

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**SISTEMA ELECTRÓNICO DE UN DISPOSITIVO SENSOR
DE TOXINA AMNÉSICA DE MAREA ROJA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

GASTÓN MARTÍNEZ ROMO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. MAYO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**SISTEMA ELECTRÓNICO DE UN DISPOSITIVO SENSOR
DE TOXINA AMNÉSICA DE MAREA ROJA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

GASTÓN MARTÍNEZ ROMO

Aprobada por:



Dr. Oscar Roberto López Bonilla
Director de tesis



Dra. Graciela Guerra Rivas
Sinodal



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Sinodal



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal

RESUMEN de la tesis de Gastón Martínez Romo, presentada como requisito para obtener el título de Bioingeniero. Ensenada, Baja California. Mayo de 2014

SISTEMA ELECTRÓNICO DE UN DISPOSITIVO SENSOR DE TOXINA AMNÉSICA DE MAREA ROJA

Existen especies de algas marinas que bajo determinadas condiciones ambientales pueden generar los denominados “florecimientos algales nocivos (FANs), fenómenos donde crecen desmedidamente y llegan a producir sustancias nocivas que tienen un fuerte impacto para el ecosistema, causando problemas de salud e incluso la muerte tanto a organismos marinos como al ser humano. La intoxicación amnésica por moluscos (ASP) es un síndrome causado por la toxina llamada ácido domoico (AD). Este envenenamiento ocurre por la ingestión de moluscos durante o después de FANs de especies productoras de la toxina, ya que ésta se acumula en los organismos, los síntomas pueden ser leves, pero en casos severos inducir al coma e incluso la muerte. La ocurrencia de FANs muestra un aumento progresivo, por ello científicos e investigadores concluyen que se deben implementar programas que abarquen el estudio, monitoreo, predicción y regulación de la toxina. En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la detección y cuantificación de la toxina, tomando como base la separación por cromatografía en capa fina y métodos espectrofotométricos. Se corrieron muestras de tejido biológico en placas cromatográficas para separar el AD de los demás componentes. Posteriormente, se revelaron las placas con una sustancia química (revelador) que reaccionó con la toxina formando un complejo AD-revelador. Finalmente se midió la disminución de un haz de luz proveniente de un LED cuya longitud de onda fue similar a la de máxima absorbancia del complejo. Esta medición se llevó a cabo utilizando el sensor TSL202R, funcionando con señales generadas y reguladas por un ADuC706x, con parámetros que fueron definidos desde una aplicación de computadora programada en Visual Studio. Las respuestas del sensor se digitalizaron por el microcontrolador y enviaron a la computadora para ser analizadas. Se definieron 4 tipos de indicadores y generaron modelos de predicción al considerarlos como variable en función de la cantidad de AD cargada en las placas. El mejor modelo obtenido tuvo una correlación lineal $r = 0.99424$. El presente trabajo concluye como un estudio exploratorio del método de detección, generándose resultados positivos e información que define el rumbo de futuras investigaciones.

Palabras clave: FANs, AD, ASP, Cuantificación.

A todos los que estuvieron
ahí, porque sin ellos, ni esto ni
yo seríamos.

AGRADECIMIENTOS

- ✧ Al Dr. Oscar Roberto López Bonilla, la Dra. Graciela Guerra Rivas, la Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez y la Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez, por guiarme, por estar ahí para enseñarme y aprender conmigo, por dedicarnos y confiarnos su tiempo a este trabajo y a mí, por permitirme tener con ellos un trato más allá de lo académico o de lo laboral.
- ✧ A la UABC, la FIAD, la FCM, el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina, que me abrieron sus puertas para aprender y trabajar.
- ✧ A mi familia y amigos que comprendieron mi cansancio y falta de tiempo en este camino, que no titubearon en brindarme su apoyo y confianza, por estar ahí incondicionalmente.
- ✧ A Carlos, David, Héctor, Iván y Nadia por estar ahí siempre, ya sea trabajando a mi lado, esperándome o detrás de mí enseñándome a tener paciencia, por ser los hermanos que la vida me permitió elegir.
- ✧ A Marla, Nallely, Marylena, Annette, Elva y Carmen, por haberme acompañado en ese laboratorio, por haberme ayudado y hacer esos días más amenos.

