosensors used in the array. The mixture was allowed to react for

Table 1
Formulation of the different ion-selective membranes employed in the bioelectronic tongue

Electrode	PVC (%)	PVC-COOH (%)	Plasticizer (%)	Ionophore (%)	Additive (%)	Reference
Ammonium-1	33	–	BPA (66)	Nonactin (1)	–	Davies et al. (1988)
Ammonium-2	–	33	BPA (66)	Nonactin (1)	–	Alegret et al. (2004)
Hydrogen-1	32.8	–	DOS (65.6)	TDDA (1)	KpCIPB (0.6)	Schulthess et al. (1981)
Hydrogen-2	–	32.8	DOS (65.6)	TDDA (1)	KpCIPB (0.6)	Workman et al. (2001)
Potassium	30	–	DOS (66.7)	Valinomycin (1)	KpCIPB (0.6)	Shen et al. (1998)
Sodium	21.76	–	NPOE (70)	Bis(12-crown-4) (6)	KpCIPB (2.24)	Tamura et al. (1982)
Generic	29	–	DOS (67)	Dibenzo(18-crown-6) (4)	–	Umezawa (1990)

about 12 h in a refrigerator and then the electrode was washed in vigorously stirred Tris buffer (pH 7.5, buffer concentration 50 mM) for 2 h. When not in use, the electrode was stored in the refrigerator in the same buffer solution (Glab et al., 1994).

Finally, the used biosensor array was constituted by 12 electrodes altogether: four urea biosensors, two of each type, two ion-selective electrodes for ammonium, two for potassium, two for sodium, one for hydrogen ion and one electrode of generic response to alkaline ions.

2.3. Apparatus

An Orion 90-02-00 double junction Ag/AgCl reference electrode with the Tris buffer solution in its outer chamber was employed for the potentiometric measurements.

These were performed with the aid of a laboratory constructed data-acquisition system. It consisted of 32 input channels implemented with following circuits employing operational amplifiers (TL071, Texas Instruments), which adapt the impedances of each sensor. Measurements were unipolar, with the reference electrode connected to ground. Each channel was noise-shielded with its signal guard. The outputs of each amplifier were filtered using a passive low-pass filter and connected to an A/D conversion card (Advantech PC-Lab 813, Taiwan) installed into a Pentium PC. The readings were done employing custom designed software programmed with QuickBASIC 4.5 (Microsoft).

2.4. Calibration and measurement procedure

For the evaluation of the response characteristics, four biosensors, two of each kind was studied in parallel. The response characteristics were evaluated by calibration in response to urea. These calibration curves were obtained by means of the method of the analyte addition: the variation of potential originated by the addition of accumulated microvolumes of stock urea solutions (0.001, 0.01, 0.1 and 1 M) in 25 mL of 0.05 M (pH 7.5) Tris buffer was determined. Tris buffer has lower interference effect than the other buffer solutions that contain alkaline ions, which would increase the limit of detection (LD) considerably and whose concentration has to be controlled in this work. Also, pH 7.5 has been considered the most appropriate both for the catalytic activity of the enzyme and for the detection of ammonium ion (Gil et al., 1992). In the experiments for the determination of the response time, a similar procedure was used but the response potentials after addition were registered along the time. Daily calibrations of the biosensors in the Tris buffer allowed us to estimate the lifetime. All the experiments were made at room temperature.

The composition of the samples used to build the four-analyte response model is summarized in Table 2 where the Tris buffer was used as the background solution. The calibration of the electronic tongue was performed from the measures of the biosensor array corresponding to a set of samples defined from a statistical experimental design. The composition of the 27 solutions used for the calibration of the array was designed accordingly to a fractional factorial design (FFD) with three levels and four fac-

Table 2
Composition of solutions used for multivariate calibration of the array

Solution	[Urea] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)
1	0.100	0.043	1.580	1.573
2	0.481	0.100	3.287	5.000
3	0.860	0.157	5.000	3.287
4	1.242	0.214	1.383	4.810
5	1.623	0.272	3.096	3.096
6	2.004	0.329	4.810	1.383
7	2.385	0.386	1.192	2.906
8	2.765	0.440	2.906	1.192
9	3.146	0.500	4.600	4.600
10	3.527	0.024	1.002	4.400
11	3.908	0.081	2.715	2.715
12	4.300	0.138	4.400	1.002
13	4.700	0.195	0.810	2.525
14	5.100	0.253	2.525	0.810
15	5.400	0.310	4.200	4.200
16	5.800	0.367	0.620	0.620
17	6.192	0.420	2.335	4.000
18	6.600	0.481	4.000	2.335
19	7.000	0.005	0.431	2.144
20	7.300	0.062	2.144	0.431
21	7.700	0.119	3.858	3.858
22	8.096	0.176	0.240	0.240
23	8.500	0.233	1.954	3.667
24	8.900	0.291	3.667	1.954
25	9.200	0.348	0.050	3.477
26	9.600	0.400	1.763	1.763
27	10.00	0.460	3.477	0.050
28 ^a	8.600	0.129	1.909	4.500
29 ^a	0.620	0.257	0.123	4.500
30 ^a	7.400	0.332	2.732	0.499
31 ^a	6.993	0.420	4.900	3.570
32 ^a	7.900	0.319	2.610	3.705
33 ^a	7.400	0.067	4.600	2.854
34 ^a	4.900	0.308	1.574	1.026
35 ^a	2.229	0.026	3.616	4.497
36 ^a	6.292	0.430	3.296	0.087
37 ^a	7.909	0.114	4.603	0.900

^a Solutions that formed the external test set.

tors ($3^4 - 1$) and correspond to the first 27 solutions in Table 2. The external validation set was formed by 10 additional synthetic solutions (test-set), whose concentrations were generated randomly. As Table 2 shows, the ranges of variation of the concentrations of the four analytes vary two decades: urea, from 10^{-4} to 10^{-2} M, ammonium, from 5×10^{-6} to 5×10^{-4} M, and potassium and sodium, from 5×10^{-5} to 5×10^{-3} M, which supposes an extensive calibration space. Considering that the main interferences for the ammonium-transducer urea biosensor are the own ammonium and potassium ions, the control of their upper limits of concentration is of extreme importance. Preliminary experiments showed that when the upper limit of ammonium concentration was risen one decade, the answer to urea of the biosensor was lost.

The general procedure for the acquisition of the measurements was as follows. After the electrodes of the array were introduced in the sample solution and the values of response potential were acquired, the electrodes were removed from the solution and were washed with deionized water and dried with smooth absorbent paper. Following this procedure, the whole set

of samples in Table 2 was assayed within 180 min. The different solutions were assayed randomly.

2.5. Software

For the calculation of the regression parameters of the calibration curves for the biosensors, a worksheet of the program Excel from Microsoft was used. The training and evaluation of the different ANNs tested in this work have been made by means of a program developed with routines available to the Neural Network Toolbox v. 4.0, which comprises of the MATLAB v.6.1 (Maths Works Inc.). This software allows an almost absolute control on the parameters that can be adapted to obtain good adjustments of the model. For the construction and testing of the four PLS1 multivariate calibration models of the array, one for each analyte, the software SIMCA v. P 11 (Umetrics, 2006) was used. In this case, logarithms of concentration were used due to the linear nature of the PLS models.

2.6. Analysis of urine samples

The bioelectronic tongue was finally applied to real urine samples, and their results compared with reference determination procedures. The determination of urea was based on the Berthelot Reaction, that dependent upon the action of urease to produce ammonia, this is subsequently measured colorimetrically (Chaney and Marback, 1962). The ammonium reference value was obtained using an ammonia gas electrode (Clesceri et al., 1998) and the concentration of potassium and sodium using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) technique (US EPA Method, 1994). The urine samples were collected from three volunteers. 500 μL of each sample were diluted 1/100 with pH 7.5 Tris–HCl 50 mM. To obtain a greater variability of the concentrations of the different analytes, 18 new samples were prepared adding different quantities of each analyte, urea, ammonium, potassium and sodium (spiked samples) to the hundred-fold urine dilution.

3. Results and discussion

3.1. Response characteristics of the urea biosensor

Ammonium-transducer urea biosensors showed a LD of 1.0×10^{-4} M, and the slope of response to urea was around 30 mV decade⁻¹. Hydrogen-transducer urea biosensors showed a similar LD (1.6×10^{-4} M), but an inferior slope (-10 mV decade⁻¹), given the convenience of having a buffered medium at the optimal pH of the enzyme (Eddowes, 1987). Both types of urea biosensors had a linear response range of around two decades and a response time in the range of 1–2 min. The daily calibrations of these electrodes showed that biosensors with ammonium transducer did not present great variations of sensitivity during 20 natural days of study (variation lower than 10%) and that their LD was practically kept constant from the beginning. On the other side, biosensors based on the hydrogen transducer showed a shorter lifetime of around 1 week.

3.2. Building of response models

3.2.1. ANN model

Selecting the topology of an ANN is a first obstacle, because of the difficulty to predict an optimum configuration in advance. The ANN structure for the best modelling of the biosensor array, is obtained by a trial and error procedure. This process includes a combination of the number of neurons of the hidden layer and the transference function used within. These characteristics will define the specific combination leading to the best modelling ability.

We initially fixed the following parameters: the number of input neurons, which is 12 (12 sensors from the array); the number of output neurons, which is four (the four modelled analytes); the transfer function for the output layer is lineal (purelin) and a single hidden layer of neurons; these selections are based on previous experience with electronic tongues using potentiometric sensors (Gallardo et al., 2003). The learning strategy used was Bayesian regularization (Demuth and Beale, 1992) and employed for its internal parameters, a learning rate of 0.1 and a momentum of 0.4 selected from preliminary tests.

The modelling capacity of the ANN was examined in terms of the root mean squared error (RMSE):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\left(\sum_{i,j} \frac{(x_{i,j} - \hat{x}_{i,j})^2}{4n - 1} \right)} \quad (1)$$

where n is the number of samples ($4n$, as many as four species were determined) and $\hat{x}_{i,j}$ and $x_{i,j}$ are the expected concentration value and that provided by the ANN, respectively, for each compound, with i denoting samples and j species.

When compared with others, the strategy selected for the learning process (Bayesian Regularization) provided better RMSE values, greater consistency between the predicted and obtained values for the training and a higher significance for the external test set. Considering the non-linear behaviour of the sensors, two different non-linear transfer functions were considered for the hidden layer, specifically, a sigma-shaped function named tansig function (Freeman and Skapura, 1991) and a logistic function represented by the logsig function (Demuth and Beale, 1992). The best training results were obtained with the tansig function and five neurons in the hidden layer; this setup provided RMSE = 0.0024 for the external test set, those samples not intervening in training.

Fig. 1 illustrates the global behaviour of the modelling system for the external test set with the obtained values for urea, ammonium, potassium and sodium. The figure compares predicted versus expected concentrations. Predictions were good for the individual ions and for their mixtures. The figure also shows the correlation for the four individual species in the external test set, those data not used for training. The accuracy of the obtained response approaches ideality, with unity slopes and zero intercepts, in the external test set (all confidence intervals were calculated at the 95% confidence level). Especially good results were obtained for potassium and sodium.

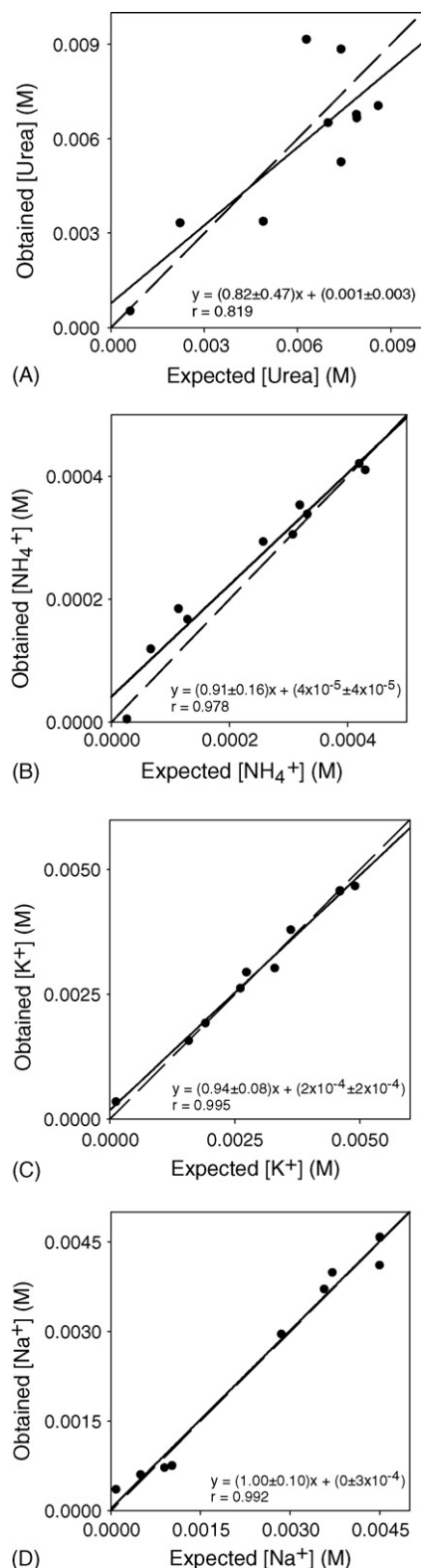


Fig. 1. Modelling performance achieved for the final ANN with the samples of the external test set: (A) urea, (B) ammonium, (C) potassium, and (D) sodium. The dashed line corresponds to ideality and the solid one is the regression of the comparison data.

3.2.2. PLS model and comparison of the two methods

In the case of PLS modelling, the crucial step is determining the correct number of factors in the model to avoid its underfit or overfit. In our case, the method used for the selection of the number of factors was based on the PRESS function (Prediction Residual Error Sum of Squares) defined as follows:

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (x_{i,j} - \hat{x}_{i,j})^2 \quad (2)$$

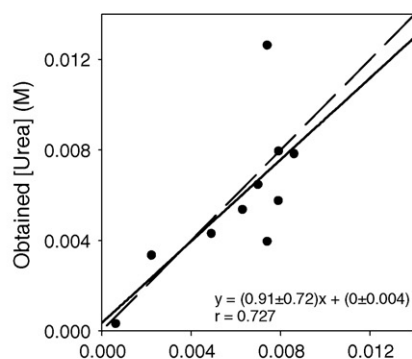
where n is the number of samples in the calibration set, m the number of dependent variables, in our case, the concentrations, and $\hat{x}_{i,j}$ and $x_{i,j}$ are the expected concentration value and that provided by the PLS model, respectively, for each compound, with i denoting samples and j species. The underlying idea is that the error decreases when the number of principal components or factors that are used in the model increases, until a point when the new introduced factors explain noise only and PRESS function increases again due to model overfit. The best calibration results were obtained with eight factors for urea PLS1 model (PRESS = 0.2463), three, for ammonium PLS1 model (PRESS = 0.4762), two, for potassium PLS1 model (PRESS = 0.0536), and two, for sodium PLS1 model (PRESS = 0.2054).

Fig. 2 illustrates the global behaviour of the modelling system for the external test set, those not used for calibration, and the obtained values for urea, ammonium, potassium and sodium. The figure also shows the correlations between obtained (y) and expected (x) concentrations. Comparing with the results obtained by the optimized ANN, larger errors were found in slopes and in intercepts. In addition, the correlation coefficients are less significant in all the cases. These data indicates a better modelling ability for the ANN than for the PLS.

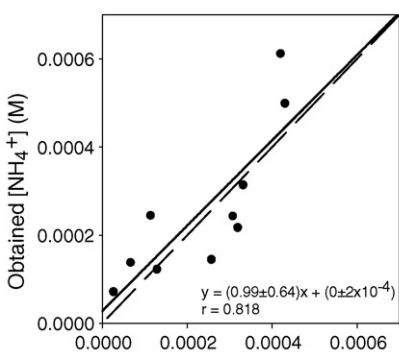
3.3. Application to real samples

The analysis of the three diluted urine samples plus the 18 spiked samples was performed by its simple direct measurement with the biosensor array, followed by interpolation using the ANN model and also the PLS model. Obtained results were compared with those obtained by established reference methods as stated in Section 2.6. Comparison of results obtained by the ANN model is given in Fig. 3. The regression data are showed also in the figure. Good correlations for the four species were achieved, especially for ammonium and sodium ions, and intercept values were not significantly different from zero. However, the values of the slopes were not unity. In fact, only the regressions for urea and for potassium included the unity in their confidence limits at 95% level.

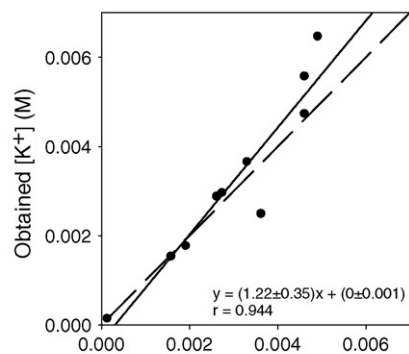
The results for PLS1 models are showed in Fig. 4. The regression data are showed also in the figure. The comparison of the obtained results by both multivariate calibration methods showed comparable correlations, in general. The slopes, intercepts and errors were better in the case of the ANNs. Besides, the correct linearity of the different regressions indicated an evident correlation for the analyzed samples, although an incorrect proportionality was apparent. The typical individual errors were



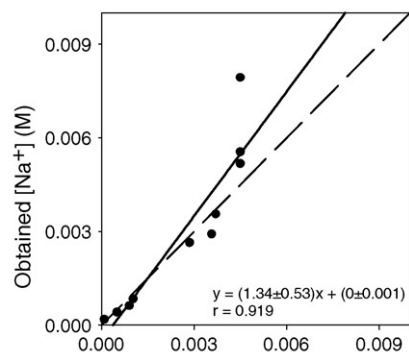
(A)



(B)

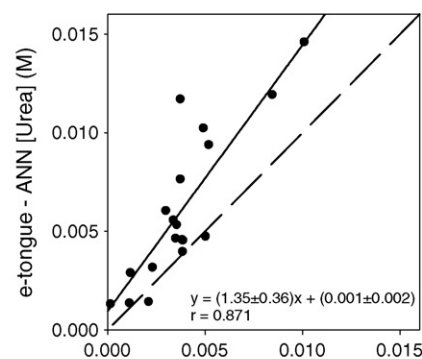


(C)

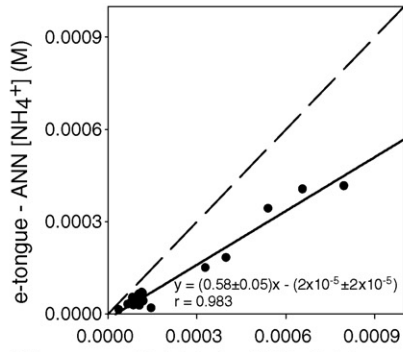


(D)

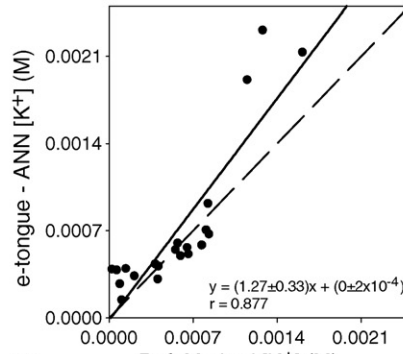
Fig. 2. Modelling performance achieved for the four PLS1 models with the samples of the external test set: (A) urea, (B) ammonium, (C) potassium, and (D) sodium. The dashed line corresponds to ideality and the solid one is the regression of the comparison data.



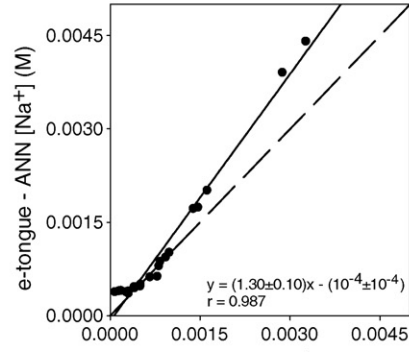
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 3. Comparison between results with reference methods and bioelectronic tongue for (A) urea, (B) ammonium, (C) potassium, and (D) sodium in urine and spiked samples using the optimized ANN model. The dashed line corresponds to ideality and the solid one is the regression of the comparison data.

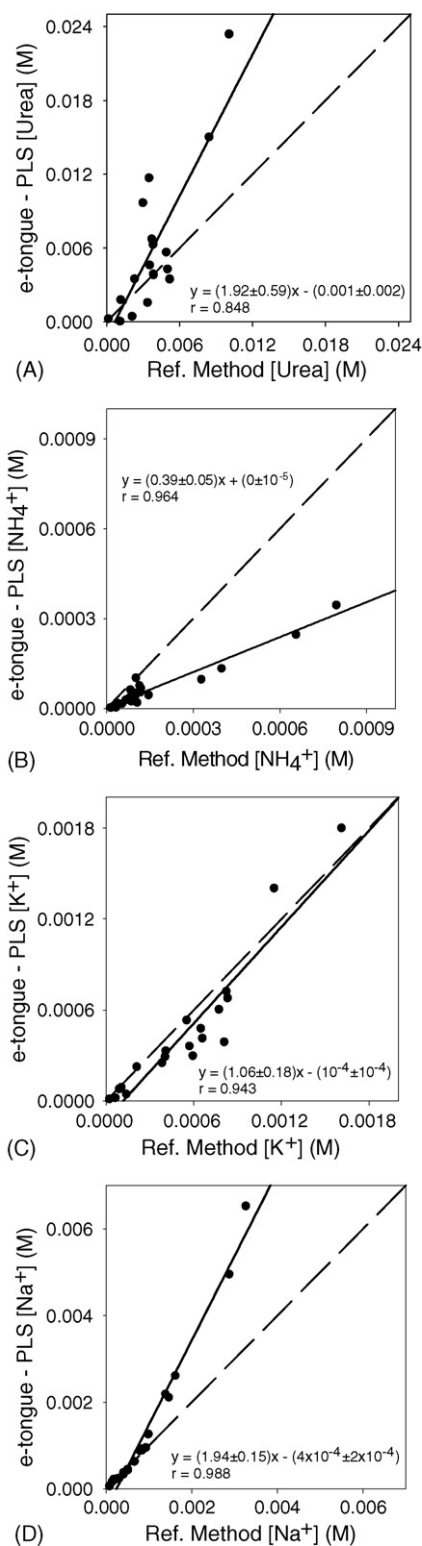


Fig. 4. Comparison between results with reference methods and bioelectronic tongue for (A) urea, (B) ammonium, (C) potassium, and (D) sodium in urine and spiked samples using the previous PLS1 models. The dashed line corresponds to ideality and the solid one is the regression of the comparison data.

lower than 8% for the ANN case and 13% for the PLS case, which indicates a not so bad performance. The recovery percentage of the added theoretical concentration for the 18 spiked samples using the ANN model was calculated and average values for the urea and ammonium of 78% and 90%, respectively, were found. These global values indicated a good correspondence with the reference values. In the case of sodium and potassium, the average recovery percentage was inferior to 40%, which indicated certain inconsistency for these two ions, probably caused by interfering effects not considered here. In any case, although these ions are only interpolated semi-quantitatively, their presence is correctly counterbalanced for the calculation of ammonium and urea. If results are to be improved, a simple procedure, such as a standard addition procedure could be used to add confidence to the determination of these two ions.

4. Conclusions

Urea biosensors based on the covalent immobilization of urease by carbodiimide reaction on to the sensitive PVC-COOH layer of ammonium and hydrogen ion-selective electrodes have adequate response characteristics for its inclusion in arrays together with ammonium, potassium, sodium, hydrogen and generic ion-selective electrodes. The biosensor array was thus employed to build the bioelectronic tongue for determination of urea in presence of its interferences. Two different multivariate calibration methods, ANNs and PLS were applied to obtain calibration models for the simultaneous four-analyte determination. As potentiometric sensors with cross-response are highly non-linear, ANN result more effective than lineal multivariate calibrations, like PLS, to model the system. The developed bioelectronic tongue provides an extraordinarily simple procedure, with direct measurement, to determine the concentration of urea in real samples without the necessity of eliminating the alkaline interferences or compensating endogenous ammonia. Discrepancies found with real samples in comparison with the good agreement obtained for the samples of the test-set, suggest that the calibration medium needs a further study to match better the real samples. Other alternative would be to increase the number of sensors used in the array, incorporating new species not considered here.

Acknowledgements

This work was supported by Spain's Ministry of Education, Science and Sport, MECD (Madrid), within the framework of Project CTQ2004-08134, and by the Department of Universities, Research and the Information Society (DURSI) of the Generalitat de Catalunya.

References

- Alegret, S., Martínez-Fábreas, E., 1989. *Biosensors* 4, 287–297.
- Alegret, S., del Valle, M., Merkoçi, A., 2004. *Sensores Electroquímicos*. Servei de Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Campanella, L., Mazzei, F., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., 1990. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 23, 195–202.
- Chaney, A.L., Marback, E.P., 1962. *Clin. Chem.* 8, 130–132.

- Clesceri, L.S., Eaton, A.D., Greenberg, A.E. (Eds.), 1998. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association Publications, Washington, DC.
- Davies, O.G., Moody, G.J., Thomas, J.D.R., 1988. *Analyst* 113, 497–500.
- Demuth, H., Beale, M., 1992. *Neural Network Toolbox*, for use with MATLAB. Mathworks Inc., Natick, MA.
- Eddowes, M.J., 1987. *Sens. Actuators* 11, 265–274.
- Eggenstein, C., Borchardt, M., Christoph, D., Gründig, B., Dumschat, C., Cammann, K., Knoll, M., Spener, F., 1999. *Biosens. Bioelectron.* 14, 33–41.
- Forster, R.J., Regan, F., Diamond, D., 1991. *Anal. Chem.* 63, 876–882.
- Freeman, J.A., Skapura, D.M., 1991. *Neural Networks, Algorithms, Applications, and Programming Techniques*. Addison-Wesley, Reading, MA.
- Gallardo, J., Alegret, S., Muñoz, R., de Román, M., Leija, L., Hernández, P.R., del Valle, M., 2003. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 248–256.
- Gil, M.H., Piedade, A.P., Alegret, S., Alonso, J., Martínez-Fábregas, E., Orellana, A., 1992. *Biosens. Bioelectron.* 7, 645–652.
- Glab, S., Koncki, R., Kopczewska, E., Walcerz, I., Hulanicki, A., 1994. *Talanta* 41, 1201–1205.
- Guilbault, G.G., Montalvo, J.G., 1969. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 2164–2165.
- Holmberg, M., Eriksson, M., Krantz-Rülcker, C., Artursson, T., Winqvist, F., Lloyd-Spez, A., Lundström, I., 2004. *Sens. Actuators B* 101, 213–223.
- Karube, I., Tamiya, E., Dicks, J.M., 1986. *Anal. Chim. Acta* 185, 195–200.
- Krawczynski vel Krawczyk, T., Trojanowicz, M., Lewenstam, A., 1994. *Talanta* 41, 1229–1236.
- Petersson, B.A., 1988. *Anal. Chim. Acta* 209, 239–248.
- Rosario, S.A., Cha, G.S., Meyerhoff, M.E., Trojanowicz, M., 1990. *Anal. Chem.* 62, 2418–2424.
- Ruzicka, J., Hansen, E.H., Ghose, A.K., Mottola, H.A., 1979. *Anal. Chem.* 51, 199–203.
- Sales, F., Callao, M.P., Rius, F.X., 1999. *Analyst* 124, 1045–1051.
- Schulthess, P., Shijo, Y., Pham, H.V., Prestch, E., Ammann, D., Simon, W., 1981. *Anal. Chim. Acta* 131, 111–116.
- Shen, H., Cardwell, T.J., Cattrall, R.W., 1998. *Analyst* 123, 2181–2184.
- Tamura, H., Shono, T., Kimura, K., 1982. *Anal. Chem.* 54, 1224–1227.
- Umetrics, 2006. MKS Instruments Inc. http://www.umetrics.com/default.asp?pagename/software_simcap/c3/WT.mc_id/L2.
- Umezawa, Y. (Ed.), 1990. *Handbook of Ion-selective Electrodes Selectivity Coefficients*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- US EPA Method 200.7, 1994. Revision 4.4. Methods for the determination of metals in environmental samples, Suppl. I, EPA-600/R-94-111.
- Vadgama, P.M., Alberti, K.G.M.M., Covington, A.K., 1982. *Anal. Chim. Acta* 136, 403–406.
- Workman, J., Creasy, K.E., Doherty, L., Bond, L., Koch, M., Ullman, D.J., Veltkam, D.J., 2001. *Anal. Chem.* 73, 2705–2718.
- Yasuda, K., Miyagi, H., Yamata, Y., Takata, Y., 1984. *Analyst* 109, 61–64.

Application of a potentiometric electronic tongue to fertigation strategy in greenhouse cultivation

M. Gutiérrez^a, S. Alegret^a, R. Cáceres^b, J. Casadesús^b,
O. Marfà^b, M. del Valle^{a,*}

^a *Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Spain*

^b *Department of Horticultural Technology, IRTA, 08348 Cabrils, Barcelona, Spain*

Received 3 May 2006; received in revised form 26 January 2007; accepted 29 January 2007

Abstract

The use of an electronic tongue is proposed for the first time in the supervision of the nutrient solution composition produced by a fertigation system. This new approach in chemical analysis consists of an array of non-specific sensors coupled with a multivariate calibration tool. For the studied case, the proposed system was formed by a sensor array of eight potentiometric sensors based on polymeric (PVC) membranes. The subsequent cross-response processing was based on a multilayer artificial neural network (ANN) model. This model predicted the concentration values of ammonium, potassium and nitrate, and the undesired saline sodium and chloride compounds in nutrient solution, drainage solution and tap water, departing from the information supplied by the sensor array plus temperature. Results showed good prediction ability for the different chemical species except for chloride, where the strong interfering effects of nitrate could not be balanced. The approach appears as a feasible method for the in-line assessment of nutrients and undesired compounds in fertigation solutions.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Potentiometric sensors; Artificial neural networks; Electronic tongue; Fertigation; Soilless culture

1. Introduction

For current needs of increasing crop production and quality in modern horticulture, soilless techniques are an established strategy to implement advanced control systems. In this strategy, plants grow on media as rockwool, perlite, peat, etc. which substitute “*in situ*” soil. These growing techniques are named soilless cultures. A fertilizer supply unit provides nutrients in liquid form. A system of pumps, valves and irrigation drippers delivers the water and fertilizer ions (nutrient solution) to each individual plant (Marfà, 2000). Environmental care and efficiency demand that soilless techniques are closed to prevent leaching nutrient solutions into the soil. A possible solution is the recirculation of leachates. These techniques are named closed soilless cultures. Besides, recirculation improves the efficiency in the use of water and nutrients, since it reduces the amount of water and fertilizers (Savvas, 2002).