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Florecimientos algales nocivos.	1
I.2. Intoxicación amnésica por moluscos.	3
I.3 Toxina amnésica.....	4
I.4. Ley de Beer-Lambert.....	6
I.5. Espectroscopia molecular.	7
I.6. Sensor TSL202R.	9
I.7. Microcontrolador ADUc706x.	10
I.8. Visual Studio y Visual Basic.....	11
I.9. Cromatografía en capa fina.	11
I.10. Terminología.	13
II. ANTECEDENTES.....	15
II.1. Métodos de sensado.....	15
II.2. Investigación previa.....	16
II.3. Desarrollo de un método para detección de ácido domoico.	17
III. HIPÓTESIS:.....	17
IV. OBJETIVOS.....	18
IV.1. Objetivo general.	18
IV.2. Objetivos específicos.....	18
V. METODOLOGÍA.	19
V.1. Condiciones de operación del sensor TSL202R.	19
V.2. Posición del LED.....	21
V.3. Programación del microcontrolador ADuC706x.	22

V.3.1. Señales de reloj y entrada serial.....	23
V.3.2. Regulación de la intensidad del LED.	23
V.3.3. Conversión analógica-digital.....	24
V.4. Interfaz microcontrolador-computadora.....	25
V.5. Divisor de voltaje.	25
V.6. Armazón del sensor.....	27
V.7. Desarrollo de cromatografías y sensores.	28
V.7.1. Determinación de condiciones del sensado.....	28
V.7.2. Cromatografías y sensores preliminares.	29
V.7.3. Cromatografías y sensores finales.....	29
V.8. Definición y cálculo de indicadores.	30
V.8.1. Cálculo de irradiancia.	30
V.8.2. Cálculo de indicadores.	32
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
VII. RESULTADOS.....	34
VII.1. Operación del sensor.....	34
VII.2. Programación del ADuC706x.....	36
VII.3. Interfaz ADuC706x-computadora y parámetros de operación.	40
VII.4. Divisor de voltaje.	43
VII.5. Parámetros de sensado.....	45
VII.6. Resultados de los ensayos.	46
VII.7. Resultados del análisis estadístico.....	50
VIII. DISCUSIÓN.....	52
IX. CONCLUSIONES.....	64

X. REFERENCIAS.....	66
XI. ANEXOS.	70
XI.1. SPSS, Tabla de resultados de normalidad, datos 3 réplicas.	70
XI.2. SPSS, Tabla de resultados de normalidad, datos cada réplica.	71
XI.3. SPSS, Tabla de resultados de ANOVA de un factor	72

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Métodos para detección de ácido domoico.....	15
2	Concentraciones y cantidad de AD cargadas en las placas.....	30
3	Indicadores y variantes calculados.....	33
4	Frecuencias de operación verificadas en la configuración en serie.....	35
5	Características LED1 y LED2.....	40
6	Divisor de voltaje en distintas condiciones del sensor.....	45
7	Indicador 1.....	48
8	Indicador 2.....	49
9	Indicador 3.....	49
10	Indicador 4.....	49
11	Pruebas estadísticas realizadas sobre los conjuntos de datos.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Placa de cromatografía en capa fina.....	13
2	Configuración en serie del sensor TSL202R.....	20
3	Configuración en paralelo del sensor TSL202R.....	20
4	TSL202R funcionando en serie y siendo verificado en osciloscopio.....	21
5	Triángulo considerado para el cálculo de la distancia del LED.....	22
6	Divisor de voltaje común.....	26
7	Proceso de elaboración de estructura para el sensor.....	28
8	Verificación del funcionamiento de los pixeles del circuito armado.....	36
9	SI = 50 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500mV$, SI=1V, CLK=2V.....	37
10	SI = 100 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500mV$, SI=1V, CLK=2.....	37
11	SI = 200 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500mV$, SI=1V, CLK=2V.....	38
12	SI = 250 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500mV$, SI=1V, CLK=2V.....	38

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

Figura		Página
13	SI = 500 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.....	38
14	SI = 2 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.....	39
15	Haz de luz de LED1 y LED2.....	39
16	Interfaz ADuC706x-computadora.....	42
17	Archivo de registros.....	43
18	V_{out} , saturación, antes-después del divisor de voltaje, factor=1/4.....	44
19	V_{out} , luz ambiente, antes-después del divisor de voltaje, factor=1/4.....	44
20	V_{out} , oscuridad, antes-después del divisor de voltaje, factor=1/4.....	45
21	Comportamiento de la reacción en el tiempo.....	47
22	Irradiancia incidente sobre el sensor.....	48
23	Línea real y recta de ajuste I-4-4.....	50

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. Florecimientos algales nocivos.