In these closed systems, the imbalance between the ionic concentrations in the nutrient solution and the plant absorption rates of each of them produces a decrease in the concentration of fertilizer ions, such as ammonium, potassium and nitrate in the drainage. At the same time, ion accumulation can occur. This is the case of other ions

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

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

(sodium, chloride, sulphate and calcium) that are present in the tap water at higher concentrations than those required for plant growth.

Therefore, it is desirable to know the composition of the drainage solution to regenerate a nutrient solution of optimal composition, by the addition of the appropriate amounts of tap water and each nutrient. A second goal may be to avoid the accumulation of undesired substances. Current protocols are based on closed-loop with electrical conductivity (EC) and pH signals control (Brun et al., 1993; Savvas and Manos, 1999; Kläring, 2001; Savvas, 2002). This type of protocol allows to automatically control the EC of the nutrient solution by means of the dilution of the drainage solution with tap water, but it does not allow to dose in real time each nutrient in response to the demand of the crop. The dosage is based on analysis which is done periodically in the laboratory. That can cause a time-lag between sampling and the readjustment of the nutrient solution. The weather conditions or the progress of the crop can cause important changes in the demand of nutrients and consequently marked differences between the dosage of nutrients and the current plant demand. In this sense, the measurement of the composition of the nutrient solution in real time would undoubtedly improve water and fertilizer use efficiency.

Although there are precedents of in-line use of sensors for the supervision and handling of soilless cultures for more than 15 years (Bailey et al., 1988; Hashimoto et al., 1989; Van den Vlekkert et al., 1992; Durán and Navas, 2000; Gieling et al., 2005), their use has been restricted to research. The availability of economic and robust sensors is not clear. Specially, their temperature sensitivity problems, limited lifetime and distortions due to interfering ions have diffculted the application of these sensors (Heinen and Harmanny, 1992; Kläring, 2001). Additionally, it has been a common practice among farmers to apply water and fertilizers in excess. Only recently, environmental concerns have motivated the development of policies aimed at the reduction of pollution by intensive agriculture.

Nevertheless, a novel concept in the chemical sensors field, named electronic tongues, appears as a potentially feasible solution for “in-line” assessment of the composition of irrigation solutions.

An electronic tongue entails the use of an array of sensors with partially selective responses plus a multivariate chemometric tool, to develop qualitative (identification) or quantitative (multidetermination) applications in liquid media (Legin et al., 2000; Ciosek et al., 2005; Gallardo et al., 2005). This approach receives the name of electronic tongue because it mimics the sense of taste in animals and follows the former electronic nose term, used for gas analysis.

In this paper we report for the first time the use of an electronic tongue in a soilless crop. The purpose is to determine simultaneously the concentration of the analytes in real time without the need of eliminating the interferences. In this case, the sensor array was formed by potentiometric sensors (ion-selective electrodes, ISEs) employing PVC polymeric membranes. For its operation, a specific response model was built by employing ANNs. Special attention was paid in compensating temperature effects and response drifts. Determined substances were the nutrients ammonium, potassium and nitrate, plus undesired saline compounds, sodium and chloride.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and solutions

The ion-selective PVC membranes were prepared from high-molecular weight PVC (Fluka, Switzerland), using bis(1-butylpentyl) adipate (BPA), dioctyl sebacate (DOS), 2-nitrophenyloctylether (NPOE) and dibutylphtalate (all from Fluka) as plasticizers. The recognition elements employed to formulate the potentiometric membranes were the ionophores nonactin (nonactin from Streptomyces, Fluka), valinomycin (potassium ionophore I, Fluka) and bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-methylmalonate (CMDMM, Dojindo), and the charged carriers tridodecylmethylammonium chloride (TDMAC, Fluka) and tetraoctylammonium nitrate (TOAN, Fluka). Additionally, two recognition elements with generic response were used, dibenzo(18-crown-6) (Fluka) for cations and tetraoctylammonium bromide (TOAB, Fluka) for anions.

The materials used to prepare the solid electrical contact were the epoxy resin components Araldite M and Hardener HR (both from Uneco, Barcelona), and graphite powder (50 μm , BDH Laboratory Supplies, UK) as conducting filler.

All other reagents used for the preparation of the training and testing solutions were of high purity, analytical grade, pro analysis or equivalent.

Real water samples were obtained from greenhouses situated in the Maresme county (41°25'N and 2°23'E), near Barcelona, in the central coast of Catalonia (Spain). Three types of samples were studied, nutrient solution, drainage solution and tap water.

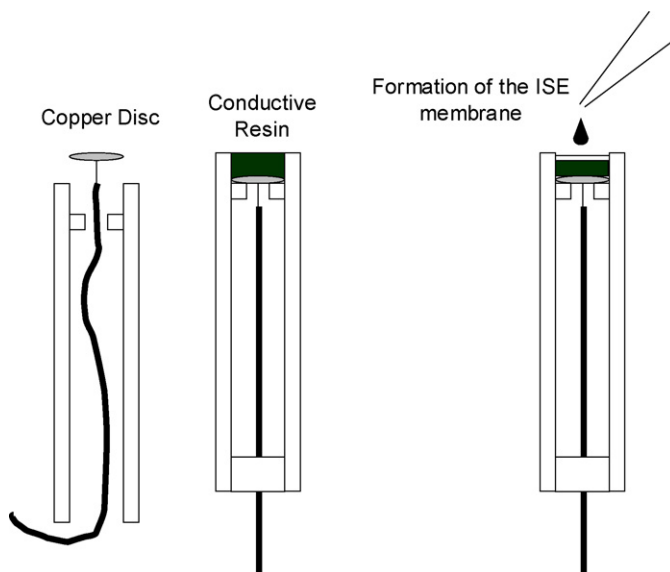


Fig. 1. Schematic diagram of the fabrication process of the PVC-membrane all-solid-state potentiometric sensors using a graphite-epoxy composite as the internal solid contact.

2.2. Sensor array

The used sensors were all-solid-state ISEs with a solid electrical contact made from a conductive epoxy composite. The basic response of this type of potentiometric sensors is described by the Nikolskii–Eisenmann equation (Harris, 1998). Fig. 1 depicts schematically the construction procedure of one of these sensors. These are of general use in our laboratories (Alegret and Martínez-Fábregas, 1989). The sensor was formed by filling a plastic tube (6 mm internal diameter) having a Cu electrical contact with an homogeneous mixture of 35.7% Araldite M, 14.3% HR hardener, and 50% graphite powder, and cured for 12 h at 40 °C. Next, a 0.3 mm depth cavity is formed on the top of the constructed body. Membranes are formed by solvent casting on this cavity using eight or nine drops of PVC membrane cocktail (1 ml per each 20 mg PVC) and their thickness is ca. 0.3 mm. Once formed, membranes were conditioned in a 0.1 M solution of their primary ion for 24 h.

Table 1 summarises the formulation of the different membranes, where the used recognition element determines the selectivity of the obtained sensor. The used sensor array comprised one sensor for each of these ions: ammonium, potassium, sodium and chloride, duplicated sensors for nitrate, plus two generic membrane formulations, one for alkaline ions employing the electroactive element dibenzo(18-crown-6) and other for anions employing TOAB. Nitrate sensor was duplicated since this type of sensor exhibits the worse detection limit.

Table 1

Formulation of the ion selective membranes employed in the construction of the potentiometric sensor array

Sensor	PVC (%)	Plasticizer (%)	Recognition element (%)	Reference
NH ₄ ⁺	33	BPA (66)	Nonactin (1)	Davies et al. (1988)
K ⁺	30	DOS (66)	Valinomycin (3) ^a	Shen et al. (1998)
Na ⁺	22	NPOE (70)	CMDMM (6) ^a	Tamura et al. (1982)
Cl ⁻	30	NPOE (65)	TDMAC (5)	Legin et al. (2004)
NO ₃ ⁻	30	Dibutylphthalate (67)	TOAN (3)	Pérez-Olmos et al. (2001)
Generic 1	29	DOS (67)	Dibenzo (18-crown-6) (4)	Umezawa (1990)
Generic 2	29	Dibutylphthalate (65)	TOAB (4)	Isildak and Asan (1999)

^a The formulation includes potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate as additive.

2.3. Apparatus

Potentiometric measurements were performed with a laboratory-made data acquisition front-end consisting of eight input channels made with Texas Instruments TL071 operational amplifiers in follower configuration for adapting the impedance of each sensor. Measurements were unipolar and made with grounded reference electrode. Each channel was noise-shielded with its signal guard. The output of each amplifier was filtered with a second order active low-pass filter centred at a 2 Hz cutoff frequency.

For measurements in the laboratory, all the filtered outputs were connected to an A/D conversion card (Advantech PC-Lab 818, Advantech) installed in a PC. Readings were acquired by using custom software written in QuickBASIC. For the in-line measurements in the greenhouse, an Campbell CR10 datalogger (Campbell Scientific Inc., USA) was used.

2.4. Training and measurement procedure

A first verification of the correct functioning of the prepared sensors was performed by calibrating each device to its corresponding primary ion in 25 ml of bidistilled water by sequential additions of standard solutions. The generic sensors were calibrated with respect to potassium and nitrate, arbitrarily.

Measurements for training were done in the laboratory with solutions with a defined background. In this way, we used a 1/1 (v/v) mixture of drainage solution and tap water of the greenhouse to imitate the real conditions. As reference electrode, a double junction Ag/AgCl electrode (Orion 90-02-00) was used. A temperature probe (Pt 100, Crison) to read the temperature of the solutions was employed too.

In order to generate the primary information for the modelling of the system, different mixtures were prepared in our laboratory by additions of standard solutions of the different considered ions to the controlled background. Each of these solutions, with a definite value for the concentration of each of the five ions, was measured with the sensor array and entered into the neural network. We also propose to include as inputs the solution temperature and the day of measurement in order to compensate for aging and temperature drifts. The strategy is depicted in Fig. 2.

The training of the electronic tongue was performed from the measures of the sensor array corresponding to a set of samples defined from a statistical experimental design. The composition of the 27 solutions used for the training of the electronic tongue was designed accordingly to a fractional factorial design (Magalhaes and Machado, 2002) with three levels of concentration and five factors (the five considered ions, 3^{5-2}). The standard solutions employed to fix the ion concentrations were ammonium nitrate 0.01 M, sodium chloride 0.1 M, magnesium nitrate 0.1 M, potassium nitrate 0.1 M, potassium dihydrogen phosphate 0.01 M and potassium sulphate 0.1 M. To complete the concentration of the

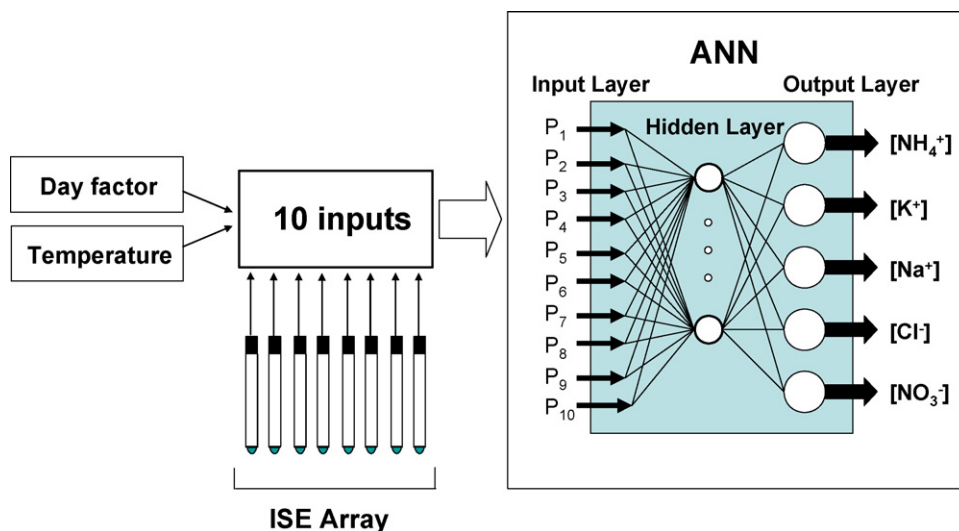


Fig. 2. Schematic representation of the electronic tongue approach.

Table 2
Composition of the training and the external set samples

Solution	Concentration (mM)				
	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻
1	0.771	4.257	1.973	2.002	5.343
2	0.771	4.256	1.966	1.995	9.442
3	0.771	4.256	1.947	1.974	20.94
4	0.771	8.356	4.043	4.071	5.337
5	0.771	8.356	4.036	4.063	9.435
6	0.771	8.354	4.016	4.043	20.93
7	0.771	19.85	11.98	12.01	5.324
8	0.771	19.85	11.98	12.00	9.422
9	0.771	19.85	11.96	11.98	20.92
10	2.181	4.256	4.041	12.07	5.336
11	2.181	4.255	4.034	12.06	9.435
12	2.181	4.254	4.014	12.04	20.93
13	2.181	8.356	12.045	1.973	5.337
14	2.181	8.356	12.04	1.966	9.436
15	2.181	8.354	12.02	1.945	20.93
16	2.181	19.85	1.897	4.023	5.326
17	2.181	19.85	1.890	4.016	9.425
18	2.181	19.85	1.870	3.995	20.92
19	6.181	4.256	12.04	4.070	5.336
20	6.181	4.256	12.04	4.062	9.435
21	6.181	4.254	12.02	4.042	20.93
22	6.181	8.354	1.915	12.04	5.330
23	6.181	8.354	1.908	12.03	9.429
24	6.181	8.353	1.889	12.01	20.92
25	6.181	19.85	3.974	1.900	5.321
26	6.181	19.85	3.967	1.892	9.420
27	6.181	19.85	3.948	1.872	20.92
28*	3.051	14.17	6.469	3.835	14.73
29*	2.271	6.555	8.535	7.062	11.33
30*	5.291	8.695	9.924	9.051	12.32
31*	2.931	11.69	10.51	5.739	15.30
32*	3.491	12.27	4.870	9.336	6.129
33*	5.051	9.194	7.994	8.141	18.63
34*	1.931	12.37	5.029	3.076	17.53

* Solutions that formed the external test set.

higher levels, we used the sulphates of the cations (ammonium sulphate, potassium sulphate and sodium sulphate) and the acids of the anions (hydrochloric acid and nitric acid). This is an approach to represent systematically the variability of the nutrient solution and to cover the complexity of the training space. For a proper verification of the electronic tongue operation, an additional set of solutions was used, the test set, which does not participate in the training process. The test set was formed by seven additional synthetic solutions, the concentrations of which were generated randomly, but inside the training space. Table 2 shows the concentrations of the complete set of solutions used to generate the response model.

These 34 prepared solutions were measured in three turns; one with all the solutions at room temperature (around 24 °C) and another with half of the solutions at lower temperature (around 10 °C) and the third one with the other half of them at higher temperature (around 35 °C), according to the cycle of the day and night. The complete set of experiments needed 2 days of laboratory work for its completion.

2.5. Software

The ANNs tested were trained and evaluated by using the routines available to the Neural Network Toolbox v.4.0, which comprises of the MATLAB v.6.1 (Maths Works Inc.). This software allows an almost absolute control on the

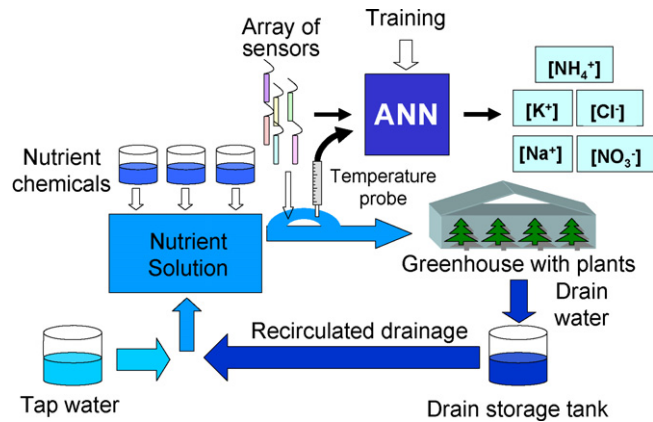


Fig. 3. Block diagram of the whole system, in-line insertion of the electronic tongue inside the fertigation strategy. In our case, the concentration of the five ions in the nutrient solution was monitored.

parameters that can be adapted to obtain good adjustments of the model. Non-linear regression fittings were done employing Sigmaplot 8.0 (SPSS Inc.).

2.6. Application with real samples

A set of real samples (nutrient solution, leachate and tap water) were collected from the recirculating soilless culture described below and measured by the electronic tongue. Then the results were compared with their composition determined by reference methods of widespread use: ammonium by an ammonia gas electrode (Orion 95-12), sodium and potassium by atomic emission spectroscopy, and nitrate and chloride by capillary electrophoresis with UV detection.

2.7. Application in-line in a soilless culture

The in-line measurements were performed between May and June of 2005 in a soilless rose crop (*Rosa indica* L. cv. Lovelly Red[®]) in a climatized greenhouse of 270 m² at the IRTA site in Cabrils (41°25'N, 2°23'E). The growing media were perlite for one half of the greenhouse and coco fiber for the other half. Irrigation was triggered automatically every time that the accumulated radiation reached 200 W m⁻² h, leaving a leaching fraction of around 20% of the applied water. The leachates of both types of substrate were collected together and reused for the production of a new nutrient solution. The recomposition of nutrient solution consisted on the dosification of the volumes of leachate, tap water and six concentrated solutions (potassium nitrate and ammonium nitrate; potassium sulphate; monopotassium phosphate; magnesium nitrate; microelements and nitric acid). This dosification was controlled by a programmable logic controller (PLC) MCU "Ferti" (Multi Computer Unit; FEMCO, Damazan, France) based on the pH (measured by a pH sensor from Broadley James Corp., USA), EC and predefined ratios between the volumes of each concentrated solution. The ratios of injection of the diverse concentrated solution were modified, if necessary, according to laboratory analysis of the leachate performed every 2 weeks.

The array of sensors and a temperature probe were installed in the pipe between the tank of recomposed nutrient solution and the irrigation pump. One measurement per sensor was done every 5 min and the average of three measurements was recorded every 15 min. The location of the array of sensors and the temperature probe inside the system is shown in Fig. 3.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of sensor's response

The sensors that formed the array were previously evaluated in bidistilled water to establish the response characteristics. The results are summarised in Table 3. The obtained sensitivities are close to the corresponding theoretical values in all cases except for the generic response electrodes due to their non-selective nature. The obtained detection

Table 3
Response parameters of each sensor used in the array in bidistilled water

Sensor	Sensitivity (mV/decade)	Detection limit (M)	Regression coefficient
NH ₄ ⁺	56.4	2.2×10^{-5}	$r > 0.999$
K ⁺	55.4	1.0×10^{-5}	$r = 0.998$
Na ⁺	59.8	1.1×10^{-5}	$r = 0.998$
Cl ⁻	-53.7	1.4×10^{-5}	$r = 0.998$
NO ₃ ⁻ (1)	-53.7	1.1×10^{-4}	$r > 0.999$
NO ₃ ⁻ (2)	-55.4	7.5×10^{-5}	$r > 0.999$
Generic alkaline	50.5	2.0×10^{-5}	$r > 0.999$
Generic anions	-48.2	2.7×10^{-5}	$r = 0.999$

limits are around 10^{-5} M for each prepared sensor. The regression coefficients obtained for the non-linear fitting of the experimental data to the Nikolskii–Eisenmann equation was ≥ 0.998 for all tested sensors. The initial verification of their behaviour confirmed that these sensors were suitable for constituting the sensor array.

3.2. Building of the ANN model

ANNs are multivariate calibration tools especially suited for nonlinear systems such as it is the case with potentiometric sensors (Bos et al., 1993). However, ANN response models must be carefully built in order to account for the whole variability in the concerned system (Baret et al., 2000). Their use entails optimizing the internal parameters that govern their functioning (e.g., their topology and learning algorithm). The topology of ANNs is optimized by determining the number of layers and the number of neurons to be included in each layer. Usually, an ANN comprises an input layer that gathers the information provided by the sensor array and other primary information, an output layer that contains the chemical information sought and hidden layers that facilitate learning. The number of neurons to be included in the input and output layers is dictated by the characteristics of the concerned system; that for the hidden layers is determined by trial and error. One must also identify the transfer functions to be used in the different layers and suit the learning approach used to the model considered in order to minimize differences between calculated and expected values. These characteristics will define the specific combination leading to the best modelling ability.

We initially fixed the following parameter values for modelling: the number of input neurons, which is 10 (eight sensors from the array plus the day factor and the temperature); the number of output neurons, which was five (the five modelled analytes); the transfer function for the output layer was lineal (*purelin*) and a single hidden layer of neurons (Gallardo et al., 2003). The learning strategy used, as internal parameters, a learning rate of 0.1 and a momentum of 0.4 selected from preliminary tests. The modelling capacity of the ANN was examined in terms of the root mean squared error (RMSE).

The strategy used for the learning process was Bayesian Regularization, which provided better RMSE values, greater consistency between the predicted and obtained values for the training and a higher significance for the external test set. Other typical training algorithms, such the Gradient Descent, need a third subset of samples, the validation subset to validate the model internally, but with the algorithm used this was not necessary (Demuth and Beale, 1992). Considering the nonlinear behaviour of the sensors, two different nonlinear transfer functions were considered for the hidden layer, specifically, a sigma-shaped function named *tansig* function (Freeman and Skapura, 1991) and a logistic function represented by the *logsig* function. The best training results were obtained with the *tansig* function and eight neurons in the hidden layer, which provided RMSE=0.010 for the test set (samples not used by the net during the training process).

Fig. 4 illustrates the global behaviour of the modelling system for the external test set with the obtained values for ammonium, potassium, sodium and nitrate. Predictions were good for the individual ions and for their mixtures. Table 4 shows the correlation between the obtained (y) and expected (x) values for the four individual ions at each point in the external test set. The accuracy of the obtained response approaches ideality, with unity slopes and zero intercepts, in the external test set (all confidence intervals were calculated at the 95% confidence level). For chloride, the training comparison graph was good enough, but the relative errors obtained in the test set were around 10% in general due to the high interferences caused by the other ions.

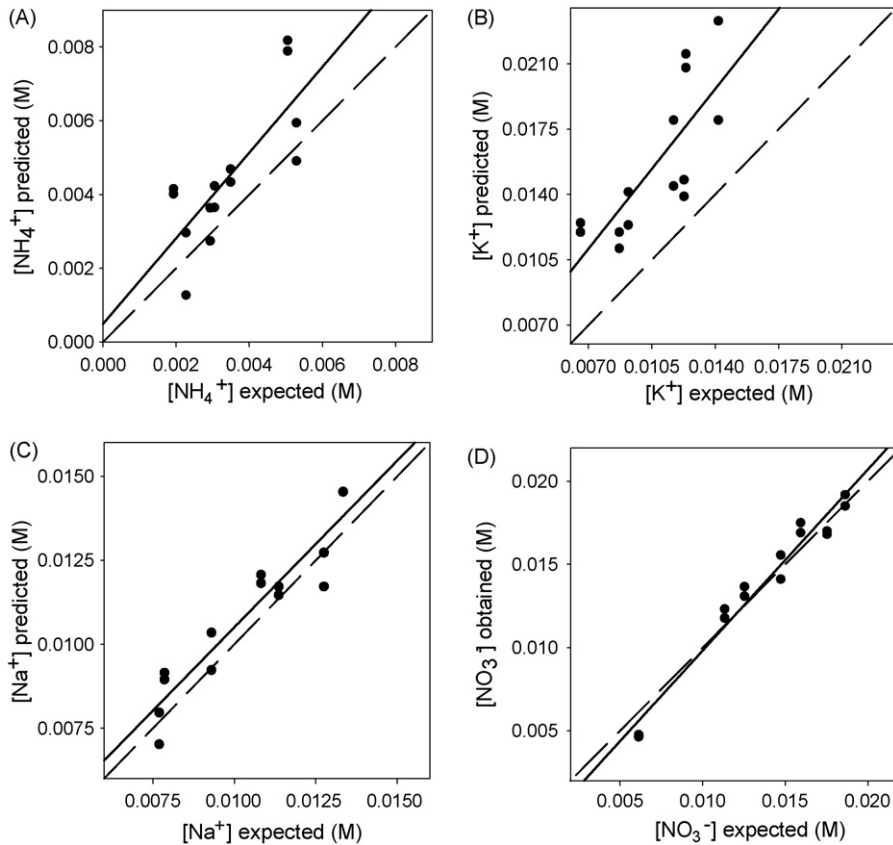


Fig. 4. Modelling performance achieved with the final ANN in the samples of the external test set, not participating in training; (A) ammonium, (B) potassium, (C) sodium and (D) nitrate. The dashed line corresponds to ideality ($y=x$) and the solid one is the indicated regression of the comparison data.

3.3. Application with real samples

Once the applicability of this system was demonstrated, the proposed method was applied to real samples of an existing fertigation experiment. Three groups of samples were studied: nutrient solution, drainage solution and tap water. The predictive relative errors of the logarithm of the concentration for the five ions are summarized in Table 5 and show that the predictive relative errors are in punctual cases close to 15%, although much lower in average. For example, we obtained a mean relative error of 5.9% in the determination of ammonium. As we expected, the worse results are obtained in the determination of chloride with a mean relative error of 10.0%. We have checked that the best results were obtained in drainage water samples. That is because the values of concentration of the studied ions in tap water samples are too diluted to be inside the training space of the considered ANN. The nutrient solution samples have higher mean relative errors than the drainage samples.

Table 4

Correlation between the obtained concentration values with the electronic tongue and the expected values for ammonium, potassium, sodium and nitrate in the external test set using the ANN model

Species	Slope	Intercept	Regression coefficient
Ammonium	1.2 ± 0.6	$(5 \times 10^{-4}) \pm 0.002$	0.776
Potassium	1.2 ± 0.6	0.002 ± 0.007	0.778
Sodium	1.0 ± 0.2	$(-5 \times 10^{-4}) \pm 0.002$	0.942
Nitrate	1.1 ± 0.1	$(-0.001) \pm 0.002$	0.980

Table 5
Relative errors obtained in the determination of the five ions in real greenhouse samples

Sample	Relative error (%)				
	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻
1	7.5	6.0	-11.0	-11.0	3.4
2	1.0	-5.9	-8.2	-0.7	-5.2
3	6.2	12.1	-11.3	-13.0	3.6
4	1.0	15.0	-9.6	-14.1	-4.5
5	-2.2	10.8	-7.5	-14.9	-12.5
6	-2.2	7.4	-6.4	0.6	-1.6
7	-14.9	0.5	-9.1	-12.1	-9.6
8	-5.4	2.6	-9.0	-14.9	-14.6
9	-13.0	4.9	-7.7	-9.1	-14.1
Mean relative error (%)	5.9	7.2	8.9	10.0	7.7

We have compared these results obtained using the electronic tongue with those obtained using the calibration curve of each specific sensor, which are summarized in Table 6. This table shows that the relative errors have increased for the five ions because of the interferences and the effect of the temperature, specially in the determination of nitrate.

3.4. In-line application in the greenhouse

With the previously optimized ANN, the primary data were turned into analytical information. The concentration of ammonium, potassium, sodium, chloride and nitrate in the nutrient solution was continuously monitored for more than 15 days, from which 2 days were analyzed with more detail. Figs. 5 and 6 show the concentration of the considered cations and anions that was predicted by the electronic tongue during these 2 days, respectively. Besides, both figures represent the recorded nutrient solution temperature with the two day–night cycles. The recirculation system is able to maintain the concentration of the five ions in a narrow range. Since no big concentration variations were observed once the electrodes were stabilized (since 14:00 h of day 1), we can consider that the electronic tongue corrected the temperature effect. The potassium concentration was between 0.015 and 0.02 M, the sodium concentration between 0.02 and 0.022 M, while the ammonium concentration was around 0.005 M. For the nitrate, the concentration in the nutrient solution was found between 0.01 and 0.015 M. Finally, the chloride concentration in the nutrient solution is very low so we obtained negative values with the ANN model.

The predictions of the content in ammonium, potassium, sodium and nitrate ion were satisfactory since the electronic tongue was validated by comparison with the real samples done before. Specially, the application showed that the ANN

Table 6
Relative errors obtained using the calibration curve for the determination of the five ions in real greenhouse samples

Sample	Relative error (%)				
	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻
1	-5.3	-28.1	85.9	105.6	80.3
2	-28.9	-21.7	48.2	24.6	80.4
3	-12.9	-22.8	43.8	51.8	80.3
4	-18.5	-20.8	103.7	80.2	80.4
5	-8.2	-28.0	30.4	52.6	80.3
6	-38.6	-40.0	24.2	42.6	112.4
7	-37.5	-33.5	18.5	32.3	94.9
8	-21.4	-25.3	22.3	41.0	76.8
9	-28.2	-23.2	17.6	35.1	84.3
Mean relative error (%)	22.2	27.0	43.8	51.8	58.6

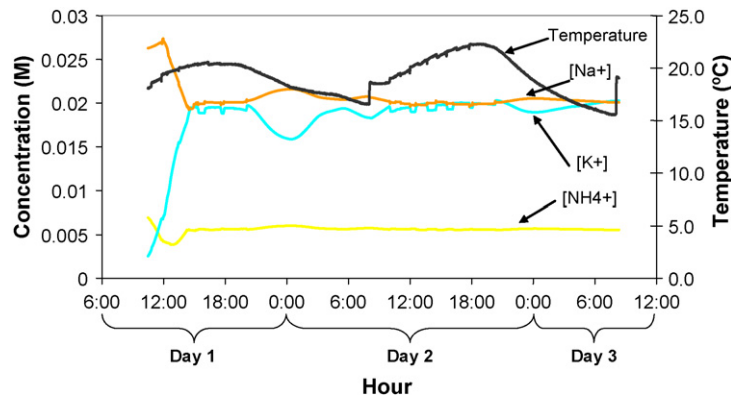


Fig. 5. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue for considered cations: ammonium, potassium and sodium, in the nutrient solution during 2 days continuous monitoring. The variation of temperature accordingly to the cycle of day and night is clearly observed.

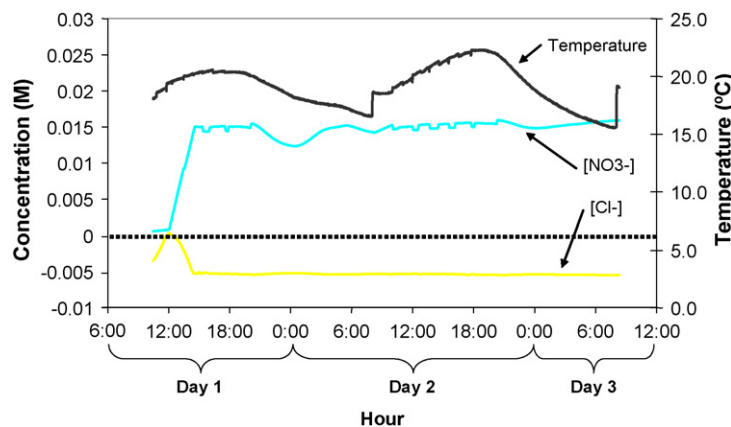


Fig. 6. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue for considered anions: chloride and nitrate, in the nutrient solution during 2 days continuous monitoring. The variation of temperature accordingly to the cycle of day and night is clearly observed.

succeeded in compensating the temperature effect. However, higher errors were obtained in the prediction of chloride ion. That is because nitrate ion has a big interfering effect on the determination of chloride ion by carrier-based sensors and these types of samples have a high concentration of nitrate. In fact, an observation made after the application experiment, when the response of the sensors was checked in the laboratory, was that the response pattern of the chloride sensor was altered, being responsive mainly to nitrate instead. This effect was caused by the anion exchange in the polymeric membrane during utilization of the sensor, favoured by the high concentrations of nitrate in the nutrient solution. One approach to solve this inconvenient we are studying is to use chloride sensors of different nature with less influence of nitrate ion.

4. Conclusions

A potentiometric electronic tongue for the simultaneous determination of ammonium, potassium, sodium, chloride and nitrate in greenhouse samples with fertigation strategy was developed and optimized. The in-line application showed that the ANN succeeded in compensating the temperature effect while concentrations of four of the five studied ions could be correctly predicted. These initial results are very promising, given the intrinsic difficulty of the studied case, where different nutrient ions with strong interfering effects are present at high concentrations. On going experiments are focused to study the effect of response drifts of the sensor array, and how to correct its possible distortions.

Acknowledgements

This work was supported by Spain's Ministry of Education, Science and Sport, MECD (Madrid), within the framework of CTQ2004-08134 and AGL2002-04098-C02-02 Projects, and by the Department of Universities, Research and the Information Society (DURSI) of the Generalitat de Catalunya.

References

- Alegret, S., Martínez-Fábregas, E., 1989. Biosensors based on conducting filled polymer all-solid-state PVC matrix membranes electrodes. *Biosensors* 4, 287–297.
- Bailey, B.J., Haggett, B.G.D., Hunter, A., Albery, W.J., Svanberg, L.R., 1988. Monitoring nutrient film solutions using ion-selective electrodes. *J. Agric. Eng. Res.* 40, 129–142.
- Baret, M., Massart, D.L., Fabry, P., Conesa, F., Eichner, C., Menardo, M., 2000. Application of neural network calibrations to an halide ISE array. *Talanta* 51, 863–877.
- Bos, M., Bos, A., Van der Linden, W.E., 1993. Data processing by neural networks in quantitative chemical analysis. *Analyst* 118, 323–328.
- Brun, R., Paris, I., Hammelin, I., 1993. Fertigation management of rose plants grown in greenhouse on rockwool. *Adv. Hortic.* 7, 145–148.
- Ciosek, P., Brzózka, Z., Wróblewski, W., Martinelli, E., Di Natale, C., D'Amico, A., 2005. Direct and two-stage data analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue—effect of supervised feature extraction. *Talanta* 67, 590–596.
- Davies, O.G., Moody, G.J., Thomas, J.D.R., 1988. Optimisation of poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrodes for ammonium ions. *Analyst* 113, 497–500.
- Demuth, H., Beale, M. (Eds.), 1992. *Neural Network Toolbox, for Use with MATLAB*. Mathworks Inc., Natick, MA.
- Durán, J.M., Navas, L.M., 2000. Monitorización de soluciones nutritivas recirculantes mediante electrodos selectivos de iones. In: Marfà, O. (Ed.), *Recirculación en Cultivos sin Suelo*. Ediciones de Horticultura S.L., Reus, pp. 39–52.
- Freeman, J.A., Skapura, D.M. (Eds.), 1991. *Neural Networks, Algorithms, Applications, and Programming Techniques*. Addison-Wesley, Reading, MA.
- Gallardo, J., Alegret, S., Muñoz, R., de Román, M., Leija, L., Hernández, P.R., del Valle, M., 2003. An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 248–256.
- Gallardo, J., Alegret, S., Muñoz, R., Leija, L., Hernández, P.R., del Valle, M., 2005. Use of an electronic tongue based on all-solid-state potentiometric sensors for the quantitation of alkaline ions. *Electroanalysis* 17, 348–355.
- Gieling, T.H., Van Straten, G., Janssen, H.J.J., Wouters, H., 2005. ISE and Chemfet sensors in greenhouse cultivation. *Sens. Actuator B: Chem.* 105, 74–80.
- Harris, D.C. (Ed.), 1998. *Quantitative Chemical Analysis*, 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York, pp. 391–399.
- Hashimoto, Y., Morimoto, T., Fukuyama, T., Watake, H., Tamaguchi, S., Kikuchi, H., 1989. Identification and control of hydroponic system using ion sensors. *Acta Hortic.* 245, 490–497.
- Heinen, M., Harmanny, K., 1992. Evaluation of the performance of ion-selective electrodes in an automated NFT system. *Acta Hortic.* 304, 273–280.
- Isildak, I., Asan, A., 1999. Simultaneous detection of monovalent anions and cations using all solid-state contact PVC membrane anion and cation-selective electrodes as detectors in single column ion chromatography. *Talanta* 48, 967–978.
- Kläring, H.P., 2001. Strategies to control water and nutrient supplies to greenhouse crops. To review. *Agronomie* 21, 311–321.
- Legin, A., Rudnitskaya, A., Vlasov, Y., Di Natale, C., Mazzone, E., D'Amico, A., 2000. Application of electronic tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media. *Sens. Actuator B: Chem.* 65, 232–234.
- Legin, A., Makarychev, S., Kirsanov, D., Mortensen, J., Vlasov, Y., 2004. Solvent polymeric membranes based on tridodecylmethylammonium chloride studied by potentiometry and electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 514, 107–113.
- Magalhaes, J.M.C.S., Machado, A.A.S.C., 2002. Array of potentiometric sensors for the analysis of creatinine in urine samples. *Analyst* 127, 1069–1075.
- Marfà, O., 2000. Los cultivos sin suelo desde una perspectiva mediterránea. In: Marfà, O. (Ed.), *Recirculación en Cultivos sin Suelo*. Ediciones de Horticultura S.L., Reus, pp. 11–20.
- Pérez-Olmos, R., Rios, A., Fernández, J.R., Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., 2001. Construction and evaluation of ion selective electrodes for nitrate with a summing operational amplifier. Application to tobacco analysis. *Talanta* 53, 741–748.
- Savvas, D., 2002. Automated replenishment of recycled greenhouse effluents with individual nutrients in hydroponics by means of two alternative models. *Biosyst. Eng.* 83, 225–236.
- Savvas, D., Manos, G., 1999. Automated composition control of nutrient solution in closed soilless culture systems. *J. Agric. Eng. Res.* 73, 29–33.
- Shen, H., Cardwell, T.J., Catrall, R.W., 1998. The application of a chemical sensor array detector in ion chromatography for the determination of Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} in water samples. *Analyst* 123, 2181–2184.
- Tamura, H., Shono, T., Kimura, K., 1982. Coated wire sodium and potassium selective electrodes based on bis(crown ether) compounds. *Anal. Chem.* 54, 1224–1227.
- Umezawa, Y. (Ed.), 1990. *Handbook of Ion-Selective Electrodes Selectivity Coefficients*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Van den Vlekkert, H.H., Kouvenhoven, J.P.M., Van Wingerden, A.A.M., 1992. Application of ISFETs in closed-loop systems for horticulture. *Acta Hortic.* 304, 309–320.

Remote environmental monitoring employing a potentiometric electronic tongue

MANUEL GUTIÉRREZ†, JUAN MANUEL GUTIÉRREZ‡, SALVADOR ALEGRET†, LORENZO LEIJA‡, PABLO ROGELIO HERNÁNDEZ‡, LILIANA FAVARI§, ROBERTO MUÑOZ‡ and MANUEL DEL VALLE*†

†Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

‡Department of Electrical Engineering, CINVESTAV, 07360 Mexico D.F., Mexico

§External Section of Pharmacology, CINVESTAV, 07000 Mexico D.F., Mexico

(Received 6 March 2007; in final form 8 May 2007)

This work investigates the use of electronic tongues for environmental monitoring. Electronic tongues were based on arrays of potentiometric sensors plus a complex data processing by artificial neural networks and data transmission by radiofrequency. A first application, intended for a system simulating real conditions in surface water, performed a simultaneous monitoring of ammonium, potassium, sodium, chloride, and nitrate ions. The proposed system allowed us to assess the effect of natural biodegradation stages for these species. A second application was used to monitor concentrations of ammonium, potassium, and sodium in the 'Ignacio Ramírez' dam (Mexico). The electronic tongue used here allowed us to determine the content of the three cations in real water samples, although a high matrix effect was encountered for sodium determination. The implemented radio transmission worked robustly during all the experiments, thus demonstrating the viability of the proposed systems for automated remote applications.

Keywords: Electronic tongue; Environmental monitoring; Sensor array; Potentiometric sensors; Artificial neural networks

1. Introduction

Environmental security and monitoring of natural water is a salient issue worldwide. Much attention has been focused on controlling the purity of natural waters, especially near possible contamination sites. Rapid determination of pollutants and other species penetrating into the environment is necessary for adequate measures to restrict

*Corresponding author. Fax: +34-93-5812379. Email: manel.delvalle@uab.es

environmental damages. Available laboratory methods for water analysis determine a wide range of components with a high precision, but most of them need complex sample pretreatments and are also rather expensive, e.g. ionic and high-performance liquid chromatography, spectroscopy, photometry, etc. [1–3]. To obtain on-line and real-time information about actual changes in water composition, automatic systems for on-site analysis are highly valuable. Besides, the measuring principles of these systems must be robust and sensitive enough, and with a broad selectivity. This is because target environmental sites, i.e. surface, ground, waste, and sewage water, etc., may present a broadly varied spectra of inorganic as well as organic compounds, microorganisms, etc.

One promising direction for natural water monitoring is the application of multisensor systems; these can be based on arrays of non-specific sensors combined with data processing of their complex signals using advanced chemometrical tools. This approach is named the electronic tongue [4]. The sensor array approach uses the advantages of chemical sensors such as speed of response, low cost of analysis, and on-site analysis possibility with a relatively simple measuring setup. Also, by using a sensor array, it is possible to enlarge the number of species that can be determined simultaneously [5]. In this field, electronic tongues based on voltammetric sensor arrays have been developed to detect annoyances in the quality of drinking water applying the principal-component analysis (PCA) [6] and to monitor on-line industrial processes [7]. In the same way, electronic tongues have been described based on arrays of chalcogenide glass potentiometric sensors plus conventional electrodes such as chloride-, sodium- and potassium-selective sensors that were combined with a pattern-recognition routine. The chalcogenide sensors showed cross-sensitivity applicable to the measurement of metal ions in river water and were suggested for environmental- and process-monitoring purposes [8, 9]. This type of potentiometric electronic tongue was also combined with sensors based on polyvinyl chloride (PVC) membranes for the measurement of different ionic species in model solutions of groundwater [10]. In our previous experience, all-solid-state potentiometric sensors based on polymeric membranes were used for the simultaneous quantification of alkaline ions in river and waste waters using a multilayer artificial neural network (ANN) model [11, 12].

The aim of the present work has been the development, application, and testing of different electronic tongues, based on potentiometric sensors and ANN models, for environmental monitoring purposes. The used sensors are based on PVC membranes that provide a cross-response to various species in solution. The ANN is a multivariate calibration tool that can extract analytical data to quantify target analytes contained on these cross-signals. Two different applications have been considered. In the former, a Continuous Stirred-Tank Reactor (CSTR) with a simulated surface water background was inoculated with natural microorganisms to imitate natural biodegradation conditions. The purpose was the simultaneous monitoring of ammonium, potassium, sodium, chloride, and nitrate when a perturbation occurred; in this case, the addition of a concentrated liquid fertilizer. In the latter, an electronic tongue was optimized for on-site determination of ammonium, potassium, and sodium in the 'Ignacio Ramírez' dam (Mexico). Special attention was paid in compensating for temperature effects and response drifts. In all cases, the possibility of a wireless connection has been explored. A digital radio link was used between the monitoring site and the PC, where the data were processed and stored. Both applications were useful for examining the

applicability of an electronic tongue as an automatic remote measurement system that is currently under development.

2. Experimental

2.1 Reagents and solutions

The ion-selective PVC membranes were prepared from high-molecular-weight PVC (Fluka, Buchs, Switzerland), using bis(1-butylpentyl) adipate (BPA), dioctyl sebacate (DOS), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), dibutyl phthalate (DBP), and dibutyl sebacate (DBS) (all from Fluka) as plasticizers. The recognition elements employed to formulate the potentiometric membranes were the ionophores nonactin (nonactin from Streptomyces, Fluka), valinomycin (potassium ionophore I, Fluka), bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-methylmalonate (CMDMM, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) and tetradodecylamine (TDDA, hydrogen ionophore I, Fluka) plus the charged carrier tetraoctylammonium nitrate (TOAN, Fluka). Additionally, three recognition elements with generic response were used: dibenzo-18-crown-6 and lasalocide both for cations, and tetraoctylammonium bromide (TOAB) for anions (all from Fluka). All the components of the membrane were dissolved in tetrahydrofuran (THF, Fluka). Ag (Aldrich, Milwaukee, WI) of 99.9% purity and 0.5 mm thick was used to prepare an Ag/AgCl-based sensor for chloride.

The materials used to prepare the solid electrical contact were the epoxy resin components Araldite M and Hardener HR (both from Uneco, Barcelona, Spain), and graphite powder (50 μm , BDH Laboratory Supplies, Poole, UK) as a conducting filler. All other used reagents were of high purity, analytical grade, pro-analysis, or equivalent.

For the first application, a sample of water was taken from the Nespres stream, which lies in the 'Sant Llorenç del Munt' Natural Park in Barcelona (Spain). The sample was taken at 'Mura' town 450 m above sea level. During this application, a liquid fertilizer with guano (Compo, Barcelona, Spain) was also used.

For the second application, real sample waters were obtained from 'Ignacio Ramírez' dam, a eutrophic reservoir that lies in the 'Lerma-Chapala' system in Mexico at 99° 46' 25" W, 19° 27' 35", 2548 m above sea level. These samples were taken at five different points of the dam.

2.2 Sensor arrays

The sensors used were all-solid-state ion-selective electrodes (ISEs) with a solid electrical contact made from a conductive epoxy composite. This is the usual configuration in our laboratories [11, 13]. The PVC membranes were formed by solvent-casting the sensor cocktail dissolved in THF. The formulation of the different membranes used is outlined in table 1.

In the first application, the sensor array used comprised 11 sensors altogether: two ion-selective electrodes for ammonium, two for potassium, two for sodium, two of a generic response to alkaline ions (one of each type: Generic 1 and Generic 2), one for nitrate, and one of a generic response to anions employing TOAB (Generic 3). One chloride electrode based on Ag/AgCl was included to complete the array.

Table 1. Formulation of the ion-selective membranes employed in the construction of the potentiometric sensor array.

Sensor	PVC (%)	Plasticizer (%)	Recognition element (%)	Reference
NH ₄ ⁺	33	BPA (66)	Nonactin (1)	[14]
K ⁺	30	DOS (66)	Valinomycin (3) ^a	[15]
Na ⁺	22	NPOE (70)	CMDMM (6) ^a	[16]
H ⁺	32.8	DOS (65.6)	TDDA (1) ^a	[17]
NO ₃ ⁻	30	DBP (67)	TOAN (3)	[18]
Generic 1	29	DOS (67)	Dibenzo-18-crown-6 (4)	[19]
Generic 2	27	DBS (70)	Lasalocide (3)	[20]
Generic 3	29	DBP (65)	TOAB (4)	[21]

^aThe formulation includes potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate as additive.

This chloride sensor was formed by AgCl electrodeposition on a disc of Ag, 5 mm in diameter. To obtain a homogeneous deposition, 0.1 mA was passed through the hydrolysis cell containing 0.1 M NaCl, for 1 h, using an Autolab PGSTAT (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands). The sensors for anions could not be duplicated because the data acquisition system had 11 channels.

The sensor array in the second application was a simplification of the previous one, in which only cations were considered. Therefore, the sensor array used comprised two sensors for each cation: ammonium, potassium, and sodium, plus two generic membrane formulations based on dibenzo-18-crown-6 and one additional ion-selective electrode for hydrogen ion, making nine sensors altogether.

2.3 Apparatus

Potentiometric measurements were performed with an electronic system developed in the laboratory. Each channel had a conditioning stage using an INA116 (Texas Instruments, Dallas, TX) instrumentation amplifier for adapting the impedance of each sensor. Measurements were differential *versus* the reference electrode (double junction Ag/AgCl electrode, Orion Model 90-02-00 Waltham, MA) and grounded with an extra connection in contact with the solution through a stainless steel wire. All channels were noise-shielded with their signal guard, and the outputs of each amplifier were filtered with a second-order active low-pass filter with -3 dB, 2-Hz cutoff frequency, using a UAF42 (Texas Instruments) universal filter. These filtered outputs were connected to a MPC506 (Texas Instruments) 16-channel analogue multiplexer. Digitalization was performed by an ADS7804 (Texas Instruments) analogue-to-digital converter. The complete data-acquisition system was controlled using an AT90S8515 (Atmel, San José, CA) microcontroller which also supplied the RS-232-C serial communication. This microcontroller was programmed making use of the interface ImageCraft Development Tools that employed language C. The program's main task was the multiplexer's control that selects each channel, the data acquisition with the analogue-to-digital converter and the transmission/reception of words as much of control as of data. Figure 1 depicts these interconnections in detail.

For telemetry tests, the physical communication channel was replaced with a pair of wireless radio modems (Data-Linc Group, Bellevue, WA), model SRM6100, operating in a 2.4–2.4835 GHz licence-free band employing advanced spectrum

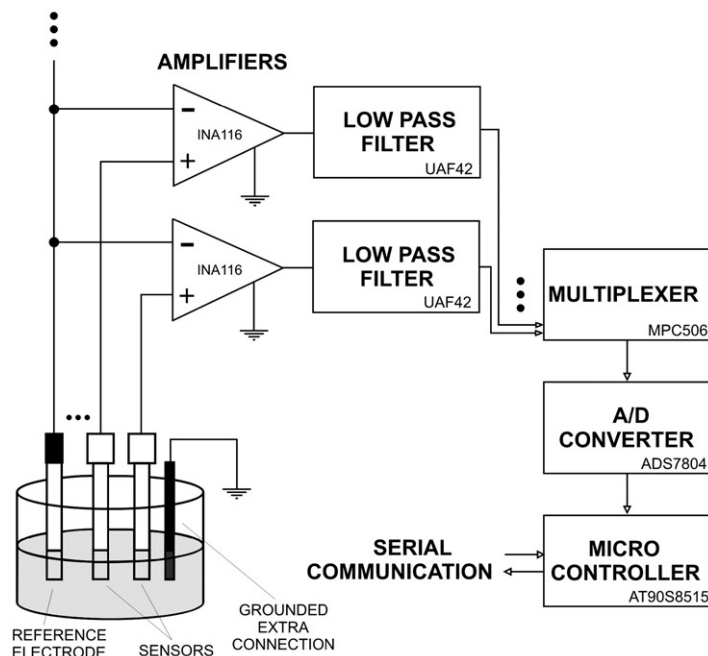


Figure 1. Block diagram of the interconnections of the used electronic system.

frequency hopping and error-detection technology. To obtain the best communication performance, a data transmission rate of 57,600 bauds was used. This speed of transmission allowed a distance of up to 15 miles to be reached under optimal conditions with line-of-sight between radios, according to the manufacturer. A peristaltic pump (Gilson Minipuls 2, Villiers-le-Bel, France) of four channels was used for the first application.

2.4 Training and measurement procedure

Before any application, the response of the system had to be assessed employing an ANN model. Measurements for training were done with solutions with a defined background. In order to compensate for the matrix effect, the background has to be as similar as possible to the real matrix, and so a different training process was done for each application of the electronic tongue. For the CSTR application, the background was a solution prepared in the laboratory with controlled amounts of each considered ion in water. For the second application, we used a 1/3 (v/v) mixture of water from 'Ignacio Ramírez' dam and Milli-Q water (Millipore, Billerica, MA) instead of generating it in the laboratory because of the complexity of the environmental samples.

Once the background was defined, different mixtures were prepared by additions of standard solutions of the different considered ions according to a statistical experimental design [22]. For the first application, 27 solutions were defined from a fractional factorial design with three levels of concentration and five factors (the five considered ions, 3^{5-2}). For the second application, 27 solutions were also defined from a complete factorial design with three levels of concentration and three factors

Table 2. Ranges of variation of the concentration of the analytes in the solutions used for the training process.

Species	First application (M)	Second application (M)
Ammonium	$5.3 \times 10^{-4} - 0.015$	$7.3 \times 10^{-6} - 9.7 \times 10^{-4}$
Potassium	$2.0 \times 10^{-3} - 0.015$	$3.8 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-3}$
Sodium	$5.0 \times 10^{-4} - 0.015$	$3.4 \times 10^{-3} - 0.015$
Chloride	$6.0 \times 10^{-4} - 0.015$	–
Nitrate	$2.7 \times 10^{-3} - 0.015$	–

(the three considered ions, 3^3). The ranges of variation of the concentration for the analytes in these solutions are summarized in table 2. For both applications, the different levels of ion concentration were defined taking into consideration the variability of the real samples in each case and the complexity of the training space. For the first application, these ranges of variation were chosen arbitrarily but taking into account that the concentrations could increase in several decades for some ions, since the fertilizer is highly concentrated. For the second application, the concentrations of ammonium, potassium, and sodium ions in the studied dam and their variations defined the different levels of concentration in the experimental design [23].

In order to correct the possible drifts, the inputs in the neural network were relative measurements of each sensor with respect to a reference solution periodically checked. We also included as inputs the solution temperature in order to compensate any influence in the response of these potentiometric sensors. A laboratory-made temperature probe based on an LM35 integrated circuit (National Semiconductor, Santa Clara, CA) was employed together with the array of electrodes.

For the proper verification of the electronic tongue performance, a set of solutions was used, the test set, which does not participate in the training process. The test set was formed by 10 synthetic solutions prepared in the same way but with concentrations generated randomly inside the training space.

These 37 prepared solutions, 27 for training and 10 for testing, were measured in three turns for the CSTR application; one with all the solutions at room temperature (around 24°C), another with half of the solutions at lower temperature (around 10°C) and the third with the other half at a higher temperature (around 35°C). For the second application, all the solutions were measured at these three levels of temperature.

2.5 Software

The ANNs tested were trained and evaluated using the routines available to the Neural Network Toolbox v. 4.0, which are optional add-ons in the Matlab v.6.1 (Maths Works, Inc. Natick, MA) environment. Sensor readings were acquired on the PC using custom software written in Visual Basic (Microsoft, Seattle, WA). The experimental data were fitted to a negative exponential function, used in the first application, with Sigmaplot 8.0 (SPSS Inc. Chicago, IL).

2.6 First application: the CSTR

The first application of the electronic tongue involved monitoring a CSTR by modelling the concentration of ammonium, potassium, sodium, chloride, and nitrate,

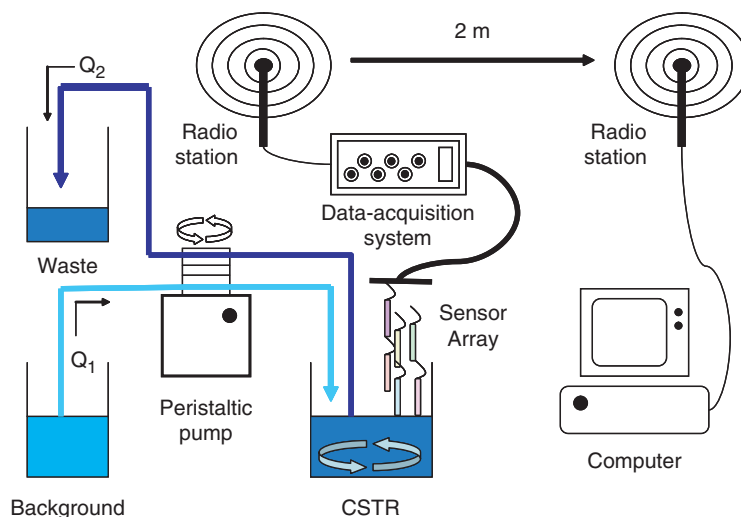


Figure 2. Block diagram of the proposed manifold for monitoring the concentration of ammonium, potassium, sodium, chloride, and nitrate in a CSTR.

when a volume of concentrated guano fertilizer was added to a controlled background. Figure 2 depicts the whole system.

The selected steady-state working conditions used an input flow rate (Q_1) equal to the output flow rate (Q_2), and consequently the volume of the tank did not change. With these conditions, the equation that relates the concentration of the species inside the reactor to time is a negative exponential function (equation (1)):

$$C(t) = C_0 \exp\left(-\frac{Q}{V}t\right), \quad (1)$$

where $C(t)$ is the concentration in time t , C_0 is the initial concentration, Q is the flow rate, and V is the volume of the tank. $\tau = V/Q$ is the time constant for the system. Under the assumption of perfect mixing, this time constant is the mean residence time.

In the proposed system, the volume of the tank was 1.5 L, and it was full of background solution at the beginning. The flow rate was controlled by a peristaltic pump and was fixed to 1.0 mL min^{-1} , each channel. Consequently, the residence time for this CSTR (τ) was 1.04 days. The tank was inoculated with 10 mL of water from the Nespres stream to imitate the real biodegradation conditions in a surface water. When it passed 1 h, approximately, 15 mL of the liquid fertilizer was added into the tank, and one measurement per sensor was done every 20 min. These readings, once amplified and filtered, were transmitted to the computer using the radio link. The system was left in continuous operation for more than 3 days, which served to validate the different parts of the monitoring system.

2.7 Second application: 'Ignacio Ramírez' dam

The second application of the electronic tongue involved the simultaneous monitoring of the concentration of ammonium, potassium, and sodium in the

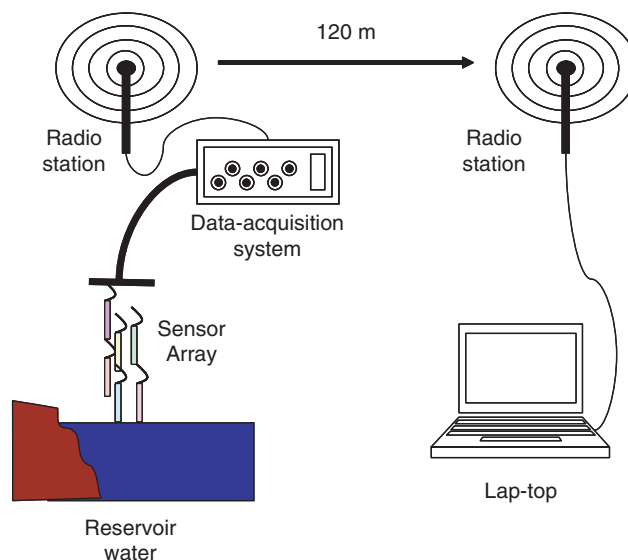


Figure 3. Block diagram of the proposed manifold for monitoring the concentration of ammonium, potassium, and sodium in 'Ignacio Ramirez' reservoir.

'Ignacio Ramírez' dam. This reservoir is about 500 km² area with fluctuating water levels. The dam was built in 1964 on 'La Gavia' river, State of Mexico. It is located in a rural, livestock, and agricultural zone. The rates of soil erosion are high and excessive sediments run off into the water. In addition, the climate is temperate and subhumid, with summer rains from July to September [23].

The electronic tongue system was validated before the on-site application with a set of real water samples collected from five different points of the dam. Once filtered, different dilutions of these samples with Milli-Q water were processed by the system. Results were compared with their composition determined by reference methods of widespread use: ammonium was determined by the Nessler reaction, and potassium and sodium were quantified by atomic absorption spectroscopy. Once the applicability of the system in real samples was demonstrated, the on-site monitoring was done, as depicted in figure 3. Sensor readings were taken every minute for 2 h. The laptop computer was sited 120 m from the point of monitoring, and the data were transmitted by the radio link.

3. Results and discussion

3.1 Building of the ANN models

Selecting the topology of an ANN is a first obstacle, because of the difficulty in predicting an optimum configuration in advance. The ANN structure for the best modelling of a sensor array is obtained by a trial-and-error procedure. This process

includes a combination of the number of neurons of the hidden layer and the transference function used within. These characteristics will define the specific combination leading to the best modelling ability [24].

We initially fixed the following parameters, which were common for the two optimized ANNs models: a linear transfer function of the output layer (*purelin*) and a single hidden layer of neurons; these selections are based on previous experience with electronic tongues using potentiometric sensors [25]. The learning strategy used was Bayesian Regularization and employed for its internal parameters, a learning rate of 0.1 and a momentum of 0.4 selected from preliminary tests. The modelling capacity of the ANN was examined in terms of the root mean squared error (RMSE).