Existen unas 5000 especies de algas en el plancton marino. Se calcula que alrededor de 300 pueden presentar un crecimiento desmedido bajo determinadas condiciones ambientales. Debido a que estas especies producen ciertas sustancias nocivas, estos fenómenos son denominados “florecimientos algales nocivos (FANs)”. Durante estos florecimientos la cantidad de organismos por litro de agua puede ser excesiva, sobrepasando el millón de células, lo que llega a ocasionar cambios en la coloración del agua, ya que el rojo es el color más común, también son llamados “mareas rojas”.

Los FANs tienen un fuerte impacto para el ecosistema ya que las algas planctónicas representan uno de los componentes principales de la dieta de moluscos, larvas de crustáceos y peces que son aprovechados por la industria acuícola; pueden llegar a causar problemas de salud e incluso la muerte tanto a peces, moluscos, mamíferos acuáticos y aves marinas como al ser humano, de ahí el calificativo de “nocivos” (Hallegraeff, 1993; Anderson *et al.*, 2002). Se han definido dos tipos de FANs, los tóxicos y los no tóxicos con base en el origen de la peligrosidad del florecimiento. Los FANs tóxicos son aquellos en los que las especies de algas producen toxinas que se bioacumulan en los organismos marinos y se biomagnifican a lo largo de las cadenas tróficas, llegando a causar envenenamientos a los mismos o a quienes se alimentan de ellos. Unas 40

especies de algas pueden producir ficotoxinas marinas altamente tóxicas, siendo las principales las toxinas paralíticas, diarreicas, amnésicas, neurotóxicas, azaspirácidas y las ciguatoxinas (Hallegraeff, 1993; FAO, 2005; CIIEPH y HSPH, 2013).

La característica que define a los FANs no tóxicos es que la nocividad del florecimiento al ecosistema se debe al exceso de la biomasa producida. La cantidad de oxígeno disuelto en el agua disminuye, generándose condiciones hipóxicas y anóxicas. El oxígeno es consumido por las microalgas al respirar durante la noche o periodos de luz tenue. En mucho mayor medida el oxígeno es requerido para la respiración de las bacterias que degradan materia orgánica proveniente del decaimiento del florecimiento o de organismos que murieron como resultado de la alteración al ecosistema. Las microalgas en exceso pueden obstruir y dañar las branquias de peces e invertebrados o formar espumas en la superficie marina que obstruyen el paso de la luz, evitando que la vegetación submarina realice adecuadamente la fotosíntesis (Hallegraeff, 1993; Anderson *et al.*, 2002; FAO, 2005; Heisler *et al.*, 2008; Band-Schmidt *et al.*, 2011; CIIEPH y HSPH, 2013).

La extensión de los FANs en estuarios y regiones costeras, así como la identificación de especies tóxicas a lo largo del mundo se están incrementando. Se desconocen las razones, pero se ha llegado a la conclusión de que tres factores importantes son la eutroficación de los ecosistemas debida a la contaminación, el calentamiento global y el creciente interés por investigar este fenómeno debido a los daños que ocasiona a la salud humana, al ecosistema y

a la economía (Anderson *et al.*, 2002; GEOHAB, 2006; Heisler *et al.*, 2008; CIIEPH y HSPH, 2013).

Los FANs ocurren de forma común en México. En el océano Pacífico, el Golfo de México y el mar Caribe, al igual que en el resto del mundo, la ocurrencia de FANs muestra un aumento progresivo. Por esta razón, un gran número de científicos e investigadores concluyen que se deben implementar programas que abarquen el estudio de estos fenómenos y de los organismos que los ocasionan, contemplando el monitoreo, la predicción y la regulación de la presencia de toxinas en mariscos (IOC, 1995; GEOHAB, 2006; Band-Schmidt *et al.*, 2011).