When compared with others, the strategy selected for the learning process (Bayesian Regularization) provided a better RMSE value, a greater consistency between the predicted and obtained values for the training, and a higher significance for the external test set. Besides, an internal validation subset of samples was not necessary, as it avoids overfitting by other means [26]. Considering the non-linear behaviour of the sensors, two different non-linear transfer functions were considered for the hidden layer, a sigma-shaped function named the *tansig* function [27] and a logistic function represented by the *logsig* function.

3.1.1 ANN model for the CSTR. For this case, the ANN model had 12 input neurons (11 sensors from the array plus the temperature) and five output neurons (the five modelled analytes). After the systematic evaluation of configurations, the best training results were obtained with the *tansig* function and five neurons in the hidden layer; these conditions provided a RMSE value of 0.00575 M for the external test set, those samples not intervening in training. Figure 4 illustrates the global behaviour of the modelling system for the external test set, displaying the obtained values for ammonium, potassium, sodium, chloride, and nitrate ions. The figure compares predicted *versus* expected concentrations. Predictions were good for the individual ions and for their mixtures. The figure also shows the linear regression results for the five individual species. The accuracy of the obtained response approached ideality, with unity slopes and zero intercepts, in the external test set (all confidence intervals were calculated at the 95% confidence level). For chloride, the confidence interval of the slope did not include unity, but a good regression coefficient was obtained as well as a zero intercept. Especially good results were obtained for ammonium and sodium ions, with experimental lines practically superimposed on the theoretical ones.

3.1.2 ANN model for the ‘Ignacio Ramírez’ dam. For the ANN model in this case, the number of input neurons was 10 (nine sensors from the array plus the temperature), and the number of output neurons was three (the three considered cations). Again, among the different configurations, the best results were obtained with the *tansig* function and nine neurons in the hidden layer, which provided RMSE = 0.0014 M for the test set. Figure 5 shows the behaviour of the optimized model for the external test set ammonium, potassium, and sodium concentrations. The linear regression results between predicted and expected values for the test set are also shown. All confidence

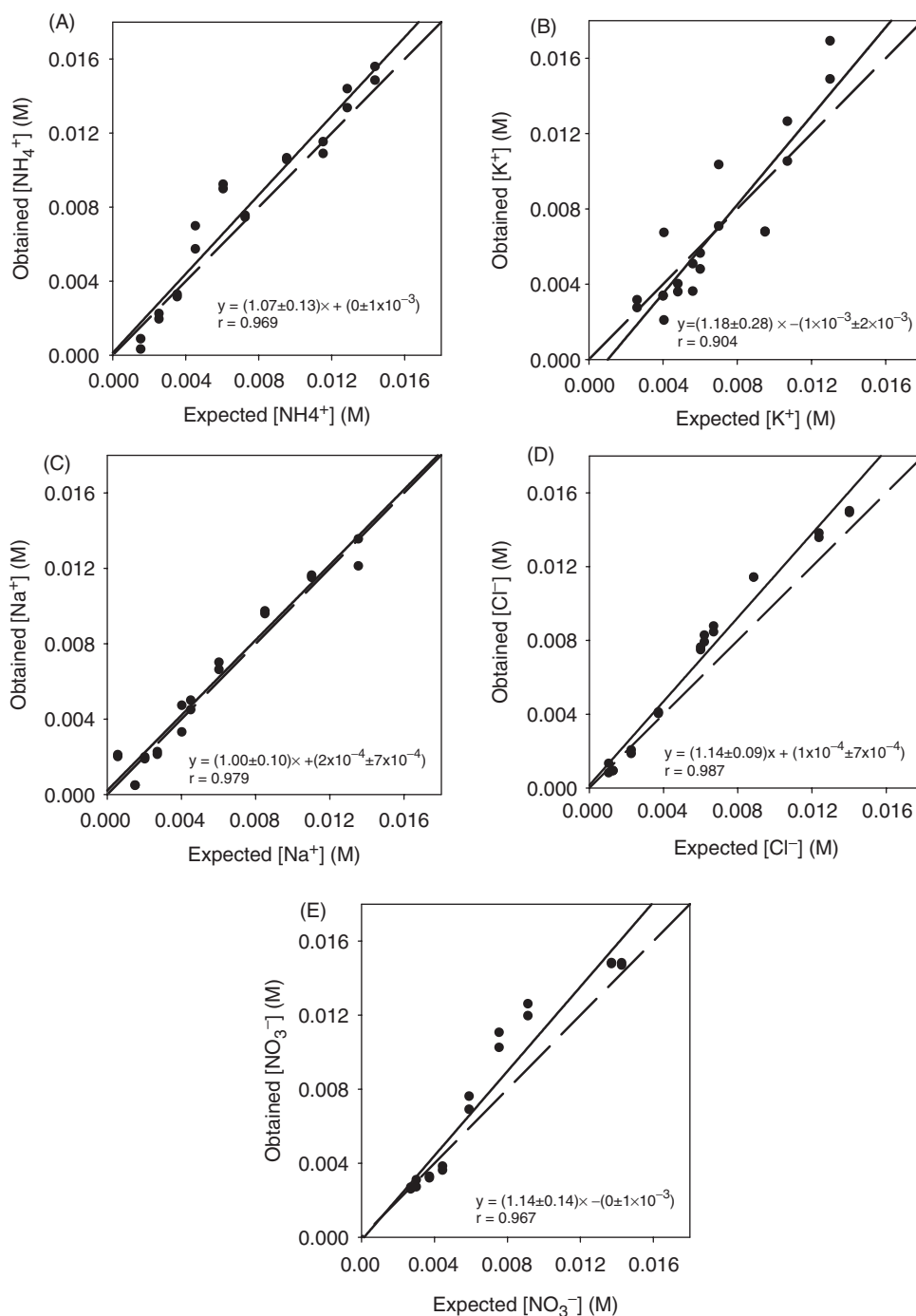


Figure 4. Modelling performance achieved for the optimized ANN with the samples of the external test set: (A) ammonium, (B) potassium, (C) sodium, (D) chloride, and (E) nitrate, for the CSTR application. The dashed line corresponds to ideality, and the solid line is the regression of the comparison data. Each sample was processed twice at three different temperatures.

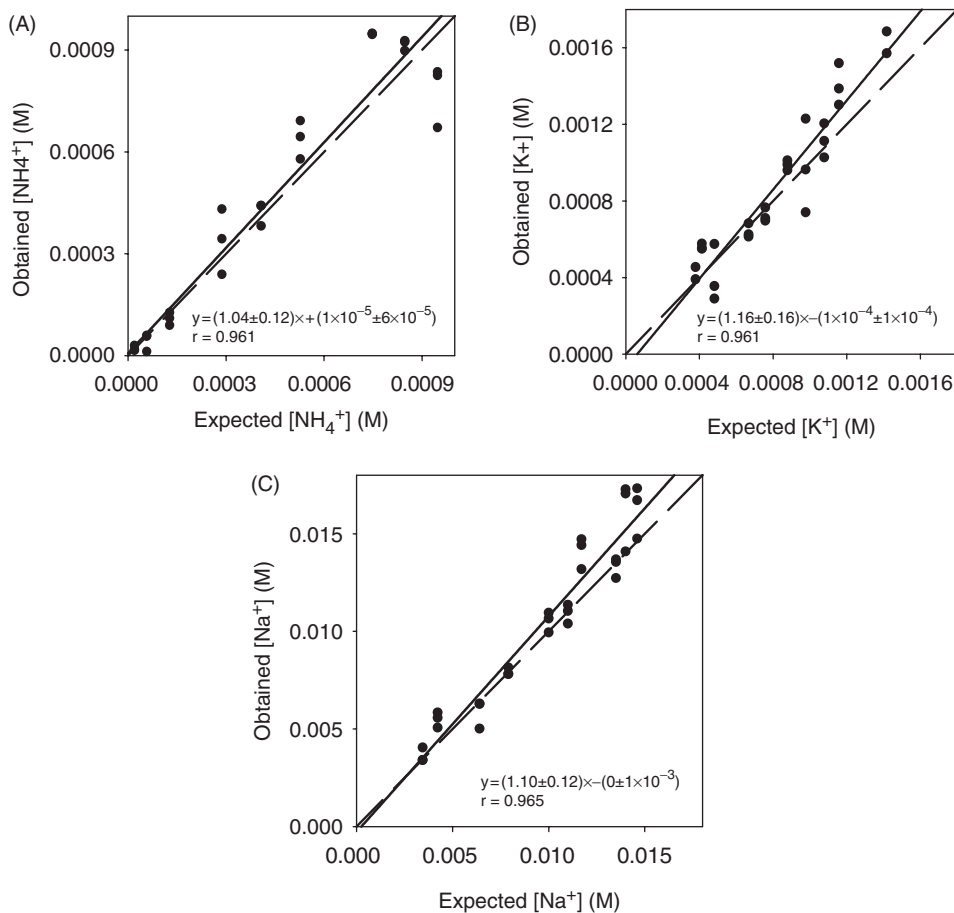


Figure 5. Modelling performance achieved for the optimized ANN with the samples of the external test set: (A) ammonium, (B) potassium, and (C) sodium, for the dam application. The dashed line corresponds to ideality, and the solid line is the regression of the comparison data. Each sample was processed three times at three different temperatures.

intervals included unity slopes and zero intercepts at the 95% confidence level for the three considered ions.

3.2 First application: the CSTR

With the previously optimized ANN, the primary data were turned into analytical information. The concentrations of ammonium, potassium, sodium, chloride and nitrate, once the fertilizer was added, were continuously monitored for more than 3 days, from which the first 24 h were analysed in more detail. Figure 6 represents this detailed period of the experiment, where the concentrations of the considered ions predicted by the electronic tongue, together with the solution temperature, are shown.

The results demonstrate that the electronic tongue corrected the temperature effect, as observed by the smooth variation of concentrations. The figure shows that ammonium, more affected by biodegradation, disappears more quickly than the other

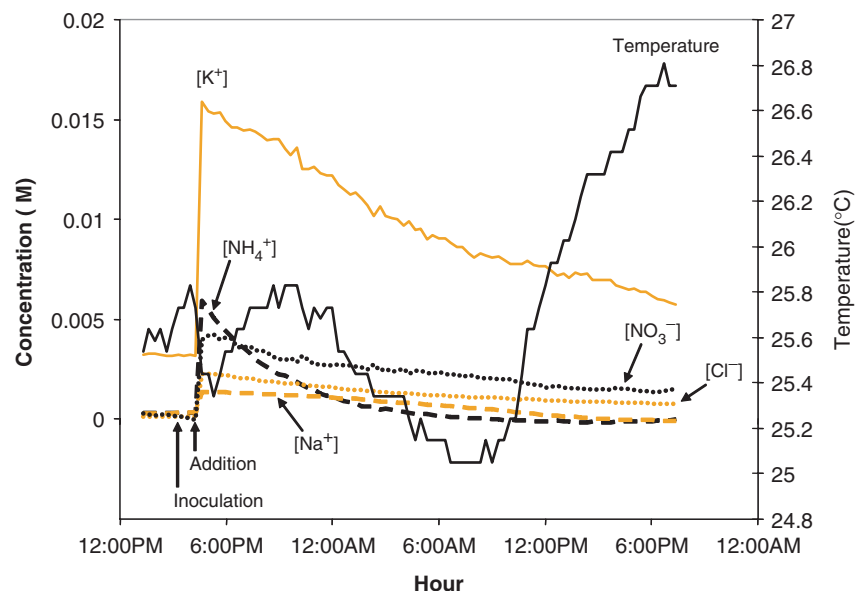


Figure 6. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue for the considered ions: ammonium, potassium, sodium, chloride, and nitrate, in the CSTR during 24 h continuous monitoring. The variation of temperature according to the cycle of day and night is observed (experiment carried out in the summer).

Table 3. Residence time values for the five considered ions obtained from the fitting of the experimental data at the 95% confidence level.

Analyte	Residence time (days)	Regression coefficient
Ammonium	0.170 ± 0.004	0.999
Potassium	1.08 ± 0.03	0.994
Sodium	0.62 ± 0.05	0.935
Chloride	0.99 ± 0.02	0.995
Nitrate	1.02 ± 0.02	0.984

species that display equivalent behaviour. In fact, the fitting of these experimental curves to equation (1) yielded the residence time values summarized on table 3.

For chloride, nitrate, and potassium, their τ is indistinguishable from the fixed residence time of the system (1.04 days), demonstrating that these ions experience only the typical dilution of the CSTR. Sodium has a lower residence time, a worse regression coefficient, and a worse error. This effect can be caused by loss or adsorption of sodium ions on the glass walls of the tank or by the fact that the sodium concentration is the lowest during all the experiment, and it is considerably affected by determination uncertainty. Ammonium has a clear diminished time constant, demonstrating that a biochemical reaction is occurring inside the CSTR depleting ammonium. Considering that ammonium is the unique controlled substance that can be oxidized, this behaviour can be a consequence of the natural biodegradation by the environmental microorganisms that were introduced in the tank.

Table 4. Relative errors obtained of the logarithm of the concentration of the three ions in real water samples from 'Ignacio Ramirez' dam^a.

Sample	Relative error (%) NH ₄ ⁺	Relative error (%) K ⁺	Relative error (%) Na ⁺
1	-1.6	-7.9	-10.7
2	0.2	-2.6	-8.5
3	-2.2	-2.0	-11.2
4	-1.4	-1.2	-3.5
5	12.9	-4.7	-9.7
6	-2.2	-2.1	-7.9
7	7.3	-1.1	-12.0
8	11.9	-0.4	-3.6
9	1.2	-8.9	-11.0
10	-2.2	-2.6	-8.1
11	-2.2	-3.2	-11.4
12	-5.9	-2.3	-3.3
Mean relative error (%)	4.3	3.2	8.4

^aThe RSD obtained for the determination of the reference value of ammonium was between 0.8 and 1.25%, and for potassium and sodium, between 0.2 and 1.5%.

3.3 Second application: 'Ignacio Ramirez' dam

In this second application, the proposed system was first applied to real samples from the 'Ignacio Ramirez' dam. The predicted relative errors of the logarithm of the concentration of the three ions are summarized on table 4 and show that the errors are in specific cases higher than 10%, although lower on average. For example, we obtained a mean relative error of 3.2% in the determination of potassium. All the obtained errors for sodium and potassium were negative because of the influence of the matrix, which is highly saline and specially complex in this reservoir. The concentrations predicted by the electronic tongue were slightly lower than those obtained by reference methods. This effect especially affects the determination of sodium, the more concentrated species, since a mean relative error of 8.4% was obtained.

Once the system was validated with real samples, the concentration of ammonium, potassium, and sodium was continuously monitored on-site for 2 h approximately. Figure 7 shows the concentration of the considered ions that was predicted by the electronic tongue, together with the recorded dam water temperature.

Sudden changes in temperature, observed in the graphics, were caused by the periodic measurement of the reference solution, which was at a higher temperature. Nevertheless, the system is able to correct the effect of these temperature changes, given that alterations in the calculated concentrations of the three ions were not observed. The predicted concentration of sodium was around 0.006 M; for potassium, the obtained concentration was around 0.001 M with a slight trend to decrease, while the ammonium concentration was between 1.5×10^{-5} and 4×10^{-5} M. The predictions of the content in ammonium and potassium were close to the concentrations determined by reference techniques for the real samples. However, the concentration for sodium determined by the electronic tongue was lower. As we have explained before, the matrix effect was especially strong for sodium, although its presence was correctly counterbalanced for the calculation of ammonium and potassium employing the ANN model.

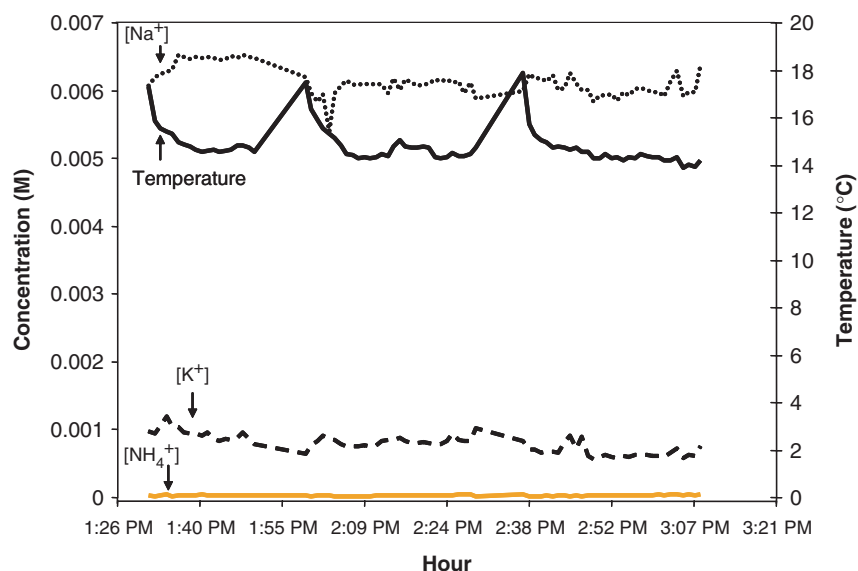


Figure 7. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue for the cations considered: ammonium, potassium, and sodium, during the application in the 'Ignacio Ramírez' dam. The water temperature is also represented.

4. Conclusions

Two different electronic tongue systems have been developed and optimized for environmental monitoring applications using potentiometric sensors and ANN models: one, to monitor the concentration of ammonium, potassium, sodium, chloride, and nitrate inside a CSTR that imitates real biodegradation conditions in surface waters; the second to monitor the concentration of ammonium, potassium, and sodium in the 'Ignacio Ramírez' dam (Mexico). For the first application, it has been demonstrated that the electronic tongue approach allows us to monitor accurately the dilution of the five considered ions, as well as the effect of the natural biodegradation. For the second application, the results show that the proposed electronic tongue allows us to determine the content of ammonium, potassium, and sodium in real water samples from the studied dam, but the calculated concentration of sodium is lower than that obtained by reference methods because of the high matrix effect. One alternative to correct this effect would be to increase the number of sensors used in the array, incorporating new species not considered until now. In any case, the two systems are able to compensate for natural temperature variations by incorporating the solution temperature as input in the ANN model. Although the two considered experiments show a measuring time of several hours, in previous works we have checked that the applicability of the numerical model, in terms of aging of the electrodes, for a system like this is longer than one month [28]. The radio link used here demonstrated a robust operation, so we can conclude that systems such as that studied here can be applied to automatic wireless monitoring for environmental applications.

Acknowledgements

This work was supported by Spain's Ministry of Education, Science and Sport, MECD (Madrid) through the project CTQ2004-08134, by CONACYT (Mexico) through the project 43553 and by the Department of Innovation, Universities and Enterprise (DIUE) from the Generalitat de Catalunya.

References

- [1] C. Minoia, S. Caroli (Eds). *Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, Part 1, Water, Food, Environmental*, p. 702, Pergamon, Oxford (1992).
- [2] D. Perez-Benito, S. Rubio (Eds). *Environmental Analytical Chemistry*, p. 876, Elsevier, New York (1998).
- [3] P.R. Haddad, P.E. Jackson (Eds). *Ion Chromatography, Principles and Applications*, p. 776, Elsevier, New York (1990).
- [4] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'Amico. *Pure Appl. Chem.*, **77**, 1965 (2005).
- [5] P. Ciosek, Z. Brzózka, W. Wróblewski, E. Martinelli, C. Di Natale, A. D'Amico. *Talanta*, **67**, 590 (2005).
- [6] C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winquist, I. Lundström. *Anal. Chim. Acta*, **426**, 217 (2001).
- [7] F. Winquist, R. Bjorklund, C. Krantz-Rülcker, I. Lundström, K. Östergren, T. Skoglund. *Sens. Actuator B*, **111–112**, 299 (2005).
- [8] A. Legin, Y. Vlasov, A. Rudnitskaya, E.A. Bychkov. *Sens. Actuator B*, **34**, 456 (1996).
- [9] C. Di Natale, A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, A. Legin, Y. Vlasov, A. Rudnitskaya, B. Selezenev. *Sens. Actuator B*, **44**, 423 (1997).
- [10] A. Rudnitskaya, A. Ehlert, A. Legin, Yu. Vlasov, S. Büttgenbach. *Talanta*, **55**, 425 (2001).
- [11] J. Gallardo, S. Alegret, M.A. De Román, R. Muñoz, P.R. Hernández, L. Leija, M. del Valle. *Anal. Lett.*, **36**, 2893 (2003).
- [12] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle. *Electroanalysis*, **17**, 348 (2005).
- [13] S. Alegret, E. Martínez-Fábregas. *Biosensors*, **4**, 287 (1989).
- [14] O.G. Davies, G.J. Moody, J.D.R. Thomas. *Analyst*, **113**, 497 (1988).
- [15] H. Shen, T.J. Cardwell, R.W. Catrall. *Analyst*, **123**, 2181 (1998).
- [16] H. Tamura, T. Shono, K. Kimura. *Anal. Chem.*, **54**, 1224 (1982).
- [17] P. Schulthess, Y. Shijo, H.V. Pham, E. Prestch, D. Ammann, W. Simon. *Anal. Chim. Acta*, **131**, 111 (1981).
- [18] R. Pérez-Olmos, A. Rios, J.R. Fernández, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima. *Talanta*, **53**, 741 (2001).
- [19] Y. Umezawa (Ed.). *Handbook of Ion-Selective Electrodes Selectivity Coefficients*, CRC Press, Boca Raton, FL (1990).
- [20] K. Suzuki, K. Tohda, H. Aruga, M. Matsuzoe, H. Inoue, T. Shirai. *Anal. Chem.*, **60**, 1714 (1988).
- [21] I. Isildak, A. Asan. *Talanta*, **48**, 967 (1999).
- [22] J.M.C.S. Magalhaes, A.A.S.C. Machado. *Analyst*, **127**, 1069 (2002).
- [23] L. Favari, E. López, L. Martínez-Tabche, E. Díaz-Pardo. *Ecotox. Environ. Saf.*, **51**, 177 (2002).
- [24] M. Bos, A. Bos, W.E. Van der Linden. *Analyst*, **118**, 323 (1993).
- [25] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. De Román, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle. *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 248 (2003).
- [26] H. Demuth, M. Beale (Eds). *Neural Network Toolbox User's Guide*, MathWorks, Natick, MA (1992).
- [27] J.A. Freeman, D.M. Skapura (Eds). *Neural Networks, Algorithms, Applications, and Programming Techniques*, Addison-Wesley, Reading, MA (1991).
- [28] M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle. *Comput. Electron. Agric.*, **57**, 12 (2007).



Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples

Manuel Gutiérrez, Salvador Alegret, Manel del Valle*

Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

Received 13 April 2007; received in revised form 17 August 2007; accepted 31 August 2007

Available online 6 September 2007

Abstract

Urea and creatinine biosensors based on urease and creatinine deiminase, respectively, covalently immobilized onto ammonium selective electrodes, were included in an array together with sensors sensitive to ammonium, potassium and sodium. Generic sensors to alkaline ions were also included. All the sensors used were of all-solid-state type, employing polymeric membranes and having rather nonspecific response characteristics. A response model based on artificial neural networks was built and tested for the simultaneous determination of urea, creatinine, ammonium, potassium and sodium. The results show that it is possible to obtain a good multivariate calibration model. In this way, the developed bioelectronic tongue was successfully applied to multidetermination of the five species in raw and spiked urine samples. Predicted concentrations showed a good agreement with reference methods of analysis, allowing a simple direct method for determining urea and creatinine in real samples. At the same time, this method permitted to obtain the concentrations of the alkaline interferences (endogenous ammonium, potassium and sodium) without the need of eliminating them.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Biosensor array; Potentiometric electronic tongue; Urea; Creatinine; Artificial neural networks

1. Introduction

As urea is the main and final product of protein metabolism, its levels often provide information on the nutritional status in a body system. Creatinine, produced from phosphocreatine and creatine, is a marker of an amino acid pool and its generation reflects slow turnover of muscle protein. These two final metabolites are recognized as markers of a wide spectrum of low- and intermediate-molecular mass toxic solutes accumulated in the blood of patients with diminished renal function (Henry et al., 1974). In fact, the majority of clinical laboratory tests used to assess kidney function are related to the measurement of the kidney's ability to clear waste products, usually nitrogenous compounds like urea and creatinine, from the body. Therefore, it is common to detect urea and creatinine in serum samples (Taylor, 1989). However, it is also known that an advanced renal failure would occur before a significant increase in concentration of any of these substances is detected in blood. To diagnose

earlier stages of kidney disease, clearance of urea and creatinine by the kidney must be evaluated. This parameter is defined as the ratio between the total quantity of the substance excreted in the urine over 24 h, and the concentration of the substance in serum. The normal values of urea clearance are between 64 and 99 ml/min, and for creatinine clearance, between 78 and 117 ml/min, depending on age and sex. Thus, it is necessary to perform multiple analysis of urea and creatinine before diagnosing the different dysfunctions of the patients (Burtis and Ashwood, 1994).

Determinations of urea and creatinine in human fluids are facilitated by using enzymatic methods of analysis and/or biosensors. Determination of urea usually employs the enzyme urease, which converts the analyte into ionic products: $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^-$. For their detection, different working principles (e.g. conductometry (Lee et al., 2000), potentiometry (Koncki et al., 2000), spectrophotometry (Kovács et al., 2003)) are applied. In conventional potentiometric urea biosensors, pH electrodes or ammonium-selective electrodes are used to detect pH variations or ammonium ions, respectively, which are produced in the enzymatic hydrolysis reaction. A major problem for pH-sensitive biosensors is that

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5811017; fax: +34 93 5812379.
E-mail address: manel.delvalle@uab.es (M. del Valle).

the response is strongly dependent on the buffer capacity of the sample. The pH change produced in the course of the enzyme-catalysed reaction is suppressed by the buffer, which leads to a narrow dynamic range and a loss in sensor sensitivity (Ruzicka et al., 1979; Gutiérrez et al., 2007a). All-solid-state nonactin-based ammonium ion-selective electrodes (ISEs) are among the most adequate transducers for the development of potentiometric urea biosensors, due to their fast and reproducible response (Alegret and Martínez-Fábregas, 1989; Gallardo et al., 2003a) and their long lifetime, up to 12 months (Rosario et al., 1990; Gutiérrez et al., 2007b).

On the other hand, the development of creatinine biosensors has followed two paths: systems are based on either potentiometric or amperometric detection. Nearly all amperometric creatinine biosensors are based on a three-enzyme system (creatinine amidohydrolase/creatinine amidinohydrolase/sarcosine oxidase). The need to apply more than one enzymatic reaction is for minimizing interferences. This multi-enzyme system catalyses the sequential conversion of creatinine to glycine, formaldehyde and hydrogen peroxide. The amperometric detection of enzymatically consumed oxygen or enzymatically generated hydrogen peroxide relates to the original creatinine concentration (Tombach et al., 2001). Potentiometric devices are based on hydrolysis of creatinine by creatinine iminohydrolase to generate ammonium and use of pH or ammonium transducers (Radomska et al., 2004a) as above.

Nevertheless, there are few biparametric systems reported that allow the simultaneous determination of urea and creatinine. All of them, based on enzymatic methods (Karube et al., 1984; Matsumoto et al., 1988; Rui et al., 1992; Jurkiewicz et al., 1998; Radomska et al., 2004b), need to remove the interferences before the analysis. In systems based on ammonium-transducer potentiometric biosensors, endogenous ammonium, potassium and sodium ions may interfere. Several strategies have been used to overcome these interferences: differential measurements (Koncki et al., 2000), separation by gas diffusion (Krawczynski and Krawczyk et al., 1994) or on-column ion-exchange (Radomska et al., 2004b), are the three variants found.

A bioelectronic tongue can be described as an analytical system formed by an array of biosensors with cross-sensitivity to different compounds in a solution, plus an appropriate chemometric tool for processing the multivariate data (Holmberg et al., 2004). In a previous paper (Gutiérrez et al., 2007a), we reported a bioelectronic tongue that allowed a simple direct determination of urea in real urine samples without the need of eliminating the alkaline interferences and compensating the endogenous ammonium. In this work, we present a bioelectronic tongue to analyse urine samples based on potentiometric enzyme electrodes for urea and creatinine plus selective and generic ISEs for ammonium, potassium and sodium. These biosensors and ISEs, based on PVC membranes, provide a cross-response to the different species considered. The chemometric tool used to build the multivariate response model is an artificial neural network (ANN) which is fed with the measurements from the biosensor array. The major goal of this contribution is not only to determine simultaneously urea and creatinine without any pretreatment

strategy, but also to quantify their most severe interferences, ammonium, potassium and sodium ion, being these of biological interest as well.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All reagents used were of high purity, analytical grade or equivalent. All solutions were prepared with doubly distilled water. Materials used for the preparation of the inner solid contact of the electrodes were the epoxy resin components Araldite M and HR hardener (both from Uneco, Barcelona, Spain) and graphite powder (50 μm , BDH, Poole, UK) as the conducting filler.

For the preparation of the ion-selective membranes, the ionophore, the plasticizer, the polymer and, in some cases, the ionic additive, were dissolved in tetrahydrofuran (Fluka, Buchs, Switzerland). The ionophores used were nonactin (ammonium ionophore I, Fluka), valinomycin (potassium ionophore I, Fluka), bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-methylmalonate (bis(12-crown-4), Dojindo, Kumamoto, Japan), dibenzo-18-crown-6 (Fluka) and lasalocid (Fluka). The plasticizers used were bis(1-butylpentyl)adipate (BPA), dioctylsebacate (DOS), 2-nitrophenyloctylether (NPOE) and dibutylsebacate (DBS) (all obtained from Fluka). Two different polymers were used: high molecular weight poly(vinyl chloride) (PVC, Fluka) and carboxylated PVC (PVC-COOH, Aldrich, Milwaukee, WI, USA). PVC-COOH was used for the covalent enzyme immobilization. Finally, potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KpCIPB, Fluka) was used as ionic additive.

Two enzymes were used: urease (EC 3.5.1.5, 82800 U/g, Sigma, St. Louis, MI, USA) and creatinine deiminase (EC 3.5.4.21, 12.8 U/mg, Sigma). For the covalent immobilization of these enzymes on the ammonium-selective membrane, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC, Sigma) was used.

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris, Merck, Darmstadt, Germany) buffer was used as calibration background solution.

2.2. Biosensor array

The sensors used were all-solid-state ion selective electrodes (ISEs) with a solid electrical contact made from a conductive composite. This is the usual configuration in our laboratories (Alegret and Martínez-Fábregas, 1989; Gallardo et al., 2003b). The PVC and PVC-COOH membranes were formed by solvent casting the sensor cocktail onto the solid contact. The formulation of the different membranes used is outlined in Table 1.

For enzyme immobilization, a one-step carbodiimide procedure was applied to previously casted PVC-COOH membranes. An ammonium transducer (ammonium 2 formulation) was used as the base element for the different biosensors in the array. A freshly prepared aqueous solution containing enzyme (around 700 U/ml) and EDAC (6 mg/ml) was placed on the surface of the membrane. The mixture was allowed to react for about 12 h

Table 1
Formulation of the different ion-selective membranes employed in the bioelectronic tongue

Electrode	PVC (%)	PVC–COOH (%)	Plasticizer (%)	Ionophore (%)	Additive (%)	Reference
Ammonium 1	33	–	BPA (66)	Nonactin (1)	–	Davies et al. (1988)
Ammonium 2	–	33	BPA (66)	Nonactin (1)	–	Koncki et al. (2000)
Potassium	30	–	DOS (66.7)	Valinomycin (1)	KpCIPB (0.6)	Shen et al. (1998)
Sodium	21.76	–	NPOE (70)	Bis(12-crown-4) (6)	KpCIPB (2.24)	Tamura et al. (1982)
Generic 1	29	–	DOS (67)	Dibenzo-18-crown-6 (4)	–	Umezawa (1990)
Generic 2	27	–	DBS (70)	Lasalocide (3)	–	Suzuki et al. (1988)

in a refrigerator and then the electrodes were washed in vigorously stirred Tris buffer (pH 7.5, buffer concentration 50 mM) for 2 h. When not in use, the electrodes were stored in the refrigerator in the same buffer solution (Glab et al., 1994; Koncki et al., 2000). The biosensor array used consisted of 12 electrodes altogether: two urea biosensors, two creatinine biosensors, two ion-selective electrodes for ammonium, two for potassium, two for sodium and two electrodes of generic response to alkaline ions (Generic 1 and Generic 2).

2.3. Apparatus

A model 90-02-00 (Thermo Electron, Waltham, MA, USA) double junction Ag/AgCl reference electrode with the Tris buffer solution in its outer chamber was employed for the potentiometric measurements. These were performed with the aid of a laboratory-constructed data-acquisition system. It consisted of 32 operational amplifiers (TL071, Texas Instruments, Dallas, TX, USA) in follower configuration to adapt the impedances of each sensor, as 32 input channels. Measurements were unipolar, with the reference electrode connected to ground. Each channel was noise-shielded with its signal guard. The outputs of each amplifier were filtered using a passive low-pass filter and connected to an A/D conversion card (Advantech PC-Lab 813, Taipei, Taiwan) installed into a Pentium PC. The readings were done by employing a custom designed software which was programmed with QuickBASIC 4.5 (Microsoft, Seattle, WA, USA).

2.4. Calibration and measurement procedure

In previous investigations highly stable, sensitive and fast-responding urea biosensors based on ammonium transducer were developed and integrated in a bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples (Gutiérrez et al., 2007a). In the present work, creatinine biosensors based also on ammonium transducer were evaluated for the bioelectronic tongue application. The response characteristics were studied by checking creatinine calibration curves. These calibration curves were obtained by means of the method of analyte addition: the variation of potential originated by the addition of accumulated microvolumes of stock creatinine solutions (1.0, 10 and 100 mM) in 25 mL of 50 mM, pH 7.5, Tris–HCl buffer was determined. Tris buffer was chosen because it has lower interference effect than the other buffer solutions that contain alkaline ions. These interference ions would increase the limit of detection (LD) considerably, and their concentration has to

be controlled in this work. In addition, pH 7.5 has been considered the most appropriate both for the catalytic activity of the enzyme and for the detection of ammonium ion (Gil et al., 1992). In the experiments for the determination of the response time, the method of analyte addition explained above was used and the response potentials after each addition were recorded every 1 second. Daily calibrations of the prepared biosensors in the Tris buffer allowed us to estimate their lifetime. All the experiments were made at room temperature.

Besides, the other sensors in the array (urea, ammonium, potassium, sodium and those of generic response) were calibrated to check that they presented the expected behaviour. The calibration procedure for these electrodes was the same as for creatinine biosensors, but using their corresponding primary ion (Gallardo et al., 2005).

The training of the electronic tongue was performed based on the voltage readings of the biosensor array corresponding to a set of samples defined from a statistical experimental design. The composition of the samples used to build the five-analyte response model is summarized in Table 2. The composition of the 27 solutions used for the calibration of the array was designed accordingly to a fractional factorial design with three levels and five factors (3^{5-2}). These solutions correspond to the first 27 ones in Table 2. Tris buffer was used as the background solution. The external validation set was formed by 13 additional synthetic solutions (*test-set*) with their concentrations generated randomly. As shown in Table 2, the concentration range of the five analytes vary over two orders of magnitude: urea and creatinine, from 0.1 to 10 mM, ammonium, from 0.005 to 0.5 mM, and potassium and sodium, from 0.05 to 5 mM, as defined by possible physiological levels, and which supposes an extensive training space. Considering that the main interferences for the ammonium-transducer biosensors are ammonium and potassium ions, the control of their upper limits of concentration is of extreme importance. Preliminary studies showed that the biosensors would lose response when the upper limit of ammonium concentration was increased by one order of magnitude.

The general procedure for the measurements was as follows. After the electrodes of the array were introduced in the sample and the readings of potential were acquired, the electrodes were removed from the solution and were washed with doubly distilled water and dried with smooth absorbent paper. Following this procedure, the whole set of samples in Table 2 was assayed within 180 min. The different solutions were assayed in random order to avoid any systematic error.

Table 2
Composition of solutions used to build the multivariate response model

Solution	[Urea] (mM)	[Creatinine] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)
1	0.100	3.140	0.043	1.580	1.573
2	0.481	2.760	0.100	3.287	5.000
3	0.860	2.380	0.157	5.000	3.287
4	1.242	6.580	0.214	1.383	4.810
5	1.623	6.200	0.272	3.096	3.096
6	2.004	5.820	0.329	4.810	1.383
7	2.385	10.00	0.386	1.192	2.906
8	2.765	9.620	0.440	2.906	1.192
9	3.146	9.240	0.500	4.600	4.600
10	3.527	5.440	0.024	1.002	4.400
11	3.908	5.040	0.081	2.715	2.715
12	4.300	4.680	0.138	4.400	1.002
13	4.700	8.860	0.195	0.810	2.525
14	5.100	8.480	0.253	2.525	0.810
15	5.400	8.100	0.310	4.200	4.200
16	5.800	2.000	0.367	0.620	0.620
17	6.192	1.620	0.420	2.335	4.000
18	6.600	1.240	0.481	4.000	2.335
19	7.000	7.720	0.005	0.431	2.144
20	7.300	7.340	0.062	2.144	0.431
21	7.700	6.960	0.119	3.858	3.858
22	8.096	0.860	0.176	0.240	0.240
23	8.500	0.481	0.233	1.954	3.667
24	8.900	0.100	0.291	3.667	1.954
25	9.200	4.280	0.348	0.050	3.477
26	9.600	3.900	0.400	1.763	1.763
27	10.00	3.520	0.460	3.477	0.050
28 ^a	8.600	2.581	0.129	0.123	4.500
29 ^a	0.620	5.140	0.257	0.519	4.800
30 ^a	1.000	5.461	0.100	2.732	1.410
31 ^a	8.600	2.000	0.332	4.900	0.499
32 ^a	7.400	8.460	0.420	2.610	3.570
33 ^a	7.900	6.380	0.319	4.600	3.705
34 ^a	7.400	1.340	0.067	1.574	2.854
35 ^a	4.900	6.160	0.308	3.616	1.026
36 ^a	2.229	0.530	0.026	2.440	4.497
37 ^a	2.227	2.660	0.133	3.296	0.790
38 ^a	2.550	1.920	0.430	2.100	2.218
39 ^a	6.400	8.040	0.096	3.361	0.342
40 ^a	7.909	2.280	0.400	4.603	0.900

^a Solutions that formed the external test set.

2.5. Software

Regression analysis was performed using Excel (Microsoft). The training and evaluation of the different ANNs tested in this work was made by means of a program developed with routines available to MATLAB v. 6.1 (Mathworks, Natick, MA, USA), which employed the optional Neural Network Toolbox v. 4.0.

2.6. Analysis of urine samples

The bioelectronic tongue was applied to real urine samples, and their results compared with reference determination procedures. The determination of urea was based on enzymatic hydrolysis followed by colorimetric Berthelot reaction. This depends upon the action of urease to produce ammonia, followed by its reaction with alkaline hypochlorite and phenol in the presence of a catalyst, sodium nitroprusside, to form Indophe-

nol Blue, which is measured spectrophotometrically at 570 nm (Chaney and Marback, 1962). The concentration of creatinine was determined by the Jaffé method, which consists of the reaction of creatinine with an alkaline solution of picrate to form a red-orange complex, measured colorimetrically at 500 nm (Bauer, 1982). The ammonium reference value was obtained by using an ammonia gas electrode (Clesceri et al., 1998) and potassium and sodium values by using the inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) technique (US EPA Method, 1994). The urine samples were collected from three volunteers. Five hundred microliters of each sample were diluted 1/100 with 50 mM, pH 7.5, Tris-HCl. To obtain a greater variability of the concentrations of the different analytes, eight new spiked samples were prepared by adding, respectively, different quantities of urea, creatinine, ammonium, potassium and sodium to the 100-fold urine dilution. These 11 (3 raw and 8 spiked) samples were processed by the proposed method, as described above.

3. Results and discussion

3.1. Response characteristics of the creatinine biosensors

As a result of the characterization experiments, ammonium-transducer creatinine biosensors showed a limit of detection (LD), calculated as recommended in potentiometry (Morf, 1981), of 1.0×10^{-4} M; the sensitivity or slope of the calibration line in response to creatinine was around 50 mV decade⁻¹. These biosensors presented a linear response range of more than two decades of concentration and a response time (95% of final response) in the range 1–2 min. The daily calibrations did not show great variations of sensitivity during 27 natural days of study (variation lower than 15% R.S.D.) and their LD was practically constant along this time. Therefore, these biosensors show suitable response characteristics for being included in the array for the bioelectronic tongue.

3.2. Building of the ANN model

ANNs are multicomponent calibration tools for classification and modelling, specially useful for nonlinear systems. The functioning is based on the animal nervous system and its elementary unit is the perceptron or neuron. The properties that characterized a neural network are: the transference function used in the neurons, the network topology and the learning algorithm used. Among the different ANN structures, the multi-layer perceptron is the most used. It can be defined as a feed-forward network with one or more layers of neurons between the input and output neurons. These additional layers contain hidden neurons that are connected to either the inputs and outputs by weighted connections.

Selecting the topology of an ANN is a first obstacle, because of the difficulty to predict an optimum configuration in advance, and it is obtained by a trial and error procedure (Despaigne and Massart, 1998). In this case, the process includes a combination of the number of neurons of the hidden layer and the transference function used within. These characteristics will define

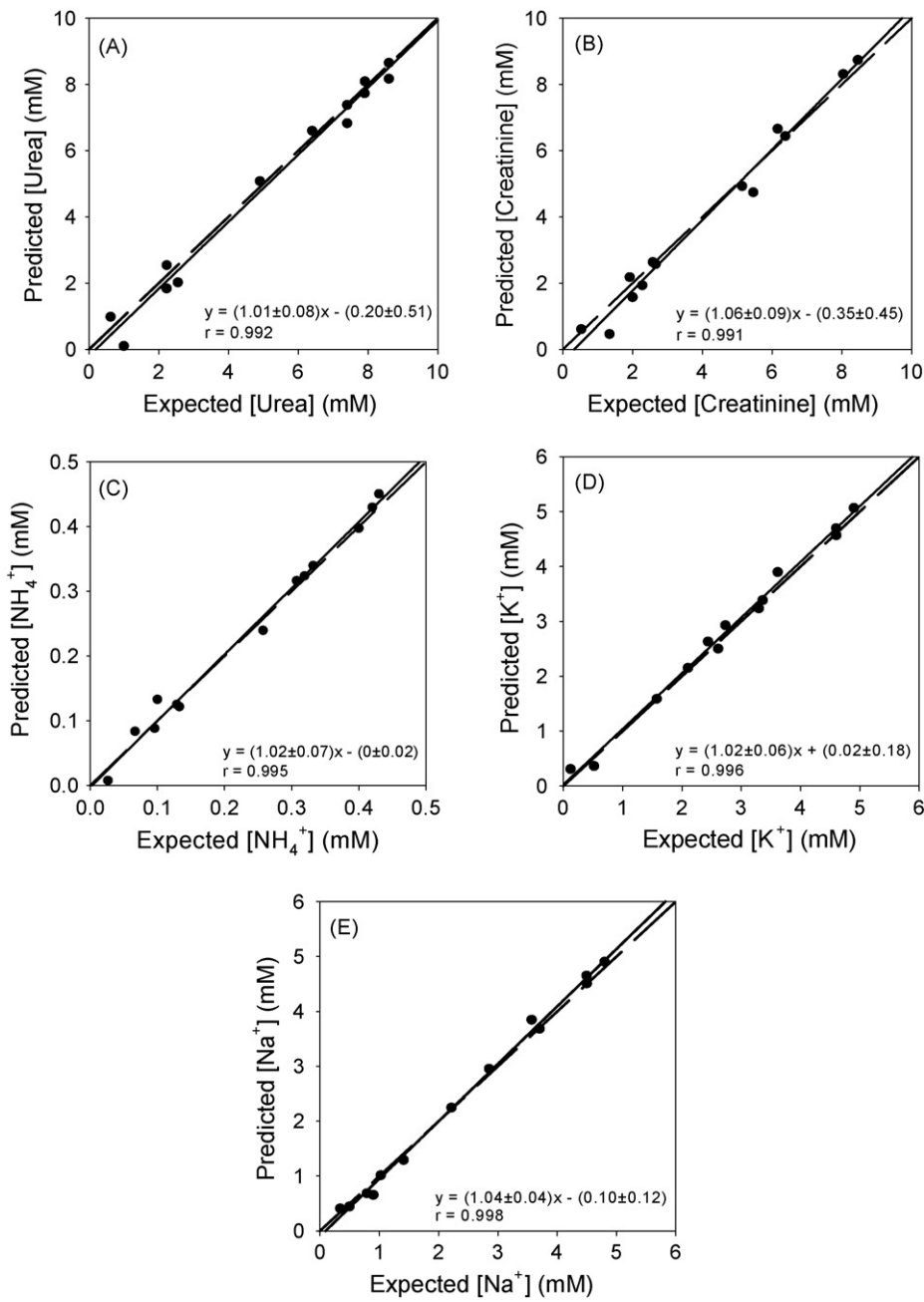


Fig. 1. Modelling performance achieved for the optimized ANN with the 13 samples that form the external test set: (A) urea, (B) creatinine, (C) ammonium, (D) potassium and (E) sodium. The dashed line corresponds to ideality and the solid one is the regression of the comparison data.

Table 3

Obtained recovery yield for the eight spiked samples, using the proposed bioelectronic tongue (initial concentration subtracted)

Sample	Urea recovery (%)	Creatinine recovery (%)	Ammonium recovery (%)	Potassium recovery (%)	Sodium recovery (%)
1	74.0	111.9	107.2	99.7	104.5
2	92.6	101.4	101.3	108.7	95.8
3	98.8	109.2	91.2	102.0	95.5
4	90.2	120.8	101.4	103.6	98.3
5	95.3	92.7	100.3	100.3	91.8
6	88.9	82.3	130.5	99.1	122.9
7	106.6	111.0	95.8	162.5	86.0
8	94.1	81.9	82.8	93.8	71.5
Average (%)	92.6	101.4	101.3	108.7	95.8

the specific combination leading to the best modelling ability (Cartwright, 1993).

We initially fixed the following parameters: the number of input neurons, which is 12 (12 sensors from the array); the number of output neurons, which is 5 (the 5 modelled analytes); the transference function for the output layer is linear (*purelin*) and a single hidden layer of neurons; these selections are based on previous experience with electronic tongues using potentiometric sensors (Gallardo et al., 2003a). The learning algorithm used was Bayesian regularization (Demuth and Beale, 1992) and employed as internal parameters, a learning rate of 0.1 and a momentum of 0.4, selected from preliminary tests.

The modelling capacity of the ANN was examined in terms of the root mean squared error (RMSE) in concentration:

$$RMSE = \sqrt{\left(\sum_{i,j} \frac{(x_{i,j} - \hat{x}_{i,j})^2}{5n - 1}\right)} \quad (1)$$

where n is the number of samples ($5n$, as many as 5 species were determined) and $\hat{x}_{i,j}$ and $x_{i,j}$ are the expected concentration value and that provided by the ANN, respectively, for each compound i , with j denoting samples.

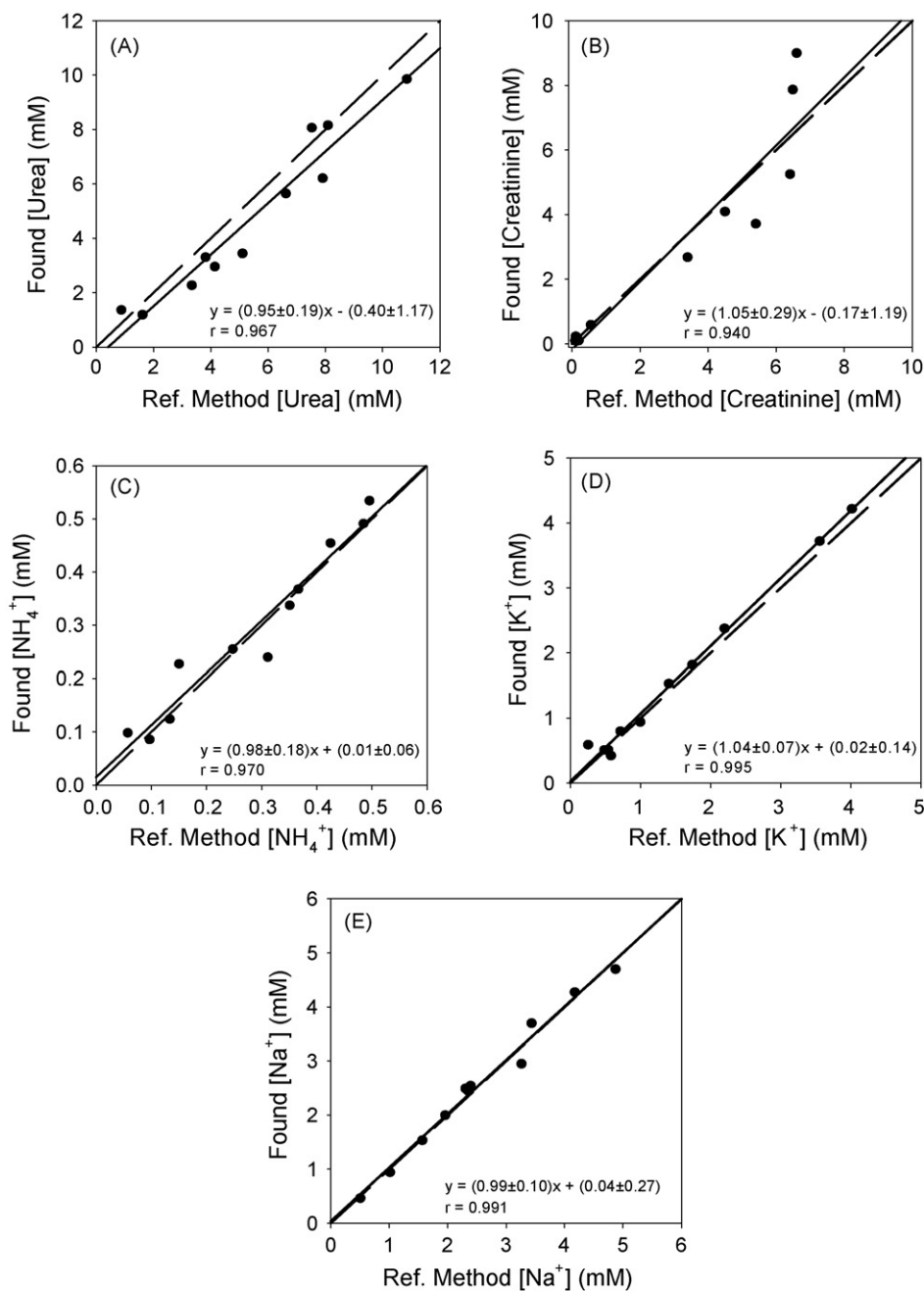


Fig. 2. Comparison between results with reference methods and bioelectronic tongue for: (A) urea, (B) creatinine, (C) ammonium, (D) potassium and (E) sodium in raw and spiked urine samples using the optimized ANN model. The dashed line corresponds to ideality and the solid one is the regression of the comparison data.

The strategy selected for the learning process (Bayesian regularization) provided better RMSE values, greater consistency between the predicted and obtained values for the training and a higher significance for the external test set when compared to others variants for training (Demuth and Beale, 1992). For example, the algorithm of gradient descent is not a fast training method and it can converge to a local minimum. Also, the more established Levenberg–Marquardt algorithm is very efficient, but it provides models with more complex architecture. A further advantage of Bayesian regularization is that it does not require an internal validation set of samples to avoid overfitting (Demuth and Beale, 1992).

Considering the highly nonlinear behaviour of the sensors, whose response is described by the Nikolskii–Eisenmann equation, and our previous experience in potentiometric electronic tongues (Gallardo et al., 2003a,b, 2005), only two different nonlinear transference functions were considered for the hidden layer, specifically, a sigma-shaped function named *tansig* function (Freeman and Skapura, 1991) and a logistic function represented by the *logsig* function. The best training results were obtained with the *tansig* function and 6 neurons in the hidden layer (tested between three and twelve neurons); this configuration provided a RMSE = 1.8 mM for the external test set, those samples not intervening in training.

Fig. 1 illustrates the performance of the finally optimized model for the external test set, comparing predicted versus expected values for urea, creatinine, ammonium, potassium and sodium. Predictions were good for the individual ions and for their mixtures. The accuracy of the obtained response approaches ideality, with unity slopes and zero intercepts for the external test set (all confidence intervals were calculated at the 95% confidence level). The figure also shows a highly significant correlation for the five individual species in the external test set, those data were not used for training.

3.3. Application to real samples

The analysis of the three diluted urine samples plus the eight spiked samples was performed by its simple direct measurement with the biosensor array, followed by interpolation using the ANN model previously optimized. Obtained results were compared with those obtained by established reference methods as stated in Section 2.6. Comparison of the obtained results is given in Fig. 2, which also includes the regression data for the five considered species. As can be seen in all five cases, the uncertainty intervals (calculated at the 95% confidence level) included the ideal slopes of 1.0 as well as zero intercepts. Dispersion between predicted and reference values was higher than that obtained with the test set samples; nevertheless, the correlation coefficients were highly significant in all cases.

The recovery yield of the added theoretical concentration for the eight spiked samples was calculated and the results are summarized in Table 3. A nearly 100% average recovery yield for urea, creatinine, ammonium, potassium and sodium was obtained. These global tests indicated a good correspondence with the reference values.

4. Conclusions

Urea and creatinine biosensors based on covalent immobilization of urease and creatinine deiminase, respectively, were prepared by carbodiimide reaction onto the sensitive PVC–COOH layer of ammonium selective electrodes. Both biosensors showed adequate response characteristics for their inclusion in arrays of sensors together with ammonium, potassium, sodium and generic ion-selective electrodes. The biosensor array was thus employed to build a bioelectronic tongue for the determination of urea and creatinine in the presence of their interferences: ammonium, potassium and sodium ions. ANNs were applied as processing tool to obtain a calibration model for the simultaneous five-analyte determination. The developed bioelectronic tongue provided an extraordinarily simple procedure, with direct measurement, to quantify the concentration of urea and creatinine in real urine samples without the necessity of eliminating the alkaline interferences and compensating their effects. Such a system would facilitate clinical studies of renal function or the monitoring of haemodialysis processes in real time.

In this contribution, better results in the determination of the five analytes were achieved than those obtained in our previous related paper (Gutiérrez et al., 2007a), although an additional new species, creatinine, was considered in the determination system without increasing the number of training samples. In this new array, biosensors based on pH electrodes have not been included, because their response to the analytes of interest is limited by the Tris buffer effect; apart, we preferred to keep the system simpler by using fewer sensor types. The pH-sensitive electrode was substituted by a second sensor of generic response to alkaline ions; in this case, it was based on the ionophore lasalocid. Besides, the fact of duplicating the sensors in the array provided redundant information of the samples, that improves the reliability of the model. This fact indicates the importance of choosing the appropriate sensors that will form the array to obtain a good performance.

Acknowledgements

This work was supported by Spain's Ministry of Education, Science and Sport, MEC (Madrid) through the project CTQ2004-08134 and by the Department of Innovation, Universities and Enterprise (DIUE) from the Generalitat de Catalunya.

References

- Alegret, S., Martínez-Fábregas, E., 1989. *Biosensors* 4, 287–297.
- Bauer, J.D., 1982. *Clinical Laboratory Methods*. Mosby, St. Louis, MI.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (Eds.), 1994. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, second ed. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.
- Cartwright, H.M., 1993. *Oxford Chemistry Primers*. Oxford University Press, Oxford.
- Chaney, A.L., Marback, E.P., 1962. *Clin. Chem.* 8, 130–132.
- Clesceri, L.S., Eaton, A.D., Greenberg, A.E., 1998. In: Clesceri, L.S., Eaton, A.D., Greenberg, A.E. (Eds.), *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. American Public Health Association Publications, Washington, DC.
- Davies, O.G., Moody, G.J., Thomas, J.D.R., 1988. *Analyst* 113, 497–500.

- Demuth, H., Beale, M., 1992. Neural Network Toolbox for Use with MATLAB. Mathworks Inc., Natick, MA.
- Despagne, F., Massart, D.L., 1998. *Analyst* 123, 157R–178R.
- Freeman, J.A., Skapura, D.M., 1991. *Neural Networks, Algorithms, Applications and Programming Techniques*. Addison-Wesley, Reading, MA.
- Gallardo, J., Alegret, S., Muñoz, R., De Román, M., Leija, L., Hernández, P.R., del Valle, M., 2003a. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 248–256.
- Gallardo, J., Alegret, S., De Román, M.A., Muñoz, R., Hernández, P.R., Leija, L., del Valle, M., 2003b. *Anal. Lett.* 36, 2893–2908.
- Gallardo, J., Alegret, S., Muñoz, R., Leija, L., Hernández, P.R., del Valle, M., 2005. *Electroanalysis* 17, 348–355.
- Gil, M.H., Piedade, A.P., Alegret, S., Alonso, J., Martínez-Fábregas, E., Orellana, A., 1992. *Biosens. Bioelectr.* 7, 645–652.
- Glab, S., Koncki, R., Kopczewska, E., Walcerz, I., Hulanicki, A., 1994. *Talanta* 41, 1201–1205.
- Gutiérrez, M., Alegret, S., del Valle, M., 2007a. *Biosens. Bioelectr.* 22, 2171–2178.
- Gutiérrez, M., Alegret, S., Cáceres, R., Casadesús, J., Marfà, O., del Valle, M., 2007b. *Comput. Electron. Agric.* 57, 12–22.
- Henry, R.J., Cannon, D.C., Winkelman, J.W., 1974. In: Henry, R.J., Cannon, D.C., Winkelman, J.W. (Eds.), *Clinical Chemistry: Principles and Technics*, second ed. Harper & Row, Philadelphia, PA.
- Holmberg, M., Eriksson, M., Krantz-Rülcker, C., Artursson, T., Winquist, F., Lloyd-Spetz, A., Lundström, I., 2004. *Sens. Actuators B* 101, 213–223.
- Jurkiewicz, M., Alegret, S., Almirall, J., García, M., Fábregas, E., 1998. *Analyst* 123, 1321–1327.
- Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E., Toyama, K., 1984. *J. Agric. Food Chem.* 32, 314–319.
- Koncki, R., Radomska, A., Glab, S., 2000. *Anal. Chim. Acta* 418, 213–224.
- Kovács, B., Nagy, G., Dombi, R., Tóth, K., 2003. *Biosens. Bioelectr.* 18, 111–118.
- Krawczynski vel Krawczyk, T., Trojanowicz, M., Lewenstam, A., 1994. *Talanta* 41, 1229–1236.
- Lee, W.Y., Kim, S.R., Kim, T.H., Lee, K.S., Shin, M.C., Park, J.K., 2000. *Anal. Chim. Acta* 404, 195–203.
- Matsumoto, K., Kamikado, H., Matsubara, H., Osajima, Y., 1988. *Anal. Chem.* 60, 147–151.
- Morf, W.E., 1981. *The Principles of Ion-selective Electrodes and of Membrane Transport*. Elsevier Scientific, Amsterdam.
- Radomska, A., Bodenzac, E., Glab, S., Koncki, R., 2004a. *Talanta* 64, 603–608.
- Radomska, A., Koncki, R., Pyrzynska, K., Glab, S., 2004b. *Anal. Chim. Acta* 523, 193–200.
- Rosario, S.A., Cha, G.S., Meyerhoff, M.E., Trojanowicz, M., 1990. *Anal. Chem.* 62, 2418–2424.
- Rui, C.S., Sonomoto, K., Kato, Y., 1992. *Anal. Sci.* 8, 845–850.
- Ruzicka, J., Hansen, E.H., Ghose, A.K., Mottola, H.A., 1979. *Anal. Chem.* 51, 199–203.
- Shen, H., Cardwell, T.J., Cattrall, R.W., 1998. *Analyst* 123, 2181–2184.
- Suzuki, K., Tohda, K., Aruga, H., Matsuzoe, M., Inoue, H., Shirai, T., 1988. *Anal. Chem.* 60, 1714–1721.
- Tamura, H., Shono, T., Kimura, K., 1982. *Anal. Chem.* 54, 1224–1227.
- Taylor, E.H., 1989. In: Winefordner, J.D. (Ed.), *Chemical Analysis*, vol. 106. John Wiley & Sons, New York.
- Tombach, B., Schneider, J., Matzkies, F., Schaefer, R.M., Chemnitz, G.C., 2001. *Clin. Chim. Acta* 312, 129–134.
- Umezawa, Y., 1990. In: Umezawa, Y. (Ed.), *Handbook of Ion-selective Electrodes Selectivity Coefficients*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- US EPA Method. United States Environmental Protection Agency, 1994. *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples, Revision 4.4*. Available <http://www.epa.gov>.