I.2. Intoxicación amnésica por moluscos.

La intoxicación amnésica por moluscos (ASP por sus siglas en inglés, *amnesic shellfish poisoning*) es un síndrome causado por la toxina llamada ácido domoico (AD). Este envenenamiento ocurre por la ingestión de moluscos durante o después de FANs de especies productoras de la toxina, ya que ésta se acumula en los organismos.

Se registraron casos de ASP en humanos por primera vez en 1987 en Canadá, el total fue de 143 intoxicaciones y 4 muertes, la toxina fue producida por la especie de diatomea *Pseudo-nitzschia pungens f. multiseries*. A partir de este suceso se han vigilado las costas donde se identifican la toxina o especies productoras para evitar nuevas intoxicaciones. El monitoreo ha consistido

principalmente en análisis alimentarios rutinarios para evitar que productos contaminados sean comercializados y consumidos, evitando así daños a la salud pública y pérdidas económicas al sector pesquero (FAO, 2005).

Durante la ASP se presentan dos tipos de síntomas; los gastrointestinales, siendo los más comunes los calambres abdominales, náuseas, vómitos y diarreas; y los neurológicos, de los cuáles los más importantes son cefaleas, desorientación, convulsiones y pérdida de la memoria a corto plazo. Es precisamente este último síntoma el más característico de la intoxicación por AD y a él se debe su nombre. Los síntomas pueden ser leves, pero en casos severos inducir al coma e incluso la muerte.

Las áreas del cerebro afectadas por el consumo de productos contaminados por AD son el hipocampo y la amígdala, donde se presentan necrosis y pérdida neuronal. Lo anterior explica la amnesia anterógrada, ya que el hipocampo interviene en la consolidación de la memoria reciente (FAO, 2005; Alvarez-Falconí, 2009; Lefebvre y Robertson, 2010).

I.3 Toxina amnésica.

La toxina fue aislada por primera vez en Japón en 1958 de la rodofita *Chondria armata*, identificando sus propiedades como antihelmíntico e insecticida. Se tienen registradas 6 especies de algas rojas y 14 especies de diatomeas como productoras de AD. Entre las diatomeas, las especies del género *Pseudo-nitzschia* son las productoras más importantes; en 1995,

estaban identificadas apenas 5 especies de este género, número que se incrementó a 9 en el año 2000 y a 12 en 2010. En aguas mexicanas se han identificado aproximadamente 21 especies del género *Pseudo-nitzschia*, de las cuales por lo menos 10 son tóxicas o potencialmente tóxicas al producir AD. En el golfo de México estas especies son *P. australis*, *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. galaxiae*, *P. pseudodelicatissima* y *P. pungens*, mientras que en el Pacífico encontramos a *P. australis*, *P. brasiliana*, *P. fraudulenta* y *P. pungens* (Hasle, 2002; Lefebvre y Robertson, 2010; Trainer et al., 2012).

El AD es un aminoácido no proteico, es un polvo blanco, cristalino, incoloro, polar y soluble en agua. Su molécula está constituida por un anillo de prolina, tres grupos carboxílicos y un grupo amino que permiten la existencia de 5 formas iónicas según el pH del medio. La estructura del AD tiene algunas similitudes con la de los ácidos kaínico, glutámico y aspártico, lo cual permite que actúe como análogo del glutamato y clasificarlo dentro del grupo de los cainoides.

La neurotoxicidad del AD se debe a su agonismo con algunos de los receptores glutámicos presentes en el cerebro de mamíferos. El ácido glutámico es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro, es un componente indispensable para la transmisión sináptica. La sobreexcitación de los receptores glutámicos provoca una cascada de reacciones que pueden llevar a producir daño o muerte celular.

El AD es altamente hidrofílico, por lo que al ser administrado por vía parenteral en el organismo es depositado en la corriente sanguínea, se

distribuye a todos los tejidos del cuerpo y es eliminado a través de la orina rápidamente. En cambio, si es administrado por vía oral, la absorción y eliminación son lentas. La biotransformación en el organismo es prácticamente nula, pero depende del tiempo que tarde en ser eliminado. (Jeffery *et al.*, 2003; FAO, 2005; Alvarez-Falconí, 2009; Lefebvre y Robertson, 2010).