ANNEXOS

Annexos

V. Electronic tongue for the determination of alkaline ions using a screen-printed potentiometric sensor array.

Microchimica Acta, acceptat octubre de 2007, doi: 10.1007/s00604-007-0894-9

Manuel Gutiérrez, Víctor M. Moo, Salvador Alegret, Lorenzo Leija, Pablo R. Hernández, Roberto Muñoz, Manuel del Valle

VI. Nutrient solution monitoring in greenhouse cultivation employing a potentiometric electronic tongue.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, en revisió

M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle



Original Paper

Electronic tongue for the determination of alkaline ions using a screen-printed potentiometric sensor array

Manuel Gutiérrez¹, Victor M. Moo², Salvador Alegret¹, Lorenzo Leija², Pablo R. Hernández², Roberto Muñoz², Manuel del Valle¹

¹ Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Department of Electrical Engineering, Cinvestav, Mexico, Mexico

Received 24 July 2007; Accepted 24 October 2007; Published online • • 2007

© Springer-Verlag 2007

14 **Abstract.** A disposable all-solid-state planar-type po-
15 tentiometric electronic tongue has been developed with
16 a five-sensor array screen-printed on a polymeric sub-
17 strate. The proposed fabrication method gives possi-
18 bility for simple and reproducible mass-production
19 of low-cost electronic tongue systems, since the sen-
20 sors showed good reproducibility (0.96% RSD), re-
21 peatability (0.58% RSD) and lifetime (8% decrease
22 of sensitivity after 37 days in solution) in the charac-
23 terization study. The system was used for the simulta-
24 neous determination of NH₄⁺, K⁺ and Na⁺ ions in
25 synthetic and natural surface water samples. The sig-
26 nals were processed by using a multilayer artificial
27 neural network, which was optimized for that purpose.
28 Correct results were obtained for the three considered
29 ions in synthetic samples. In natural surface waters,
30 ammonium and potassium ions could be determined,
31 while sodium ions showed biased results due to the
32 effect of the complex matrix.

33 **Keywords:** Electronic tongue; screen-printing technique; sensor
34 array; potentiometric sensors; artificial neural networks

Multicomponent analysis based on chemical sen- 35
sor arrays combined with appropriate chemometric 36
methods has attracted considerable interests of many 37
researchers in various disciplines. Following the de- 38
velopment of electronic noses for gas analysis [1, 2], 39
the arrays of electrochemical sensors and devices like 40
taste sensor [3] and electronic tongues [4] have been 41
used for the analysis of complex liquid samples. 42
These devices can provide global information about 43
the system (qualitative analysis) and can also mea- 44
sure specific components and parameters (quantitative 45
analysis). The multisensor array is composed of partial- 46
ly-selective chemical sensors presenting cross-response 47
to several components. Advanced mathematical meth- 48
ods, e.g. multivariate regression, principal component 49
analysis, artificial neural networks (ANN), partial 50
least squares, and fuzzy logic have been used to ex- 51
tract the representative information from the multivar- 52
iate data [5]. 53

Various types of chemical sensors based on dif- 54
ferent working principles (e.g. voltammetry [6, 7], 55
potentiometry [8, 9], spectrophotometry [10], fluo- 56
rescence spectroscopy [11]) have been reported to 57
form sensor arrays for electronic tongues. From 58
those, electronic tongues using potentiometric sen- 59
sors require relatively simple measuring devices 60
and provide wide variety of sensing elements (e.g. 61

Correspondence: Manuel Gutiérrez, Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
e-mail: manuel.gutierrez@uab.es

1 polymeric films, glasses, and metallic electrodes).
 2 However, some inconvenients of the electronic tongue
 3 prepared with an array of conventional ion selective
 4 electrodes are that it requires a large volume of
 5 sample for measurement, frequent recalibrations, and
 6 preconditioning before use. Such features are disad-
 7 vantageous in most complex liquid media analysis,
 8 especially if only a small volume of sample is avail-
 9 able for measurements.

10 Electronic tongues may find a wider application
 11 with the development of mass-produced miniaturized
 12 potentiometric sensors. There have been some at-
 13 tempts to miniaturize multisensor systems for liquid
 14 analysis: a commercial version of an electronic tongue
 15 [12] and the flow injection systems with small sized
 16 sensors have been introduced [13, 14]. However, there
 17 have been few researches that utilized disposable-type
 18 all-solid-state multisensor array to construct electron-
 19 ic tongues. In this field, electronic tongues based on
 20 ion selective field effect transistors have been devel-
 21 oped to classify different brands of mineral water
 22 [15]. In the same way, potentiometric electronic ton-
 23 gues based on thick-film technology [16] or silicon
 24 technology [17] have been described for qualitative
 25 purposes. Also miniaturized solid-state potentiometric
 26 sensors based on planar Au transducers have been
 27 incorporated to an array to classify various brands
 28 of beers [18]. Finally, an electronic tongue constituted
 29 by a carbon paste electrode array screen-printed on a
 30 polymeric substrate has been described in the bibliog-
 31 raphy for the analysis of potable waters, soft drinks
 32 and beers [19].

33 Since a disposable electronic tongue may be fab-
 34 ricated by screen-printing conductive electrodes and
 35 polymeric membranes onto a solid substrate, in this
 36 contribution, we report the development of a planar-
 37 type potentiometric electronic tongue based on
 38 poly(vinyl chloride) (PVC) membranes, and their ap-
 39 plication for the simultaneous multi-determination of
 40 ammonium, potassium and sodium in synthetic and
 41 natural (dam) water samples. Of these, the main in-
 42 terest is the determination of ammonium because of
 43 its environmental concerns. For its determination, the
 44 electronic tongue approach intends its direct mea-
 45 surement, in which the interference effects (of other
 46 alkaline ions) are quantified and counterbalanced.
 47 This determination was first attempted in our labora-
 48 tory using a similar array of eight sensors, in which
 49 some of these were duplicated [20]. This application
 50 achieved the determination of ammonium, potassium

and sodium in real waters and wastewaters with some
 difficulty. Analogously, the same study case was at-
 tempted using an automated Sequential Injection
 Analysis system which employed the equivalent five
 sensors used here, but in a flow-through configuration
 [21]. In this case, only ammonium ion in fertilizer
 samples could be quantified.

Experimental

Chemicals and solutions

The ion-selective PVC membranes were prepared from high-molec-
 ular weight PVC (Fluka, Switzerland, www.sigmaaldrich.com),
 using bis(1-butylpentyl) adipate (BPA), dioctyl sebacate (DOS), 2-
 nitrophenyloctylether (NPOE) and dibutyl sebacate (DBS) (all from
 Fluka) as plasticizers. The recognition elements employed to formu-
 late the potentiometric membranes were the ionophores nonactin
 (nonactin from Streptomyces, Fluka), valinomycin (potassium
 ionophore I, Fluka) and bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-
 methylmalonate (CMDMM, Dojindo Laboratories, Japan, www.
 dojindo.com). Additionally, two recognition elements with generic
 response to cations were used: dibenzo-18-crown-6 and lasalocide
 (both from Fluka). All the components of the membrane were dis-
 solved in tetrahydrofuran (THF, Fluka).

For the preparation of the screen-printed electrodes, the fol-
 lowing materials were used: polycarbonate substrate 0.5 mm thick-
 ness, conductive silver ink (Electrodag 1415 M, Acheson, MI, www.
 achesonindustries.com), graphite ink (Electrodag PF-407, Acheson)
 and epoxy resin components, ink and hardener (Seripox S-600,
 Quimovil, Spain, www.quimovil.com), as insulating layer. The used
 screen was prepared in 68 T (68 threads in⁻² and T for thread
 diameter, according with the manufacturer code) and 21 T frames
 (Paymser, Spain, www.paymser.com) using 50 μm and 200 μm em-
 bossing films (Murakami, Singapore, www.murakami.com.sg).

Imidazole (Sigma, MI, www.sigmaaldrich.com) buffer at pH =
 6.60 was used as background measuring solution. All other
 used reagents were of high purity, analytical grade, pro analysis or
 equivalent. Aqueous solutions were prepared with Milli-Q water
 (Millipore, MA, www.millipore.com).

Real water samples were obtained from Ignacio Ramírez dam, a
 eutrophic reservoir located in the Lerma-Chapala system in Mexico
 at 99° 46' 25" W, 19° 27' 35", 2548 m above sea level. These
 samples were taken at five different points of the dam and processed
 with the developed electronic tongue.

Preparation of screen printed potentiometric sensor array

The different steps for the construction of a potentiometric sensor
 array by the screen-printing technique are depicted in Fig. 1. In this
 work, the proposed structure for the array is particular since the
 depth of the sensor cavities has been increased to contain the ion-
 selective membranes without overflow that can cause the contami-
 nation of neighbour sensors.

A polycarbonate substrate was used for the fabrication of the
 arrays, since this polymer shows a good adherence with the different
 inks used. Each array took up an area of 50 × 75 mm (Fig. 1a), and it
 was composed by five sensors of 5.0 mm diameter and separated
 1.0 mm. In practice, a large enough section was used to fabricate
 eight arrays simultaneously. The manufacture sequence has different

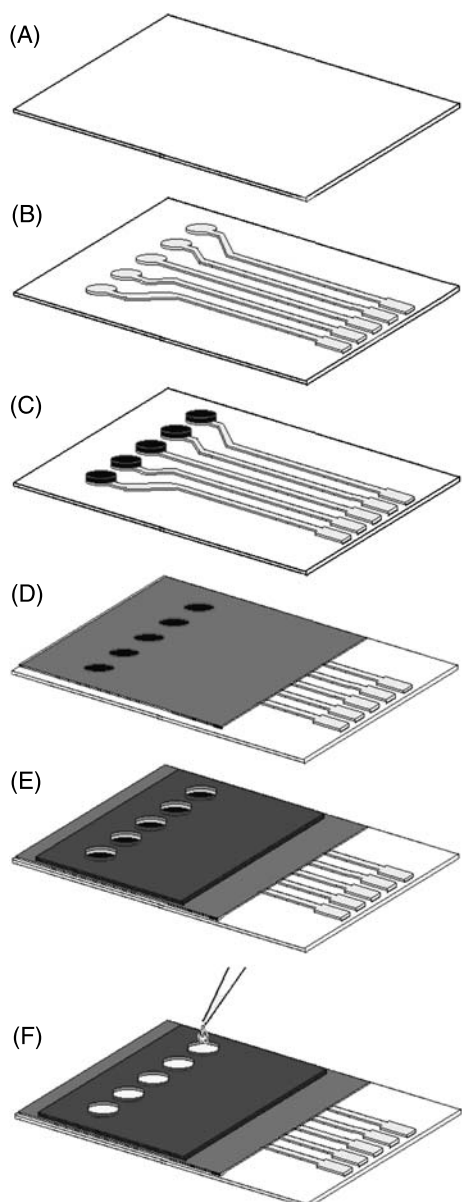


Fig. 1. The fabrication process for all-solid-state planar-type sensor array: (A) polycarbonate substrate (50 × 75 mm), (B) silver ink printing, (C) graphite ink printing, (D) insulator layer printing, (E) cavities for the sensors, and (F) deposition of different PVC membranes

1 stages. First, silver ink acting as a conductive layer was printed and
 2 cured in a furnace at 40°C for 6 h (Fig. 1b). Next, the circular
 3 contact of graphite was printed and cured at the same conditions
 4 (Fig. 1c). The insulator layer formed by epoxy resin was applied and
 5 cured at the same temperature for 1 h (Fig. 1d). For these printing
 6 steps, frames of 68 T with 50 μm embossing films were used. To
 7 generate the sensor cavities, it was necessary to increase the thick-
 8 ness of the printing epoxy resin to 400 μm. This well was formed
 9 in two steps, using a 21 T frame with a 200 μm embossing film. The
 10 first printing was realized directly onto the array, and the second one
 11 onto a polystyrene substrate. To achieve a precise thickness of
 12 200 μm, it was necessary to adjust the viscosity of the epoxy resin,

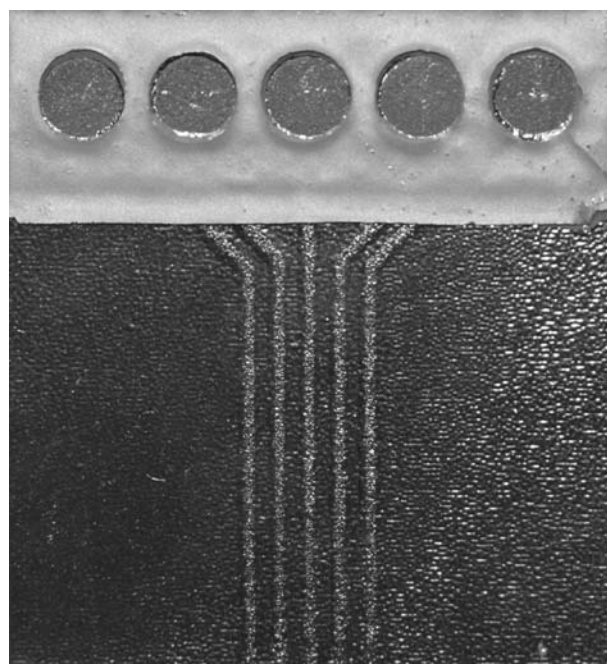


Fig. 2. Photograph of the fabricated screen-printed five-sensor array

Table 1. Formulation of the ion selective membranes employed in the construction of the potentiometric sensor array

Sensor	PVC (%)	Plasticizer (%)	Recognition element (%)	Ref.
NH ₄ ⁺	33	BPA (66)	Nonactin (1)	[22]
K ⁺	30	DOS (66)	Valinomycin (3) ^a	[23]
Na ⁺	22	NPOE (70)	CMDMM (6) ^a	[24]
Generic 1	29	DOS (67)	Dibenzo-18-crown-6 (4)	[25]
Generic 2	27	DBS (70)	Lasalocide (3)	[26]

^a The formulation includes potassium tetrakis(4-chlorophenyl)-borate as additive.

modifying the ratio between its two components. Once cured, the
 13 film can be easily detached from the polystyrene and fixed onto the
 14 array by gluing it with the same epoxy resin (Fig. 1e). Figure 2 is a
 15 photograph of the array obtained by this method. The last step of
 16 the construction was the manual deposition of the potentiometric
 17 membranes (Fig. 1f). Table 1 summarizes the formulation of the five
 18 different membranes used per array, where the recognition element
 19 determines the selectivity of each sensor. 20

Apparatus

Potentiometric measurements were performed with an electronic
 22 system developed in the laboratory. Each channel has a conditioning
 23 stage using an INA116 (Texas Instruments, TX, www.ti.com) instru-
 24 mentation amplifier for adapting the impedance of each sensor.
 25 Measurements were differential versus the reference electrode
 26 (double junction Ag/AgCl electrode, Model 90-02-00, Thermo
 27 Electron, MA, www.thermo.com) and grounded with an extra con-
 28 nection in contact with the solution through a stainless steel wire. 29

1 All channels were noise-shielded with their signal guard and the
 2 outputs of each amplifier were filtered with a second order active
 3 low-pass filter with a cutoff frequency of 2 Hz using a UAF42
 4 (Texas Instruments) universal filter. These filtered outputs were
 5 connected to a MPC506 (Texas Instruments) 16 channel analog
 6 multiplexer, following by an ADS7804 (Texas Instruments) A/D
 7 converter. The complete data acquisition system was controlled by
 8 using an AT90S8515 (Atmel, CA, www.atmel.com) microcontroller
 9 including the RS-232-C serial communication interface. This instru-
 10 mental system has been recently described to different environmen-
 11 tal applications [27].

12 *Training and measurement procedure*

13 Before the preparation of the array, the response of similar screen-
 14 printed individual sensors were evaluated. First, the different for-
 15 mulations of the potentiometric membranes were calibrated in
 16 response to each considered ion. These calibration curves were
 17 obtained by means of the analyte addition technique: the variation
 18 of potential originated by the addition of accumulated microvol-
 19 umes of stock solutions (of concentrations 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} and
 20 1 mol L^{-1}) of each individual ion (ammonium, potassium and sodi-
 21 um) in 25 mL of Milli-Q water is obtained. To evaluate the repro-
 22 ducibility of the fabrication method, five different sensors with
 23 membranes that included dibenzo-18-crown-6 in their formulation
 24 were calibrated in response to potassium by means of the same
 25 method. Sensors with Generic 1 formulation were chosen arbitrarily
 26 for this purpose. To evaluate the repeatability of the responses, one
 27 of these sensors was calibrated consecutively five times. Finally, to
 28 evaluate the lifetime and the adherence of the polymeric membrane,
 29 three of these sensors were submerged in Milli-Q water for 37 days
 30 and calibrated six times during this period for monitoring possible
 31 changes in their responses.

32 Once the characterisation of the individual sensors was done,
 33 the response of the five sensor array was assessed employing an
 34 Artificial Neural Network (ANN) model. Measurements for training
 35 the ANN were done with solutions with a defined background and
 36 pH, $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ imidazole buffer of pH 6.60, aimed at improving
 37 the characteristics of response for low level detection of ammonium
 38 ions [28]. Different mixtures were prepared by additions of stock
 39 solutions of the different considered ions on to that background
 40 accordingly to a statistical experimental design [29]. In this case,
 41 27 solutions were defined from a complete factorial design with
 42 three levels of concentration and three factors (the three considered
 43 ions, 3^3). These samples were prepared manually one by one, with-
 44 out using any automatic device. The range of variation of the con-
 45 centration for the analytes in these solutions was from 0.10 (low
 46 level) to 10.0 mmol L^{-1} (high level) (as expected in the environmen-
 47 tal samples), which supposes an extensive training space. The con-
 48 centration for the center level was 1.0 mmol L^{-1} . In order to correct
 49 any possible drifts, inputs in the neural network were made rela-
 50 tive for each sensor with respect to a reference solution passed every
 51 10 samples. This procedure was used with all types of samples
 52 (training, test, synthetic and real samples). The composition of this
 53 reference solution was 0.05 mmol L^{-1} for each considered ion (am-
 54 monium, potassium and sodium) in the same imidazole background.
 55 The concentrations of this solution were lower than those used for
 56 the low level in the experimental design in order to compensate any
 57 hysteresis effect of the electrodes. For the testing process of the
 58 electronic tongue performance, an additional set of solutions was
 59 used. This testing set did not participate in the training process. The
 60 set was formed by 10 synthetic solutions prepared in the same way,
 61 but with concentrations generated randomly inside the training
 62 space (Table 2).

Table 2. Composition of the 10 solutions that formed the randomly defined external test set

Sample	$[\text{NH}_4^+]$ (mmol L^{-1})	$[\text{K}^+]$ (mmol L^{-1})	$[\text{Na}^+]$ (mmol L^{-1})
1	2.2	0.88	7.8
2	6.5	7.9	6.6
3	0.12	4.0	9.4
4	9.0	3.0	5.2
5	7.6	8.6	1.0
6	3.4	6.8	4.5
7	1.1	5.3	3.4
8	0.60	1.7	2.2
9	9.8	9.3	0.14
10	5.0	0.12	8.6

Software

The ANNs tested were trained and evaluated using the routines available in the Neural Network Toolbox v.4.0 of the Matlab v.6.1 (Mathworks, MA, www.mathworks.com) environment. Sensor data was acquired by a PC commanded by a custom software written in VisualBasic (Microsoft, WA, www.microsoft.com). Non-linear regression fittings were done employing Sigmaplot 8.0 (SPSS, IL, www.spss.com).

Applications

As a typical laboratory application, five synthetic samples were prepared by an appropriate dilution of standards containing mixtures of NH_4^+ , K^+ and Na^+ in a $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ background medium at pH 6.60 and processed.

Once the applicability of the system was demonstrated, the method proposed was applied to real samples and the results compared with those from reference methods: ammonium was determined by the Nessler reaction and potassium and sodium were quantified by atomic absorption spectroscopy. A set of real water samples were collected from five different points of the Ignacio Ramírez dam (Mexico). Once filtered, 40 mL volume of each sample were mixed with 10 mL of $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ imidazole buffer at pH 6.60. To obtain a greater variability of the concentrations of the different analytes, 10 new samples were prepared by adding different quantities of ammonium, potassium and sodium (spiked samples) to 1/2 and 1/3 water dilutions.

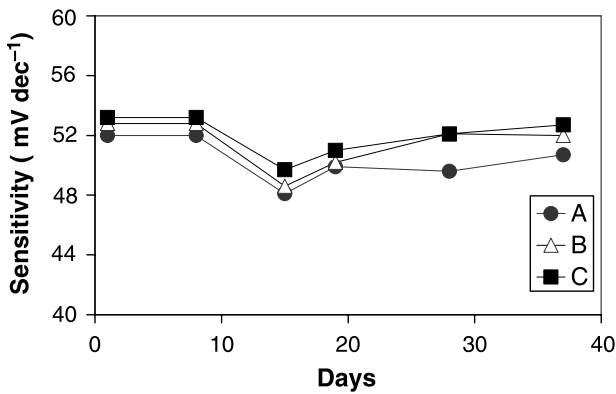
Results and discussion

Response of the screen-printed sensors

The sensitivities found for each sensor in the array in response to ammonium, potassium and sodium are showed in Table 3. The results indicate that the screen-printed sensors provided cross response to all the studied ions in solution. The fabrication reproducibility between different devices, estimated from a Generic 1 formulation, showed a figure of 0.96% RSD, considering the sensitivity to potassium of five different sensors. The repeatability study with a single sensor showed a figure of 0.58% RSD and the calibra-

Table 3. Sensitivities showed by each sensor in the array to the different considered ions

Sensor	Sensitivity to NH_4^+ (mV dec^{-1})	Sensitivity to K^+ (mV dec^{-1})	Sensitivity to Na^+ (mV dec^{-1})
NH_4^+	52.4	44.8	44.5
K^+	43.6	50.1	26.7
Na^+	25.8	45.6	48.3
Generic 1	27.3	41.2	33.7
Generic 2	44.1	38.8	22.5

**Fig. 3.** Evolution of the sensitivity to potassium of three screen-printed sensors (A, B and C), which were submerged in water for 37 days in order to evaluate their lifetime and the adherence of the polymeric membrane

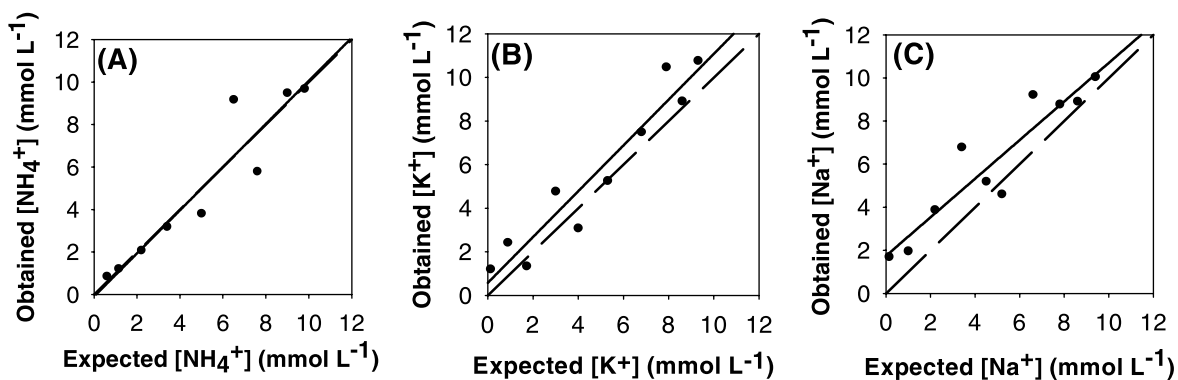
1 tions of the three sensors stored in solution (A, B and
 2 C) did not present great variations of sensitivity in six
 3 calibrations along 37 natural days (variation lower
 4 than 8%), as can be observed in Fig. 3.

5 *Building of the ANN response model*

6 ANNs were used to model the combined response of
 7 the three ions from the readings of the screen-printed

8 sensor array. Selecting the topology of an ANN is the
 9 first task in developing a numeric model with this tool,
 10 because of the difficulty to predict an optimum con-
 11 figuration in advance. The ANN structure for the best
 12 modelling of a sensor array is obtained by a trial and
 13 error procedure. The optimization process includes
 14 at least varying the number of neurons of the hidden
 15 layer and the transference function used within. These
 16 characteristics will define the specific combination
 17 leading to the best modelling ability [30].

18 Other characteristics of the configuration for the
 19 ANN were initially fixed. These included the following
 20 parameters: the number of input neurons, which was
 21 five (the five sensors from the array); the number of
 22 output neurons, which was three (the three modelled
 23 analytes); the transfer function of the output layer,
 24 which was linear (purelin) and a single hidden layer
 25 of neurons. These selections are based on previous
 26 experience with electronic tongues using potenti-
 27 metric sensors [20]. The learning strategy used was
 28 Bayesian Regularization and employed, for its internal
 29 parameters, a learning rate of 0.1 and a momentum of
 30 0.4, selected from preliminary tests. The modelling
 31 capability of the ANN was examined in terms of the
 32 root mean squared error (RMSE) of the three con-
 33 centrations sought. When compared with others, the
 34 strategy selected for the learning process (Bayesian
 35 Regularization) provided better RMSE value, greater
 36 consistency between the predicted and obtained values
 37 for the training, a higher significance for the external
 38 test set and, besides, an internal validation subset of
 39 samples was not necessary given it avoids overfitting
 40 by other means [31]. Considering the non-linear behav-
 41 iour of the sensors, two different non-linear transfer
 42 functions were considered for the hidden layer, a sig-

**Fig. 4.** Modelling performance achieved for the optimized ANN with the samples of the external test set: (A) ammonium, (B) potassium and (C) sodium. The dashed line corresponds to ideality and the solid one is the regression of the comparison data

1 ma-shaped function named tansig function [32] and a
2 logistic function represented by the logsig function.

3 After checking systematically all the 20 configura-
4 tions (two transfer functions and 3 to 12 neurons in
5 the hidden layer), the best training results were
6 obtained with the tansig function and three neurons.
7 This setup provided $RMSE = 0.0033 \text{ mol L}^{-1}$ for the
8 external test set, those samples not intervening in
9 training process. Figure 4 shows the behaviour of this
10 optimised model by comparing predicted and ex-
11 pected values for the test set and the three analytes.
12 The linear regressions of these comparisons are: $y =$
13 $(1.02 \pm 0.27)x - (0.1 \pm 1.5)$ ($r = 0.951$) for NH_4^+ , $y =$
14 $(1.05 \pm 0.26)x + (0.6 \pm 1.5)$ ($r = 0.956$) for K^+ and
15 $y = (0.90 \pm 0.28)x + (1.6 \pm 1.6)$ ($r = 0.934$) for Na^+ .
16 All confidence intervals, almost indistinguishable from
17 ideality, included unity slopes and zero intercepts at
18 95% confidence level for the three considered ions,
19 what suggests a model with correct prediction abilities.

20 *Application to synthetic samples*

21 Measurements obtained for the five synthetic prepared
22 samples, using the proposed screen-printed array,

23 were input to the best ANN configuration previously
24 found, in order to calculate the concentrations of the
25 three ions. Table 4 shows the expected concentrations
26 and those obtained by the proposed system for ammo-
27 nium, potassium and sodium ions. The results were
28 always quite close to the expected values. To demon-
29 strate the applicability of the electronic tongue, these
30 data were subjected to a Student's t -test for paired
31 samples. This test determines sample by sample if
32 there are systematic differences. The study revealed
33 no significant differences between expected and ob-
34 tained values. Thus, the experimental t -values (2.71
35 for ammonium, 0.13 for potassium and 2.52 for sodi-
36 um) were all smaller than the tabulated statistical val-
37 ue ($t_{\text{tab}, 95\%} = 2.78$), confirming the good performance
38 of the system.

Application to real samples

39
40 The five natural surface water samples and the 10
41 prepared spiked samples were processed in the same
42 way. Table 5 shows the concentrations obtained by the
43 reference methods and by the proposed system for the
44 three considered ions. Although there are some sam-

Table 4. Expected and obtained concentrations for the three considered ions in the five synthetic samples

Synthetic sample	Expected [NH_4^+] (mmol L^{-1})	Obtained [NH_4^+] (mmol L^{-1})	Expected [K^+] (mmol L^{-1})	Obtained [K^+] (mmol L^{-1})	Expected [Na^+] (mmol L^{-1})	Obtained [Na^+] (mmol L^{-1})
1	0.31	0.15	4.7	3.7	5.9	4.2
2	5.4	7.9	0.40	0.45	3.4	1.4
3	2.2	2.8	0.86	0.37	0.62	0.26
4	9.0	10.8	6.5	8.1	0.35	0.10
5	3.3	5.8	10.0	9.5	7.9	7.5

Table 5. Concentrations obtained by reference methods and by the electronic tongue for the three considered ions in the five real water samples and the 10 spiked samples

Sample	Ref. Met. [NH_4^+] (mmol L^{-1})	Obtained [NH_4^+] (mmol L^{-1})	Ref. Met. [K^+] (mmol L^{-1})	Obtained [K^+] (mmol L^{-1})	Ref. Met. [Na^+] (mmol L^{-1})	Obtained [Na^+] (mmol L^{-1})
1	0.036	0.026	1.2	0.59	14.4	0.47
2	0.019	0.021	0.91	0.60	10.4	0.46
3	0.016	0.024	0.87	0.59	14.4	0.62
4	0.019	0.026	0.92	0.58	12.0	0.51
5	0.017	0.024	0.89	0.59	8.0	0.57
6	0.48	0.38	0.61	0.55	7.2	0.31
7	5.0	7.3	0.46	0.68	5.2	0.35
8	0.97	1.1	0.45	0.53	7.2	0.32
9	9.9	7.0	0.46	1.1	6.0	0.10
10	0.068	0.053	0.44	0.60	4.0	0.52
11	3.0	4.7	1.2	3.3	8.6	4.1
12	7.0	9.1	0.54	0.42	8.8	0.10
13	0.48	0.40	0.93	0.98	5.1	0.36
14	0.99	0.0017	8.1	9.2	10.3	8.4
15	8.0	9.2	5.1	10.0	5.0	2.5

1 ples whose concentrations are out of the training
 2 space, the optimized ANN model has the capacity
 3 of extrapolating new concentrations. The Student's *t*-
 4 test for paired samples provided a *t*-value of 1.03 for
 5 ammonium, 1.33 for potassium and 7.27 for sodium.
 6 Therefore, the *t*-value for sodium exceeded the tabu-
 7 lated value ($t_{\text{tab, } 95\%} = 2.14$) and significant differ-
 8 ences were found between its reference and obtained
 9 values due to the influence of the matrix, which is
 10 highly saline and specially complex in this reservoir.
 11 In fact, the obtained concentrations for sodium were
 12 very low in comparison with the reference value in all
 13 cases (Table 5). This bias probably was caused by
 14 alkaline-earth ions present, which were not corrected
 15 with the employed ISE array. On the other hand, the *t*-
 16 value for ammonium and potassium ions were smaller
 17 than the tabulated value demonstrating that these spe-
 18 cies can be accurately determined with the ANN mod-
 19 el. Although the high concentration of sodium and
 20 potassium may have caused differences in the deter-
 21 mination of ammonium in certain samples, in general,
 22 the interferent and matrix effects are corrected, even
 23 for the difficulty in quantifying sodium ions.