I.4. Ley de Beer-Lambert.

La Ley de Beer habla de la relación entre la absorción de luz por un gas o solución y la concentración de la fase absorbente. En cambio, la Ley de Lambert trata sobre la relación entre la absorbancia de la luz y el camino recorrido por ella. En conjunto, estas leyes describen cómo un rayo incidente I_0 penetrando un recipiente con una solución de concentración c que recorre una distancia x , sufrirá una disminución de la intensidad del rayo I , y que una distancia extra dx supondrá una disminución extra de la intensidad dI . El manejo matemático de estas fórmulas lleva a:

$$\text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon c x \quad (1)$$

donde:

$$\frac{I_0}{I} = \text{Transmitancia.}$$

ϵ = Constante de absortividad molar.

$$\text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \text{Absorbancia.}$$

En el análisis espectrofotométrico es preferible calcular la transmitancia, y en base a ella determinar la absorbancia (Walton y Reyes, 2005).

I.5. Espectroscopia molecular.

La radiación electromagnética es un tipo de energía que se transmite a través del espacio a gran velocidad. Se desplaza transversalmente a la dirección en que se propaga y no requiere un medio de transporte, lo cual le permite propagarse en el vacío. Además de comportarse como onda, la radiación electromagnética puede ser considerada como una corriente de paquetes discretos de ondas que se comportan como partículas denominadas fotones. Esta naturaleza dual de la luz permite explicar fenómenos físicos como la absorción y emisión de energía radiante.

Los fotones tienen una cantidad de energía E denominada cuanto, esta energía es directamente proporcional a su frecuencia ν y a la constante de Planck h , lo que se muestra a continuación:

$$E = h\nu \tag{2}$$

donde:

E = Energía del fotón (J).

$h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

ν = Frecuencia (Hz).

Una molécula que es expuesta a radiación electromagnética puede absorber un fotón dependiendo de dos factores, la energía del fotón y la diferencia de energía entre dos estados electrónicos de la molécula, a este fenómeno se le denomina resonancia, la absorción se da cuando se cumple la siguiente ecuación:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu \quad (3)$$

donde:

ΔE = Diferencia entre los estados de energía.

E_1 = Estado de energía basal.

E_2 = Estado de energía excitado.

$h\nu$ = Energía del fotón absorbido.

Las moléculas son muy selectivas respecto a las frecuencias que absorben, lo cual depende de los grupos funcionales y por ende su estructura molecular y los tipos de enlaces que posee. Los instrumentos utilizados para medir las absorbancias se llaman espectrómetros y permiten identificar las energías fotónicas particulares de las moléculas o complejos. Una molécula puede absorber energía a distintas frecuencias, la relación entre éstas y la absorción se denomina espectro, a partir del cual se puede obtener información estructural de las moléculas y complejos (Skoog *et al.*, 2001; Carey, 2006).

I.6. Sensor TSL202R.

TSL202R es un sensor producido por la empresa Texas Advanced Optoelectronics Solutions. Es un arreglo lineal de dos grupos de 64 pixeles conformados cada uno por fotodiodo y circuito integrador que pueden funcionar en paralelo, como dos sensores independientes de 64 pixeles o en serie como un solo arreglo de 128 pixeles, según la conexión del dispositivo. Para funcionar, el sensor requiere de dos señales lógicas externas, una entrada serial (SI) que activará el sensor cuando cambien a un 1 lógico y una señal de reloj (CLK) que indicará la frecuencia de salida a la cual se proporcionarán los valores de voltaje de los pixeles. La luz incidente en los fotodiodos genera corriente eléctrica que es integrada por un circuito interno, generando un valor de voltaje (V_{out}), cuyo comportamiento está dado por la fórmula:

$$V_{out} = V_{drk} + (R_e)(E_e)(t_{int}) \quad (4)$$

donde:

V_{out} = Voltaje de salida (V).

V_{drk} = Voltaje de salida en condiciones de oscuridad (V).

R_e = Responsividad del sensor a determinada longitud de onda.

E_e = Irradiancia incidente ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$).

t_{int} = Tiempo de integración (s).