24 Conclusions

25 An electronic tongue for the simultaneous determina-
 26 tion of ammonium, potassium and sodium ions in
 27 synthetic water samples and surface waters was devel-
 28 oped and optimized. The tongue consisted of a screen-
 29 printed array of specially constructed polymer (PVC)
 30 membrane potentiometric sensors and was modelled
 31 with an ANN. The used five-sensor array consisted of
 32 ISEs with a cross response to alkaline ions in order
 33 to enable their simultaneous determination. A neural
 34 network with the optimum topology for this purpose
 35 was trained to predict the ammonium, potassium and
 36 sodium concentrations without the need to remove
 37 interferents in synthetic samples and, with some diffi-
 38 culty, also in real water samples. With water samples
 39 having an especially complex matrix (the considered
 40 dam samples), the ANN succeeded in accurately pre-
 41 dicting the content in ammonium and potassium ions,
 42 but not those in sodium ion; however, it corrected its
 43 interferent effect on the determination of ammonium
 44 and potassium ions. Including more sensors in the
 45 array in order to extend its predictive ability to new
 46 ions may facilitate the use of samples with less pre-
 47 treatment and correct some matrix effects. This work
 48 represents an improvement with respect to the study

done in our laboratory with conventional sensors 49
 [20], in which we achieved to determine alkaline 50
 ions in natural waters but with a more complicated 51
 sensor array formed by eight conventional potenti- 52
 ometric sensors. Concerning the other approach devel- 53
 oped in our laboratory [21], the improvement is clear 54
 given that with the same number of sensor, this sys- 55
 tem was able to determine not only ammonium ion 56
 but also potassium ion. Overall, this application 57
 was useful for examining the applicability of these 58
 screen-printed sensor array in flow systems, where 59
 the search of flow cells with low dead volumes is 60
 of crucial interest. 61

Acknowledgements. This work was supported by Spain's Ministry 62
 of Education, Science and Sport, MEC (Madrid) through the 63
 project TEC2007-68012-C03-02/MIC, by CONACYT (Mexico) 64
 through the project 43553 and by the Department of Innovation, 65
 Universities and Enterprise (DIUE) from the Generalitat de 66
 Catalunya. Exchange of researchers was possible through 67
 European Commission through the BioSenIntg Alfa Academic 68
 Network (AlfaII-0486-FC-FA-FCD-FI). 69

References 70

1. Gardner J W, Bartlett P N (1994) A brief history of electronic 71
 noses. *Sens Actuators B* 18: 210 72
2. James D, Scott S M, Ali Z, O'Hare W T (2005) Chemical 73
 sensors for electronic nose systems. *Microchim Acta* 149: 1 74
3. Toko K (2000) Taste sensor. *Sens Actuators B* 64: 205 75
4. Legin A V, Rudnitskaya A M, Vlasov Yu G, Di Natale C, 76
 D'Amico A (1999) The features of the electronic tongue in 77
 comparison with the characteristics of the discrete ion-selective 78
 sensors. *Sens Actuators B* 58: 464 79
5. Scott S M, James D, Ali Z (2006) Data analysis for electronic 80
 nose systems. *Microchim Acta* 156: 183 81
6. Krantz-Rülcker C, Stenberg M, Winquist F, Lundström I (2001) 82
 Electronic tongues for environmental monitoring based on 83
 sensor arrays and pattern recognition: a review. *Anal Chim 84*
Acta 426: 217 85
7. Gutés A, Céspedes F, Alegret S, del Valle M (2005) Sequential 86
 injection system with higher dimensional electrochemical sen- 87
 sor signal. Part I. Voltammetric e-tongue for the determination 88
 of oxidizable compounds. *Talanta* 66: 1187 89
8. Legin A, Rudnitskaya A, Vlasov Yu, Di Natale C, Mazzone E, 90
 D'Amico A (2000) Application of electronic tongue for quali- 91
 tative and quantitative analysis of complex liquid media. *Sens 92*
Actuators B 65: 232 93
9. Gutiérrez M, Alegret S, del Valle M (2007) Potentiometric 94
 bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in 95
 clinical samples. *Biosens Bioelectron* 22: 2171 96
10. Lavigne J J, Savoy S, Clevenger M B, Ritchie J E, McDoniel B, 97
 Yoo S J, Anslyn E V, McDevitt J T, Shear J B, Neikirk D (1998) 98
 Solution-based analysis of multiple analytes by a sensor array: 99
 toward the development of an "electronic tongue". *J Am Chem 100*
Soc 120: 6429 101
11. Bruno A E, Barnard S, Rouilly M, Waldner A, Berger J, Ehrat 102
 M (1997) All-solid-state miniaturized fluorescence sensor array 103
 for the determination of critical gases and electrolytes in blood. 104
Anal Chem 69: 507 105

- 1 12. Electronic Tongue Astree, Alpha M.O.S., France. Web site:
2 www.alpha-mos.com
- 3 13. Mortensen J, Legin A, Ipatov A, Rudnitskaya A, Vlasov Yu,
4 Hjuler K (2000) A flow injection system based on chalcogenide
5 glass sensors for the determination of heavy metals. *Anal Chim*
6 *Acta* 403: 273
- 7 14. Hassan S S M, Sayour H E M, Al-Mehrezi S S (2007) A novel
8 planar miniaturized potentiometric sensor for flow injection
9 analysis of nitrates in wastewaters, fertilizers and pharmaceu-
10 ticals. *Anal Chim Acta* 581: 13
- 11 15. Moreno L, Merlos A, Abramova N, Jiménez C, Bratov A
12 (2006) Multi-sensor array used as an “electronic tongue”
13 for mineral water analysis. *Sens Actuators B* 116: 130
- 14 16. Máñez M R, Soto J, Breijo G E, Gil L, Ibáñez J, Llobet E (2005)
15 An “electronic tongue” design for the qualitative analysis of
16 natural waters. *Sens Actuators B* 104: 302
- 17 17. Verrelli G, Francioso L, Paolesse R, Siciliano P, Di Natale C,
18 D’amico A, Logrieco A (2007) Development of silicon-based
19 potentiometric sensors: towards a miniaturized electronic ton-
20 gue. *Sens Actuators B* 123: 191
- 21 18. Ciosek P, Wróblewski W (2006) The recognition of beer with
22 flow-through sensor array based on miniaturized solid-state
23 electrodes. *Talanta* 69: 1156
- 24 19. Lvova L, Kim S S, Legin A, Vlasov Yu, Yang J S, Cha G S,
25 Nam H (2002) All-solid-state electronic tongue and its
26 application for beverage analysis. *Anal Chim Acta* 468:
27 303
- 28 20. Gallardo J, Alegret S, Muñoz R, Leija L, Hernández P R, del
29 Valle M (2005) Use of an electronic tongue based on all-solid-
30 state potentiometric sensors for the quantitation of alkaline
31 ions. *Electroanalysis* 17: 348
- 32 21. Cortina M, Gutiérrez A, Alegret S, del Valle M (2005) Sequential
33 injection system with higher dimensional electrochemical sen-
34 sor signals Part 2. Potentiometric e-tongue for the determina-
35 tion of alkaline ions. *Talanta* 66: 1197
22. Davies O G, Moody G J, Thomas J D R (1988) Optimisation of 36
poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrodes 37
for ammonium ions. *Analyst* 113: 497 38
23. Shen H, Cardwell T J, Cattrall R W (1998) The application of a 39
chemical sensor array detector in ion chromatography for the 40
determination of Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ in water 41
samples. *Analyst* 123: 2181 42
24. Tamura H, Shono T, Kimura K (1982) Coated wire sodium and 43
potassium selective electrodes based on bis(crown ether) com- 44
pounds. *Anal Chem* 54: 1224 45
25. Umezawa Y (1990) Handbook of ion-selective electrodes 46
selectivity coefficients. CRC Press, Florida 47
26. Suzuki K, Tohda K, Aruga H, Matsuzoe M, Inoue H, Shirai T 48
(1988) Ion-selective electrodes based on natural carboxylic 49
polyether antibiotics. *Anal Chem* 60: 1714 50
27. Gutiérrez M, Gutiérrez J M, Leija L, Hernández P R, Favari L, 51
Muñoz R, del Valle M (2007) Remote environmental monitor- 52
ing employing a potentiometric electronic tongue. *Int J Environ* 53
Anal Chem (in press), doi: 10.1080/03067310701441005 54
28. Gallardo J, Alegret S, Muñoz R, De Román M, Leija L, 55
Hernández P R, del Valle M (2003) An electronic tongue using 56
potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the 57
simultaneous quantification of ammonium and potassium ions 58
in water. *Anal Bioanal Chem* 377: 248 59
29. Magalhaes J M C S, Machado A A S C (2002) Array of 60
potentiometric sensors for the analysis of creatinine in urine 61
samples. *Analyst* 127: 1069 62
30. Bos M, Bos A, Van der Linden W E (1993) Data processing by 63
neural networks in quantitative chemical analysis. *Analyst* 118:
323 64
65
31. Demuth H, Beale M (1992) Neural network toolbox, for use 66
with MATLAB. Mathworks Inc., Natick, MA 67
32. Freeman J A, Skapura D M (1991) Neural networks, algo- 68
rithms, applications, and programming techniques. Addison- 69
Wesley, Reading, MA 70

Nutrient Solution Monitoring in Greenhouse Cultivation Employing a Potentiometric Electronic Tongue

Manuel Gutiérrez¹, Salvador Alegret¹, Rafaela Cáceres², Jaume Casadesús², Oriol Marfà²,
Manuel del Valle^{1,*}

¹ *Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

² *Department of Horticultural Technology, IRTA, 08348 Cabriels, Barcelona, Spain*

Abstract

This work investigates the use of electronic tongues for monitoring nutrient solution compositions in closed soilless systems. This is a horticultural technique in which the nutrient solution is continuously recirculated and an automatic recomposition system maintains the concentration of the different ions in the optimum range for the plants. Electronic tongues used in this study were comprised of an array of potentiometric sensors and complex data processing by artificial neural networks. A first experiment was able to carry out the simultaneous in-line monitoring of ammonium, potassium, sodium, chloride and nitrate ions during the winter. In second and third applications, done during summer, some changes were introduced in the sensor array to improve its response towards chloride ions and to incorporate phosphate in the model. This electronic tongue was validated with real greenhouse samples and was also able to detect the variations in the ion concentrations caused by an incorrect configuration of the recomposition system.

Keywords: Electronic tongue; potentiometric sensors; artificial neural networks; horticultural monitoring; fertigation; soilless culture

Introduction

The constant evolution of our society is causing an increased demand for information about the surrounding environment. In this context, analytical chemistry plays a special role by progressively supplying more and better analytical information (1). Previously, this information was obtained by discrete analysis using available laboratory methods, e.g., ionic and high-performance liquid chromatography, spectroscopy, photometry (2). Recently, analytical procedures capable of obtaining in situ, continuous and real-time information have appeared to meet some monitoring needs. Because of the complexity of the matrix involved, the measuring principles of these

systems must be sufficiently robust and sensitive as well as with broad selectivity.

One area in which the monitoring of the concentrations of analytes in solution is necessary is protected horticulture (3). This work is focused on a particular horticultural technique known as closed soilless culture (4-6). Basically, in this technique, plants grow in substrates such as rockwool, perlite, peat, etc., which replace natural soil. Nutrients or other necessary elements are supplied through a feed solution. The solution that is not used by the plants is captured in a drain tank. After filtration and disinfection, it is mixed with clean water and adjusted for pH and electrical conductivity (EC), which determine the addition of nutrient ions. This solution can then be reused. However, a practical problem with these closed techniques appears, which is the alteration in ionic

proportions of the recirculated nutrient solution. Existing protocols to control its concentration are based on closed-loop systems employing EC and pH signals. This type of protocol allows for automatically controlling the EC of the nutrient solution by means of diluting the drainage solution with clean water. However, the total conductivity provides no information on the concentration of individual ions, such as nitrate, potassium, phosphate, ammonium, calcium, magnesium, sulphate, sodium and chloride. In practice, control over these individual ions is achieved by periodic (for example, weekly) laboratory analysis, followed by readjustment of the dosage of fertilizers. Nevertheless, this can only give approximate control because the uptake of ions varies with the time of the day, stage of plant growth or solution temperature (5). Another disadvantage, which is particularly acute if the clean water source contains appreciable amounts of non-essential ions, such as sodium and chloride, is that these ions may be supplied at a faster rate than they are taken up by the plants and consequently they may accumulate in the nutrient solution. Thus, they make an increasing contribution to the overall EC and the concentration of the fertilizer ions will diminish if the conductivity is maintained at a fixed value. Undoubtedly, continuous and real-time measurement of the nutrient solution composition would constitute a clear improvement to the technique.

An alternative to the classical monitoring of such a large number of elements is the application of electronic tongues (7). This novel approach in analysis is based on an array of non-specific sensors combined with data processing of their complex signals by use of advanced chemometrical tools. Different electronic tongues have been developed to monitor industrial processes (8) and for environmental control (9). In a previous paper (10), we reported an electronic tongue formed by ion-selective electrodes (ISEs) and an artificial neural network (ANN) response model. This was applied to the simultaneous determination of ammonium, potassium and nitrate, as well as to the undesired saline compounds sodium and chloride in real

greenhouse samples. In addition, it was applied to an in-line application in a soilless culture as described above. The results showed that the chloride ion could only be determined semi-quantitatively due to the interference of the nitrate ion. Furthermore, it seemed necessary to improve the method to correct the distortions caused by the response drifts in the sensor array.

In the present work, we study these two aspects by applying two different electronic tongues to the monitoring of the nutrient solution composition used in this type of fertigation system: one for the simultaneous determination of ammonium, potassium, nitrate, sodium and chloride; and the other for the simultaneous determination of these five elements plus phosphate. The five-ion model was tested during the winter and the six-ion model, during the summer. This was intended to study the behaviour of the proposed approach in different conditions of the plants' metabolism. We also studied the behaviour of the electronic tongue when the closed system is not capable of controlling the concentration of the individual ions in the nutrient solution. In all the applications developed, special attention was paid to compensating for any effect of temperature changes on the predicted concentrations.

Materials and methods

Reagents, Materials and Apparatus. The ion-selective polyvinyl chloride (PVC) membranes were prepared from high-molecular weight PVC (Fluka, Buchs, Switzerland), using bis(1-butylpentyl)adipate (BPA), dioctyl sebacate (DOS), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), dibutyl sebacate (DBS), dioctyl-phenylphosphate (DOPP) and dibutylphthalate (all from Fluka) as plasticizers. The recognition elements employed to formulate the potentiometric membranes were: the ionophores nonactin (nonactin from *Streptomyces*, Fluka); valinomycin (potassium ionophore I, Fluka); bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-methyl malonate (CMDMM, Dojindo, Kumamoto,

Japan); tridodecylamine (TDDA, hydrogen ionophore I, Fluka); and tetronasin (provided by the University of Cambridge (11)). Material for the charged carriers was: hemi-Calcium bis[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl] phosphate (II) (BBTP, Fluka); tridodecylmethylammonium chloride (TDMAC, Fluka); and tetraoctylammonium nitrate (TOAN, Fluka). In addition, two recognition elements with generic response were used: dibenzo-18-crown-6 (Fluka) for cations and tetraoctylammonium bromide (TOAB, Fluka) for anions. Potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (Fluka) was used when necessary for a correct potentiometric response. All the components of the membrane were dissolved in tetrahydrofuran (THF, Fluka).

Silver foil (Ag, Aldrich, Milwaukee, USA) of 99.9 % purity and 0.5 mm thick was used to prepare a Ag/AgCl based sensor for chloride. Also cobalt wire (Goodfellow, Huntingdon, UK) of 99.99 % purity and 0.5 mm of diameter was used to prepare a sensor for phosphate.

The materials used to prepare the solid electrical contact were Araldite M and Hardener HR epoxy resins (both from Vantico, Barcelona, Spain), and graphite powder (50 μm , BDH Laboratory Supplies, Poole, UK) for conducting filler.

All other reagents used for the preparation of the training and testing solutions were of high purity, analytical grade, pro analysis or equivalent.

Real water samples and “in-line” applications were conducted in a greenhouse located near Barcelona, in the Maresme county (41° 25' N and 2° 23' E), in the central coast of Catalonia (Spain). Two types of water samples were studied: nutrient solution and drainage solution.

Potentiometric measurements were performed with a measurement system developed in the laboratory. Each channel has a conditioning stage using an INA116 (Texas Instruments, Dallas, TX) instrumentation amplifier for adapting the impedance of each sensor. Measurements were differential versus the reference

electrode (double junction Ag/AgCl electrode, Model 90-02-00, Thermo Electron, Waltham, MA) and grounded with an extra connection in contact with the solution through a stainless steel wire. All channels were noise-shielded with their signal guard and the outputs of each amplifier were filtered with a second order active low-pass filter with -3 dB, 2 Hz cut-off frequency, using a UAF42 (Texas Instruments) universal filter. These filtered outputs were connected to a MPC506 (Texas Instruments) 16 channel analog multiplexer. Digitalisation was performed by an ADS7804 (Texas Instruments) A/D converter. The complete data acquisition system was controlled using an AT90S8515 (Atmel, San Jose, CA) microcontroller which also supplied the RS-232-C serial communication. This microcontroller was programmed making use of the ImageCraft Development Tools' interface employing language C. The program's main tasks were the multiplexer control that selects each channel, data acquisition with the analog to digital converter and transmission/reception of words as well as data control. This instrument system has been recently described for its use in different environmental applications (9). For the construction of the chloride sensor, an Autolab PGSTAT (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) was used for the AgCl electrodeposition.

Sensor Arrays. The sensors used were all-solid-state ISEs with a solid contact made from a conductive epoxy composite. This is the usual configuration in our laboratories (12). The PVC membranes were formed by solvent casting the sensor cocktail dissolved in THF. The formulation of the different membranes used is outlined in Table 1.

During the winter application, the sensor array used was comprised of eight sensors: one ISE for ammonium; one for potassium; one for sodium; one for nitrate; two for chloride. In addition two generic membrane formulations were used: one for alkaline ions employing the electroactive element dibenzo-18-crown-6; and another for anions employing TOAB. The TDMAC based Chloride sensor was duplicated because of

the large interference effect shown by chloride ISE due to nitrate ion. This effect is characteristic when PVC membrane carrier-based sensors are used with samples having high levels of nitrate (19).

The sensor array used during the summer application was an evolution of the previous one. First, the two chloride sensors based on TDMAC were replaced by a Ag/AgCl electrode in order to improve the response to chloride. This new chloride sensor was formed by AgCl electrodeposition on a disc of Ag, 5 mm diameter. To obtain a homogeneous

deposition, 0.1 mA were passed through the electrolysis cell containing 10⁻¹ mol·L⁻¹ NaCl for 1 hour. Second, four new sensors were included to complete the array. A 1 cm length and 0.5 mm diameter cobalt wire based phosphate sensor was constructed (23). A TDDA based ISE for pH was included since the response of the phosphate sensor is strongly dependent on the pH. Finally, two different electrodes for calcium ion, one of each type, were added to correct the effect of this cation on the rest of the sensors. Thus, the array was comprised of 11 electrodes altogether.

Table 1. Formulation of the ion selective membranes employed in the construction of the potentiometric sensor arrays.

Sensor	PVC (%)	Plasticizer (%)	Recognition element (%)	Reference
NH ₄ ⁺	33	BPA (66)	Nonactin (1)	(13)
K ⁺	30	DOS (66)	Valinomycin (3) ^a	(14)
Na ⁺	22	NPOE (70)	CMDMM (6) ^a	(15)
H ⁺ ^c	32.8	DOS (65.6)	TDDA (1) ^a	(16)
Ca ²⁺ 1 ^c	33	NPOE (66)	Tetronasin (1) ^a	(17)
Ca ²⁺ 2 ^c	30	DOPP (65)	BBTP (5)	(18)
Generic 1	29	DOS (67)	Dibenzo-18-crown-6 (4)	(19)
NO ₃ ⁻	30	DBP (67)	TOAN (3)	(20)
Cl ⁻ ^b	30	NPOE (65)	TDMAC (5)	(21)
Generic 2	29	DBP (65)	TOAB (4)	(22)

^a The formulation includes potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate as additive; ^b Sensor used only during the first application: winter; ^c Sensor used only during the second application: summer.

Training and Measurement Procedure. In order to verify the correct functioning of the prepared sensors and how they were affected by the in-line experience, they were calibrated to their corresponding primary ion in 25 ml of doubly distilled water by sequential additions of standard solutions before and after the winter application. The generic response sensors were calibrated with potassium and nitrate, respectively. Also, before and after the summer application the newly incorporated sensors were calibrated: the Ag/AgCl sensor in response to chloride and the cobalt sensor to phosphate.

Before any application, the response of the system had to be assessed employing an ANN model. Measurements for training were done with solutions with a defined background. In order to compensate for the matrix effect, the background has to be as similar as possible to the real sample. In this way, because of the complexity of the real conditions, we decided to use a 1/2 (v/v) mixture of nutrient solution from the greenhouse / doubly distilled water instead of generating it completely in the laboratory.

Using this background, different mixtures were prepared by additions of stock

solutions of the different considered ions according to a statistical experimental design. For the first application (winter), 27 solutions were defined from a fractional factorial design with three levels of concentration and five factors (the five considered ions, 3^{5-2}). For the second application (summer), 27 solutions were

also defined from a fractional factorial design with three levels of concentration and six factors (the six considered ions, 3^{6-3}). The ranges of variation of the concentration for the analytes in these solutions, which correspond to expected variations, are summarized in Table 2.

Table 2. Ranges of variation of the concentration of the analytes in the solutions used for the training process.

Species	First application (mol·L ⁻¹)	Second application (mol·L ⁻¹)
Ammonium	$7.7 \times 10^{-4} - 6.2 \times 10^{-3}$	$3.0 \times 10^{-5} - 1.5 \times 10^{-2}$
Potassium	$4.2 \times 10^{-3} - 2.0 \times 10^{-2}$	$3.0 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-2}$
Sodium	$2.0 \times 10^{-3} - 1.2 \times 10^{-2}$	$5.3 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-2}$
Chloride	$2.0 \times 10^{-3} - 1.2 \times 10^{-2}$	$5.3 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-2}$
Nitrate	$5.3 \times 10^{-3} - 2.1 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-3} - 1.5 \times 10^{-2}$
Phosphate	-	$9.0 \times 10^{-5} - 1.5 \times 10^{-2}$

In order to correct for possible drifts, the inputs in the neural network were relative measurements of each sensor with respect to a periodically checked reference solution. In fact, this reference solution was checked every 10 samples during the training procedure and once every day during the in-line experiments. The composition of this reference solution was 10^{-4} mol·L⁻¹ for ammonium and phosphate, and 10^{-3} mol·L⁻¹ for the rest of the considered ions (potassium, sodium, chloride and nitrate). These are the minimum concentrations present in the nutrient solution in order to compensate for any hysteresis effect of the electrodes. We also included as input the solution temperature in order to compensate for any influence on the response of these potentiometric sensors. Therefore, a laboratory-made temperature probe based on a LM35 integrated circuit (National Semiconductor, Santa Clara, CA) was employed together with the array of electrodes.

For the proper verification of the electronic tongue performance, a new set of solutions was used, the test set, which did not participate in the training process. The test set was formed by 10 synthetic solutions

prepared in the same way as the training ones, but with concentrations generated randomly inside the training space.

These 37 prepared solutions, 27 for training and 10 for testing, were measured in three turns: one with all the solutions at room temperature (around 24 °C); another with half of the solutions at lower temperature (around 10 °C); and the third with the other half at higher temperature (around 35 °C). This experimental sequence was designed with the goal of including temperature effect in the response model. Thus, the ANN model was built using 54 (27 solutions × 2) points for training and 20 (10 solutions × 2) points for testing.

Software. The ANNs tested were trained and evaluated using the routines available to the Neural Network Toolbox v.4.0, which are optional add-ons in the Matlab v.6.1 (Mathworks, Natick, MA) environment. Sensor readings were acquired in the PC by using custom software written in VisualBasic (Microsoft, Seattle, WA).

Application with Real Samples. A set of real samples (nutrient solution and drainage water) was collected from a rose recirculating soilless culture described below and measured by the electronic tongue used in the summer application. To obtain a greater variability of the concentration of the analytes, samples were diluted with different amounts of clean water and presented to the system as well. Given that there were not enough data to make a direct comparison between real and predicted concentrations in the in-line experiments, this study would serve to validate the proposed electronic tongue in the in-line conditions. Therefore, measurements were done in a pipe installed in the greenhouse to imitate the conditions of the monitoring application. Results were compared with those determined by reference methods of widespread use: ammonium was determined by the Nessler reaction; potassium and sodium were quantified by atomic absorption spectroscopy; and chloride, nitrate and phosphate, by ion-exchange chromatography.

In-line Application in a Soilless Culture. The in-line measurements were taken in a soilless rose crop (*Rosa indica* L. cv. Lovelly Red®), in a 270 m² air-conditioned greenhouse at the IRTA site in Cabrils (41° 25' N, 2° 23' E). They were done in two turns: between November and December of 2005, and in July of 2006. The growing media was expanded medium grade perlite for one-half of the greenhouse and coconut fibre for the other half. Irrigation was triggered automatically every time that the accumulated radiation reached 200

W·m⁻²·h, leaving a leaching fraction of around 20% of the applied water. The leachates of both types of substrate were collected together and reused for the production of a new nutrient solution. The recomposition of nutrient solution consisted of the dosification of the volumes of leachate, clean water and six concentrated solutions (potassium nitrate and ammonium nitrate; potassium sulphate; monopotassium phosphate; magnesium nitrate; microelements and nitric acid). This dosification was controlled by a programmable logic controller (PLC) MCU "Ferti" (Multi Computer Unit; FEMCO, Damazan, France) based on pH (measured by a pH sensor from Broadley James, Irvine, CA), EC and predefined ratios between the volumes of each concentrated solution. The ratios of injection of the diverse concentrated solution were modified, if necessary, according to laboratory analysis of the leachate performed every 2 weeks (5).

In a similar manner to the monitoring experiment when the system was working correctly, we did a third application during the summer. On some days we changed the ratios of the stock solutions (used by the controller to recombine the nutrient solution) in order to investigate the response of the electronic tongue when the system is not able to maintain the concentrations at a constant value.

The array of sensors and the temperature probe were installed in the pipe between the tank of recomposed nutrient solution and the irrigation pump. One measurement per sensor was done every minute. The location of the ISE array and the temperature probe inside the system is shown in Figure 1.

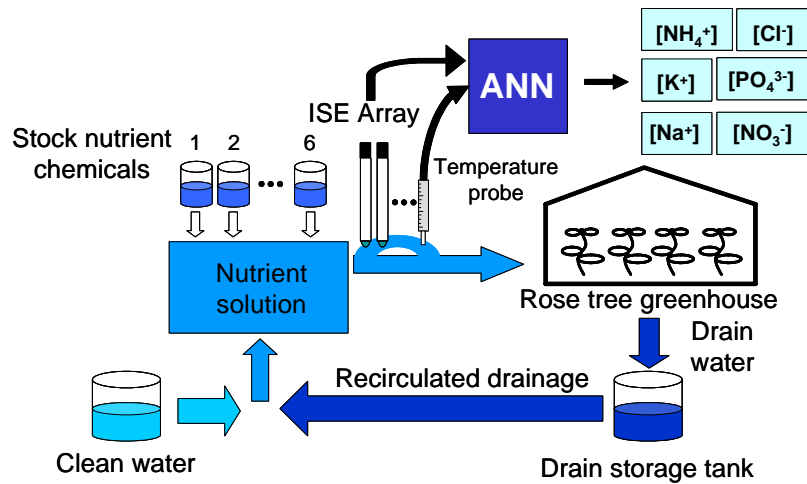


Figure 1. Block diagram of the whole system, in-line insertion of the electronic tongue inside the closed soilless strategy. During the winter application, the concentration of ammonium, potassium, sodium, chloride and nitrate ions was monitored. During the summer application, we included a sixth ion, phosphate, to the model.

Results and discussion

Sensor Performance. The prepared sensors were evaluated in doubly distilled water to establish if they were suitable for constituting the different arrays. The sensitivities to the primary ion before and after the in-line application are summarized in Table 3. The results obtained were close to the corresponding theoretical value for monovalent ions (59.1 mV/dec) in the calibrations before the in-line monitoring. The sensors with generic response showed the lowest sensitivity due to their non-selective nature. The calibrations after the in-line experiment showed that the TDMAC chloride based sensor was most affected, having lost practically all response towards chloride. For this reason, in the summer application these TDMAC sensors were replaced by a Ag/AgCl sensor, whose responses do not present nitrate interference. Also, the potassium sensor and the sensor based on dibenzo-18-crown-6 lost part of their initial response. This may be caused by the interference of alkaline-earth ions, such as calcium present in the nutrient solution. In the summer application, we tried to correct this effect by adding two different sensors for calcium.