El tiempo de integración es el tiempo transcurrido entre dos entradas seriales (Texas Advanced Optoelectronics Solutions [TAOS], 2002).

I.7. Microcontrolador ADUc706x.

ADUc706x es un sistema de adquisición de datos que tiene integrado una serie de componentes que le permiten desarrollar distintas funciones. Sus características más importantes son: posee el MCU ARM7TDMI, memoria Flash/EE y convertidores analógico-digital Σ - Δ multicanal de 24 bits. Incluye un oscilador y un circuito PLL que le permiten operar a una frecuencia de hasta 10.24 MHz, puede operar en un modo de bajo consumo, posee fuentes de corriente para excitar componentes desde 200 μA a 2 mA, interfaces de

comunicación SPI, I₂C y UART, 6 canales PWM, 14 pins de propósito general, fuente de poder digital a 2.5 V y 4 contadores multipropósito integrados, de los cuales uno es configurable como despertador y otro como watchdog (Analog Devices, 2012).

I.8. Visual Studio y Visual Basic.

Visual Studio es una familia de productos, herramientas y tecnologías que puede utilizarse para compilar aplicaciones eficaces y de alto rendimiento para equipos de escritorio, web, teléfonos y consolas de juegos.

Visual Basic es un lenguaje de programación de alto nivel de propósito general para generar aplicaciones en Visual Studio. Fue diseñado para que principiantes puedan aprender a utilizarlo fácilmente, y que usuarios más experimentados puedan sacarle gran provecho. La sintaxis es similar al inglés y por lo tanto fácil de comprender. Se considera una gran herramienta, flexible y productiva (Microsoft, 2013).

I.9. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina es un método para analizar muestras mediante la separación de sus componentes. El método tiene tres aplicaciones principales; determinar el número de componentes en una muestra; identificación de componentes y purificación de compuestos. El método se basa en cargar una mezcla de compuestos en una placa cromatográfica hecha de una fase estacionaria sobre un soporte mecánico, el borde de la placa se pone

en contacto con un solvente que corre sobre la placa por capilaridad y arrastra los distintos compuestos a través de la placa. La distancia que recorre cada compuesto depende de la polaridad del solvente, el compuesto y la fase estacionaria, el pH del solvente, la densidad de la fase estacionaria, la cantidad de compuesto cargada y otros factores a considerar. Por lo anterior es que dependiendo de los compuestos presentes y los que se desean separar, se tiene que preparar una mezcla de solventes adecuada para las características del sistema (Striegel y Hill, 1997).

Se ejemplifican 2 recipientes, en el recipiente 1 se muestra una placa cargada recién puesta en contacto con el solvente, mientras que en el recipiente 2 se ejemplifica una placa corrida, el solvente sube por capilaridad y los compuestos son separados según su interacción con la fase estacionaria y el solvente. En la zona de la placa donde se cargó la muestra pueden quedar residuos de compuestos que no son arrastrados por el solvente (Figura 1).