Building the ANN Models. ANNs are multicomponent calibration tools for classification and modelling, which are especially useful for nonlinear systems. Their functioning is inspired by the animal nervous system and its elementary unit is the perceptron or neuron. The properties that characterize a neural network are: the transference function used in the neurons; the network topology; and the learning algorithm used. Among the different ANN structures, the multi-layer perceptron is the most used. It can be defined as a feed-forward network with one or more layers of neurons between the input and output neurons. These additional layers contain hidden neurons that are connected to either the inputs or outputs by weighted connections.

Because of the difficulty of predicting an optimum configuration in advance, selecting the topology of an ANN is the first obstacle in the proposed approach. The ANN structure for the best modelling of a sensor array is obtained by a trial and error procedure. This process includes a combination of the number of neurons of the hidden layer and the transference function used within. These characteristics will define the specific combination leading to the best modelling ability (24) since, according to our previous experience, the remaining characteristics are fixed.

Table 3. Sensitivities to the primary ion obtained for each sensor before and after the in-line application.

Sensor	Based on	Before in-line application (mV/dec)	After in-line application (mV/dec)
NH ₄ ⁺ ^a	Nonactin	56.2	56.4
K ⁺ ^a	Valinomycin	55.4	36.5
Na ⁺ ^a	CMDMM	59.8	60.2
NO ₃ ⁻ ^a	TOAN	-53.7	-53.8
Cl ⁻ ^a	TDMAC	-53.7	-6.4
Generic 1 ^{a, c}	Dibenzo-18-crown-6	50.5	43.2
Generic 2 ^{a, d}	TOAB	-48.2	-53.6
Cl ⁻ ^b	Ag/AgCl	-58.9	-67.9
PO ₄ ³⁻ ^b	Cobalt	-53.2	-53.7

^a Values obtained before and after the winter application; ^b Values obtained before and after the summer application; ^c Response to potassium; ^d Response to nitrate.

The fixed parameters that were common for the two optimised ANNs models were a linear transfer function of the output layer (*purelin*) and a single hidden layer of neurons. These selections were based on previous experience with electronic tongues using potentiometric sensors (25). The learning strategy used was Bayesian Regularization and employed a learning rate of 0.1 and a momentum of 0.4 selected from preliminary tests for its internal parameters. The modelling capacity of the ANN was examined in terms of the root mean squared error (RMSE).

When compared with others, the strategy selected for the learning process (Bayesian Regularization) provided better RMSE value, greater consistency between the predicted and obtained values for the training and a higher significance for the external test set. In addition, an internal validation subset of samples was not necessary since it avoids overfitting by other means (26). This strategy searches for the simplest model that best fits the experimental function while predicting points that have not participated in the training process. Considering the non-linear behaviour of the sensors, two different non-linear transfer functions were considered for the hidden layer, a sigma-shaped function named *tansig* function (27) and a logistic function represented by the *logsig* function.

For the first application, the ANN model had nine input neurons (eight sensors from the array plus the temperature) and five output neurons (the five modelled ions). After the systematic evaluation of configurations, the best training results were obtained with the *logsig* function and seven neurons in the hidden layer. These conditions provided a RMSE value of $6.46 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for the external test set. For the second application, the ANN model had 12 input neurons (11 sensors from the array plus the temperature) and six output neurons (the six modelled ions). The best training results were obtained with the *logsig* function and seven neurons in the hidden layer, which provided a RMSE of $8.01 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for the test set. Graphs comparing obtained vs. expected concentrations for the test set (those solutions that did not intervene in the training process), were produced to check the behaviour of the optimized models. Table 4 shows the parameters of the linear regression of obtained vs. expected concentration values for the test set solutions in the two different applications. The accuracy of the models approached ideality, with unity slopes and zero intercepts (all confidence intervals were calculated at the 95% confidence level). Although the confidence interval for chloride includes the unity slope and zero intercept in the first application, the

regression coefficient is not significant. This unsatisfactory behaviour was corrected in the second application, where chloride sensors based on charged ion-carriers were substituted for one sensor based on Ag/AgCl. Furthermore, good correlation parameters were obtained for phosphate

using the cobalt-based sensor coupled with the pH sensor. For the rest of the analytes (ammonium, potassium, sodium and nitrate), the results obtained were comparable and satisfactory in the two applications.

Table 4. Linear regressions of the comparison graphs obtained for the test set solutions in the two different applications using the optimized ANN models.

Species	First application	Second application
NH ₄ ⁺	$y = (1.11 \pm 0.40)x + (0 \pm 1 \times 10^{-3}), r = 0.806$	$y = (1.10 \pm 0.40)x + (0 \pm 3 \times 10^{-3}), r = 0.835$
K ⁺	$y = (1.08 \pm 0.47)x + (3 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-3}), r = 0.751$	$y = (0.97 \pm 0.45)x + (1 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-3}), r = 0.767$
Na ⁺	$y = (0.98 \pm 0.36)x + (0 \pm 2 \times 10^{-3}), r = 0.802$	$y = (1.06 \pm 0.28)x - (0 \pm 3 \times 10^{-3}), r = 0.903$
Cl ⁻	$y = (0.53 \pm 0.48)x + (3 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-3}), r = 0.480$	$y = (1.00 \pm 0.22)x + (2 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}), r = 0.926$
NO ₃ ⁻	$y = (1.11 \pm 0.12)x - (0 \pm 1 \times 10^{-3}), r = 0.980$	$y = (0.93 \pm 0.24)x + (1 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}), r = 0.904$
PO ₄ ³⁻	-	$y = (1.19 \pm 0.33)x - (1 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-3}), r = 0.905$

Application with Real Samples. Once the applicability of this system was demonstrated, the proposed method was applied to real samples of an existing fertigation experiment. Two groups of samples were studied: nutrient solution and drainage or leachate solution. In addition, these were diluted with clean water by ratios of 1:1, 2:1 and 3:1, and processed in the same way in order to enlarge the number of available real samples and their variability. These samples were treated separately and the relative errors of the logarithm of the concentration for each sample were calculated as usual. The results are summarized in Table 5. The mean absolute relative error for each considered ion is calculated as the mean of the absolute values of errors presented for that ion. This table shows that the relative errors are in specific cases close to 50%, although much lower in average. For example, we obtained a mean relative error of 11.3% for chloride

and very close to 15% for potassium, sodium and nitrate. For ammonium, the average was 23.8%. The worse results were obtained in the determination of phosphate with a mean error of 31.9%, which was probably due to an uncompensated matrix effect (23). The lower concentrations of phosphate normally used in the nutrient solution also made a good performance difficult for this ion. In any case, this fact proves that the cobalt wire electrode, although conceptually simple, is not a good sensor for the direct measurement of phosphate.

Table 6 summarises the comparison of the results obtained using the electronic tongue with those obtained using the Nernstian calibration curve of each specific sensor. This table shows that the relative errors have increased for the six ions due to the interferences and the effect of temperature, especially for potassium and sodium.

Table 5. Relative errors obtained for the logarithm of the concentration, using the electronic tongue in the determination of the six ions in real greenhouse samples during the summer application.

Sample ^a	Rel. Error NH ₄ ⁺ (%)	Rel. Error K ⁺ (%)	Rel. Error Na ⁺ (%)	Rel. Error Cl ⁻ (%)	Rel. Error NO ₃ ⁻ (%)	Rel. Error PO ₄ ⁻ (%)
NS 1	-10.5	10.9	-2.9	-4.0	13.4	59.1
DS 1	-26.6	-2.0	3.8	-4.1	9.9	35.0
NS 2	-15.9	11.4	1.6	12.3	12.1	30.8
NS:CW 1:1	-14.6	11.1	-1.6	-3.5	13.5	20.4
NS:CW 2:1	-13.4	8.5	-8.3	6.9	14.2	25.5
NS 3	26.0	19.0	13.0	12.3	18.1	40.3
NS:CW 3:1	21.4	17.4	12.7	12.0	21.5	29.1
NS:CW 1:1	14.7	17.6	12.5	11.7	25.8	20.9
NS:CW 2:1	13.2	14.7	12.7	11.9	22.1	25.3
NS:CW 3:1	12.5	12.6	12.7	12.0	20.4	28.2
NS:CW 2:1	11.1	12.4	12.7	11.9	22.1	26.5
NS 4	17.6	7.1	13.0	12.3	15.9	49.7
DS 2	-9.1	-1.7	24.4	28.5	11.5	28.4
NS 5	-16.2	-3.0	-3.2	-6.1	14.0	41.7
NS 6	-8.5	23.9	16.0	14.4	20.8	31.5
NS 7	31.5	28.3	16.7	15.4	11.6	41.8
NS:CW 1:1	22.0	30.9	13.2	11.9	22.9	22.6
NS:CW 2:1	29.3	32.1	14.4	13.2	20.9	25.8
NS:CW 3:1	55.3	33.5	15.0	13.7	19.3	25.9
NS 8	49.5	17.6	16.7	15.4	7.3	34.9
DS 3	23.2	12.0	27.2	-3.2	16.4	26.4
DS 4	13.1	7.0	41.3	0.6	13.1	25.9
NS 9	46.8	17.2	-14.5	15.4	-2.9	45.1
NS:CW 3:1	49.1	5.3	-16.0	-7.7	6.6	35.9
NS:CW 2:1	36.4	-13.5	-18.0	-15.2	10.2	29.7
NS:CW 1:1	31.8	-35.4	-19.7	-17.0	11.0	23.6
Mean Absolute Relative Error (%)	23.8	15.6	14.0	11.3	15.3	31.9

^a NS: Nutrient Solution; DS: Drainage Solution; CW: Clean Water.

First In-line Application in the Greenhouse: Winter. With the previously optimized ANN, the primary data were turned into analytical information. The concentration of ammonium, potassium, sodium, chloride and nitrate in the nutrient solution was continuously monitored for more than 20 days during November and December 2005. Three and one-half of these days were analyzed in more detail. Figure 2 shows the concentrations of the considered cations and anions that were predicted by the electronic tongue during these days. In addition, the figure represents

the recorded nutrient solution temperature with the three day-night cycles. The recirculation system was able to maintain the concentration of ammonium, sodium, and nitrate in particular, within a narrow range. Since no daily cyclic variation of concentrations was observed for these three ions, we interpret that the electronic tongue corrected the temperature effect. Although there are times in which the concentrations are out of the training space (Table 2), the optimized ANN model has the capacity of extrapolating new concentrations. The ammonium concentration was between

0.002 and 0.008 mol·L⁻¹, the sodium concentration between 0.002 and 0.004 mol·L⁻¹ and the nitrate concentration was around 0.02 mol·L⁻¹. However, the chloride concentration showed a continuous increase up to 0.02 mol·L⁻¹ that can be caused by the degradation of the electrodes for chloride due to the presence of high concentrations of nitrate. On the other hand, the potassium concentration suffered a continuous decrease down to 0.01 mol·L⁻¹ at the end of the third day. It is difficult for us to physiologically interpret this decrease in potassium concentration given that the

values predicted by the electronic tongue do not directly represent the uptake of the plants, but the imbalance between the ion concentrations added to the nutrient solution and the plant absorption rates of each of them. However, the study could have coincided with the formation of the floral buds, which is the period of maximum absorption of nutrients by the rose tree, especially of potassium (28). In addition to this, a function of the potassium uptake is to protect the plant against low winter temperatures (29).

Table 6. Relative errors obtained for the logarithm of the concentration by direct interpolation in the Nernstian model for the determination of the six ions in real greenhouse samples during the summer application.

Sample ^a	Rel. Error NH ₄ ⁺ (%)	Rel. Error K ⁺ (%)	Rel. Error Na ⁺ (%)	Rel. Error Cl ⁻ (%)	Rel. Error NO ₃ ⁻ (%)	Rel. Error PO ₄ ⁻ (%)
NS 1	11.6	29.1	13.9	21.1	22.4	-46.8
DS 1	31.6	36.8	16.2	34.3	30.4	-43.2
NS 2	12.5	28.3	11.2	29.1	34.1	-46.2
NS:CW 1:1	20.0	38.1	12.2	29.4	29.8	-52.5
NS:CW 2:1	15.5	40.2	13.4	27.5	29.3	-51.4
NS 3	15.9	35.0	70.7	26.9	-26.5	-55.0
NS:CW 3:1	19.5	44.2	70.3	26.9	-21.3	-56.5
NS:CW 1:1	24.2	41.5	70.2	31.9	-11.6	-57.9
NS:CW 2:1	20.1	42.1	70.8	32.0	-9.4	-57.0
NS:CW 3:1	18.2	41.2	71.3	31.4	-8.0	-56.5
NS:CW 2:1	19.6	41.2	71.7	31.2	-6.0	-84.3
NS 4	15.5	43.8	72.1	21.9	-14.0	-55.1
DS 2	37.2	34.6	95.2	39.8	-3.0	-54.0
NS 5	34.4	79.1	74.4	17.7	44.0	-50.3
NS 6	40.0	91.4	22.1	18.2	73.5	17.5
NS 7	33.2	73.8	79.7	-54.1	13.1	17.1
NS:CW 1:1	34.2	54.9	81.3	-42.9	6.9	10.6
NS:CW 2:1	37.0	62.2	108.1	-34.3	18.8	13.0
NS:CW 3:1	40.0	65.5	65.7	-22.1	34.0	14.1
NS 8	33.5	74.2	58.8	-17.2	48.6	-39.5
DS 3	42.3	85.2	61.7	-13.8	41.4	-44.3
DS 4	43.5	92.3	61.6	-12.6	50.1	-43.1
NS 9	38.0	74.0	61.5	-21.4	37.3	-33.7
NS:CW 3:1	37.3	65.4	64.7	-22.4	28.1	-39.8
NS:CW 2:1	38.4	62.2	62.7	-21.7	28.9	-38.0
NS:CW 1:1	40.6	54.9	60.0	-20.7	27.2	-34.1
Mean Absolute Relative Error (%)	29.0	55.0	58.5	27.0	26.8	42.8

^a NS: Nutrient Solution; DS: Drainage Solution; CW: Clean Water.

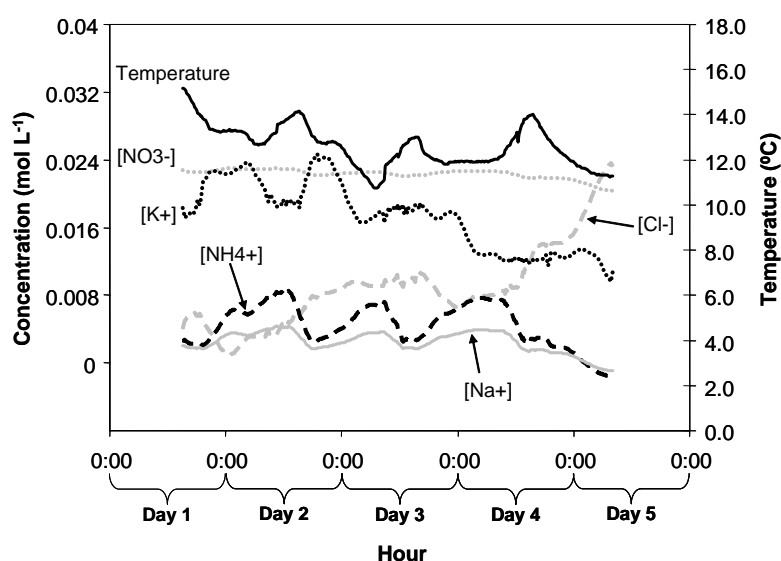


Figure 2. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue during the first application, in wintertime, for the considered ions: ammonium, potassium, sodium, chloride and nitrate, in the nutrient solution during 3 and a half days continuous monitoring.

Second In-line Application in the Greenhouse: Summer. As before, the concentrations of ammonium, potassium, sodium, chloride, nitrate and phosphate were continuously monitored for 13 days during July 2006. Three of these days were studied in more detail. Figure 3 shows the concentrations of the cations and anions predicted by the electronic tongue during these days, as well as the temperature of the nutrient solution. In this case, the recirculation system was able to correct the variations of the concentration of ammonium, sodium, chloride, nitrate and phosphate ions, while correcting for the temperature effect as well. In this summer application, the ammonium concentration was around $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the sodium concentration between 0.015 and $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the chloride concentration around $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the nitrate concentration between 0.005 and $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the phosphate concentration was between 0.001 and $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. In this case, the potassium concentration was not in a narrow range and suffered a continuous increase up to $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. This observation is the opposite of the wintertime behaviour. During summertime, the autotrophic phase and the constitution of new organic

molecules predominate. In summer, the formation of all the photosynthetic system (heterotrophic phase) is brief and happens at the beginning of summer in order to make better use of the daylight. This is also when potassium consumption is preferred. It is likely that the observed behaviour corresponds to a moment when the heterotrophic phase had finished and the dosification system had not been readjusted. Other differences noticed in comparison with the winter application were an increase in the concentrations of the non-essential sodium and chloride ions. This could be caused by the fact that evapotranspiration is higher during the summertime (5). Consequently, the accumulation in the nutrient solution of these ions provided by the drainage solution is also higher. Similarly, a decrease in nitrate concentration is observed. This may be explained by the higher amount of nitrogen that the plants use when diurnal photosynthesis increases (30). Another cause of this decrease can be the fact of maintaining the EC at a fixed value when sodium and chloride are present at high concentration. As we explained in the introductory section, if occurring, it may cause a lesser dosage of fertilizer ions.

Similarly to nitrogen, there is a close relationship between plant phosphorus uptake and carbon metabolism. Besides, the concentration of phosphate in the

formulation of the nutrient solution is always minority. This fact can explain why phosphate had the lowest concentration of the six considered ions.

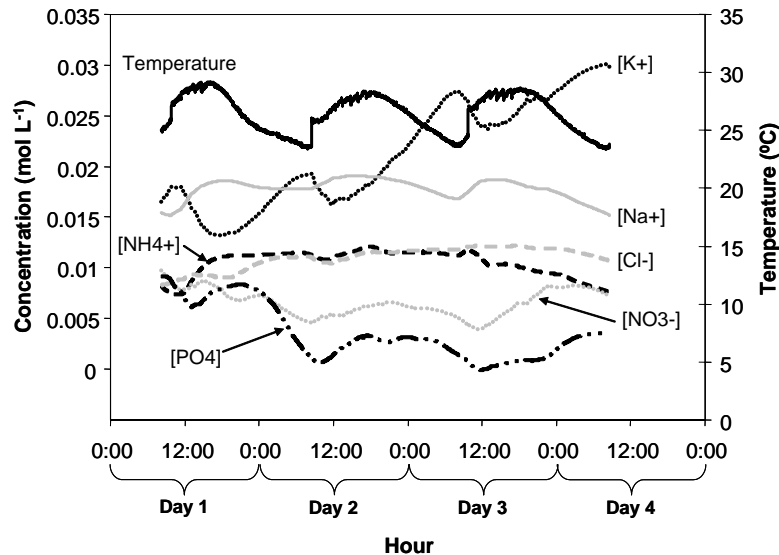


Figure 3. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue during the second application, in summertime, for the considered ions: ammonium, potassium, sodium, chloride, nitrate and phosphate, in the nutrient solution during 3 days continuous monitoring.

Third In-line Application in the Greenhouse: Incorrect Recomposition of the Nutrient Solution.

An incorrect configuration for the system that controls the recomposition of the nutrient solution was established for 5 days in order to check the ability of the analytical system to detect the anomalies. Figure 4 and 5 show the concentrations of the cations and anions predicted by the electronic tongue during these 5 days, with the corresponding temperature. The output of the electronic tongue clearly shows a wave of inappropriate composition of the nutrient solution between the second and fourth days of continuous monitoring. More precisely, the anomaly consisted basically of an important decrease of potassium concurrent with an increase in the concentration of the undesired solutes, sodium and chloride. In fact, the autocorrelation matrix constructed with the values of concentration predicted by the electronic tongue for this third application showed that the most significant correlation was between the sodium and chloride ions,

with a coefficient value of 0.961. This pattern could be explained as an excessive proportion of exhausted recirculated solution in the reformulated nutrient solution. It is remarkable that this type of anomaly would be “invisible” to the in-line measurements used by the dosification equipment, typically based on pH and EC. Furthermore, depending on how frequently the laboratory analysis is performed its detection could be delayed up to several weeks.

In conclusion, two electronic tongues were tested in different seasons: winter and summer. They permitted to observe differences in the calculated concentrations of the ions considered and we tried to explain these variations using physiological arguments. We also confirmed that the sensor based on Ag/AgCl is a good alternative to the carrier-based sensors for chloride in such a complex matrix. Unfortunately, the cobalt-based sensor for phosphate did not present good results and we could only determine it

semiquantitatively. Finally, in the third in-line application, the used electronic tongue was able to detect in real-time the anomaly introduced deliberately in the automatic

recomposition system, demonstrating clearly its utility in control of closed soilless systems.

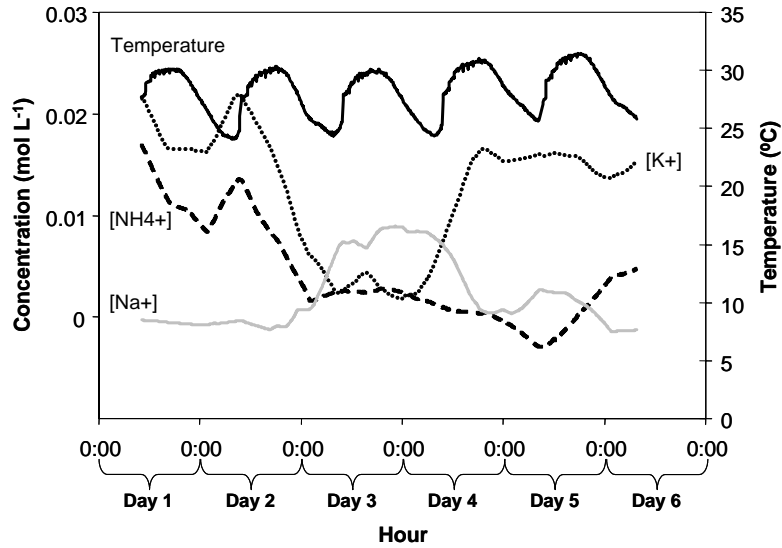


Figure 4. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue during the third application, with incorrect recomposition of the nutrient solution, for the considered cations: ammonium, potassium and sodium, during 5 days continuous monitoring.

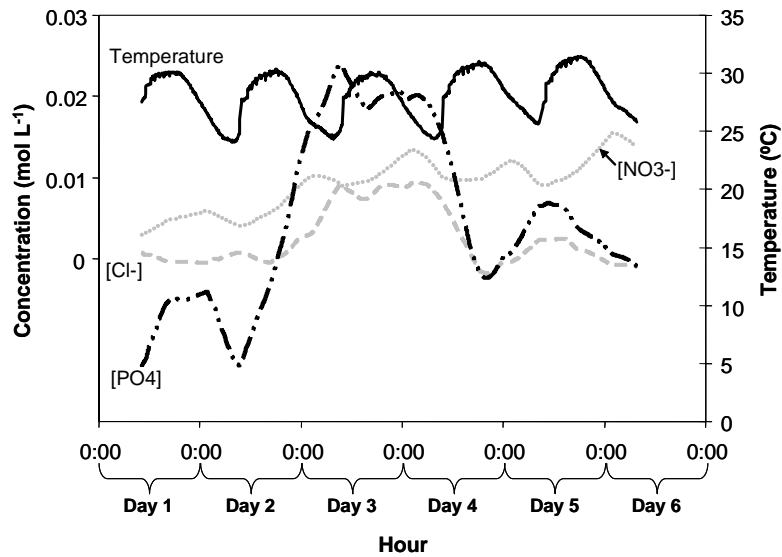


Figure 5. Representation of the concentration values predicted by the electronic tongue during the third application, with incorrect recomposition of the nutrient solution, for the considered anions: chloride, nitrate and phosphate, during 5 days continuous monitoring.

Acknowledgement

This work was supported by Spain's Ministry of Education, Science and Sport, MECD (Madrid), within the framework of TEC2007-68012-C03-02/MIC, Spain's National Institute for Agrofood Research, INIA (Madrid) through the project RTA2007-00034-00-00, and by the Department of Innovation, Universities and Enterprise (DIUE) from the Generalitat de Catalunya.

Literature cited

- (1) Alegret, S. Integrated Analytical Systems. Book in series: Comprehensive Analytical Chemistry; Barceló, D., Ed.; Elsevier: Oxford, U.K., 2003; Vol. XXXIX, Chap. 1.
- (2) Pérez-Benito, D.; Rubio, S. Environmental analytical chemistry; Elsevier: New York, NY, 1998; p. 876.
- (3) Schröder, F. G.; Lieth, J. H. Irrigation control in hydroponics. In Hydroponic production of vegetables and ornamentals; Savvas, D.; Passam, H., Eds.; Embryo Pub.: Athens, Greece, 2002; pp. 263-298.
- (4) Savvas, D. Nutrient solution recycling. In Hydroponic production of vegetables and ornamentals; Savvas, D.; Passam, H., Eds.; Embryo Pub.: Athens, Greece, 2002; pp. 299-344.
- (5) Marfà, O.; Casadesús, J.; Cáceres, R. Recirculación en cultivos sin suelo. In Cultivos sin suelo; Alarcón, A., Ed.; Ediciones de Horticultura S.L.: Reus, Spain, 2006; pp. 175-190.
- (6) Urrestarazu, M. Bases y sistemas de los cultivos sin suelo. In Cultivos sin suelo; Alarcón, A., Ed.; Ediciones de Horticultura S.L.: Reus, Spain, 2006; pp. 23-41.
- (7) Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Di Natale, C.; D'Amico, A. Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids. *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 1965-1983.
- (8) Winquist, F.; Bjorklund, R.; Krantz-Rülcker, C.; Lundström, I.; Östergren, K.; Skoglund, T. An electronic tongue in the dairy industry. *Sens. Actuators B* 2005, 111-112, 299-304.
- (9) Gutiérrez, M.; Gutiérrez, J. M.; Alegret, S.; Leija, L.; Hernández, P. R.; Favari, L.; Muñoz, R.; del Valle, M. Remote environmental monitoring employing a potentiometric electronic tongue. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2007, in press, doi: 10.1080/03067310701441005.
- (10) Gutiérrez, M.; Alegret, S.; Cáceres, R.; Casadesús, J.; Marfà, O.; del Valle, M. Application of a potentiometric electronic tongue to fertigation strategy in greenhouse cultivation. *Comput. Electron. Agric.* 2007, 57, 12-22.
- (11) Fonseca, T.; Lopes, N. P.; Gates, P. J.; Staunton, J. Fragmentation studies on tetronasin by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15, 325-335.
- (12) Gallardo, J.; Alegret, S.; de Román, M. A.; Muñoz, R.; Hernández, P. R.; Leija, L.; del Valle, M. Determination of ammonium ion employing an electronic tongue based on potentiometric sensors. *Anal. Lett.* 2003, 36, 2893-2908.
- (13) Davies, O. G.; Moody, G. J.; Thomas, J. D. R. Optimisation of poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrodes for ammonium ions. *Analyst* 1988, 113, 497-500.
- (14) Shen, H.; Cardwell, T. J.; Cattrall, R. W. The application of a chemical sensor array detector in ion chromatography for the determination of Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ in water samples. *Analyst* 1998, 123, 2181-2184.
- (15) Tamura, H.; Shono, T.; Kimura, K. Coated wire sodium and potassium selective electrodes based on bis(crown ether) compounds. *Anal. Chem.* 1982, 54, 1224-1227.
- (16) Schulthess, P.; Shijo, Y.; Pham, H. V.; Prestch, E.; Ammann, D.; Simon, W. A hydrogen ion-selective liquid-membrane electrode based on tri-n-dodecylamine as neutral carrier. *Anal. Chim. Acta* 1981, 131, 111-116.

- (17) Calvo, D.; Bartrolí, J.; del Valle, M. EIS study of potentiometric membranes selectives to Ca²⁺ employing the new ionophoric antibiotic tetronasin. *Electrochim. Acta* 2006, 51, 1569-1575.
- (18) Morton, R. W.; Chung, J. K.; Miller, J. L.; Charlton, J. P.; Fager, R. S. Extended sensitivity for the calcium selective electrode. *Anal. Biochem.* 1986, 157, 345-352.
- (19) Umezawa, Y. *Handbook of Ion-Selective Electrodes Selectivity Coefficients*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990.
- (20) Pérez-Olmos, R.; Rios, A.; Fernández, J. R.; Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C. Construction and evaluation of ion selective electrodes for nitrate with a summing operational amplifier. Application to tobacco analysis. *Talanta* 2001, 53, 741-748.
- (21) Legin, A.; Makarychev, S.; Kirsanov, D.; Mortensen, J.; Vlasov, Y. Solvent polymeric membranes based on tridodecylmethylammonium chloride studied by potentiometry and electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 2004, 514, 107-113.
- (22) Isildak, I.; Asan, A. Simultaneous detection of monovalent anions and cations using all solid-state contact PVC membrane anion and cation-selective electrodes as detectors in single column ion chromatography. *Talanta* 1999, 48, 967-978.
- (23) Chen, Z.; Grierson, P.; Adams, M. A. Direct determination of phosphate in soil extracts by potentiometric flow injection using a cobalt wire electrode. *Anal. Chim. Acta* 1998, 363, 191-197.
- (24) Bos, M.; Bos, A., Van der Linden, W. E. Data processing by neural networks in quantitative chemical analysis. *Analyst* 1993, 118, 323-328.
- (25) Gallardo, J.; Alegret, S.; Muñoz, R.; de Román, M.; Leija, L.; Hernández, P. R.; del Valle, M. An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 248-256.
- (26) Demuth, H.; Beale, M. *Neural Network Toolbox User's Guide*; Mathworks Inc.: Natick, MA, 1992.
- (27) Freeman, J. A.; Skapura, D. M. *Neural Networks, Algorithms, Applications, and Programming Techniques*; Addison-Wesley: Reading, MA, 1991.
- (28) Gutiérrez, R. *Caracterización y modelización del crecimiento del rosal en cultivos con arqueado de tallos*, PhD dissertation; Universidad Politécnica de València: València, Spain, 2002; p. 161.
- (29) Adams, C. R.; Bamford, K. M.; Early, M. P. *Principles of Horticulture*; William Heinemann: London, U.K., 1984.
- (30) Le Bot, J.; Adamowicz, S.; Robin, P. Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Sci. Hortic.* 1998, 74, 47-82.