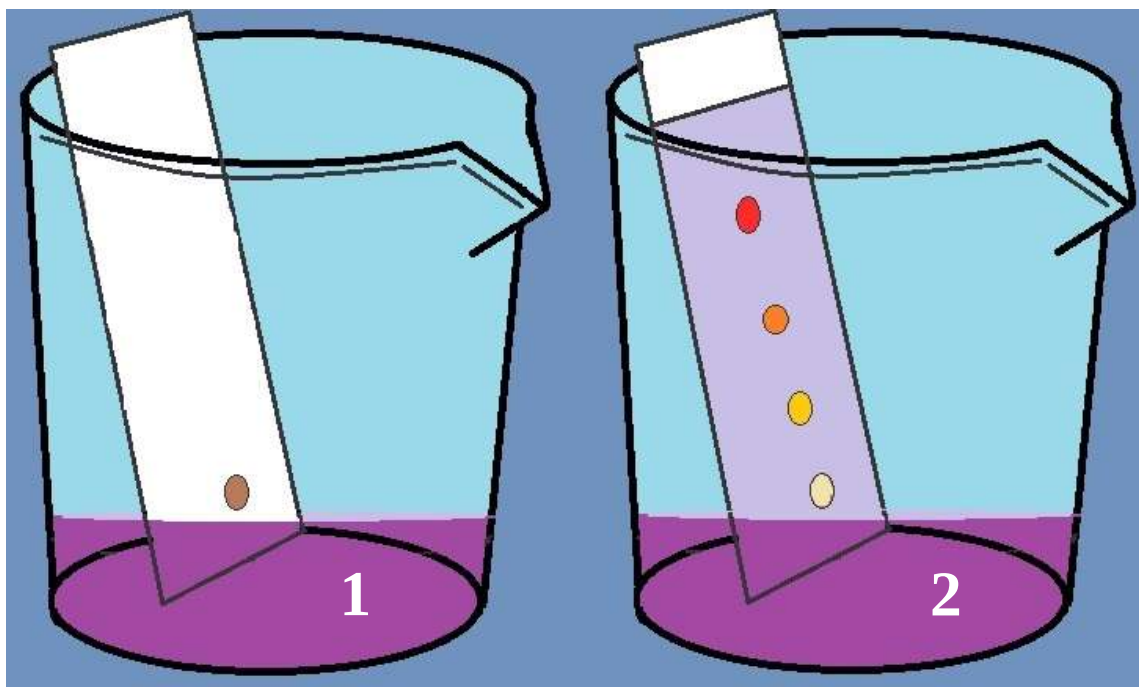


Figura 1. Placa de cromatografía en capa fina.

I.10. Terminología.

Exclusivamente para la comprensión del presente documento:

- ✧ Sistema electrónico: dispositivo formado por los componentes ópticos, circuitería, fuente de voltaje y microcontrolador. Permite hacer mediciones ópticas, y enviar una serie de valores digitales a una computadora mediante comunicación serial.
- ✧ Componentes ópticos: LED y sensor TSL202R.
- ✧ Circuitería: Cables, resistencias y capacitores utilizados para comunicar los componentes, armar el divisor de voltaje, hacer funcionar los componentes y filtrar ruido.

- ✧ Fuente de voltaje: Fuente de poder utilizada para generar voltajes de -2.5 V para polarizar el LED y 5 V para alimentar el sensor TSL202R.
- ✧ Microcontrolador: ADuC706x.
- ✧ Muestra: muestra de tejido biológico sometida previamente a varios procesos para ser analizada (homogenización, filtración, separación por cromatografía en capa fina y revelado químico).
- ✧ Absorbancia: Valor que será determinado de forma indirecta para las muestras a una λ cercana al pico de absorción máxima del complejo químico obtenido del proceso de revelado.
- ✧ Sensado: registro de un par de datos t_i - V_{out} por cada pixel del sensor (configurable a 64 o 128 pixeles).
- ✧ t_i : tiempo de lectura de cada uno de los pixeles, el cual es constante y configurable por programación entre 0.2 μ s y 200 μ s.
- ✧ V_{out} : voltaje de salida del sensor TSL202R expuesto a un haz de luz monocromático proveniente de un diodo LED en condiciones de oscuridad.
- ✧ Saturación del sensor: se da cuando uno o más de los pixeles reciben la suficiente luz para que su voltaje de salida sea máximo (3.5 V) por lo que los sensados dejan de ser representativos de las mediciones.
- ✧ Toxina: ácido domoico / toxina amnésica / analito.
- ✧ Revelador: sustancia química utilizada para detectar la presencia de AD mediante la formación de un complejo toxina-revelador con propiedades ópticas bien definidas.

II. ANTECEDENTES.

II.1. Métodos de sensado.

Existen distintos métodos para la detección y cuantificación de AD, algunos de los cuales se describen brevemente en la Tabla I. Otras alternativas para la detección y cuantificación de AD son el diseño de sensores basados en los métodos mencionados anteriormente, como los inmunosensores basados en resonancia del plasmón superficial (SPR por su siglas en inglés, *surface plasmon resonance*) (Lotierzo *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2006), inmunosensores electroquímicos (Kreuzer *et al.*, 2002), biosensores basados en fluorescencia (McGrath, 2013), separación por cromatografías de afinidad, etc. (Kubo *et al.*, 2006).

Tabla I. Métodos para detección de ácido domoico.

(Jeffery *et al.*, 2004; FAO, 2005; Lefebvre y Robertson, 2010).

Bioensayos	
En ratón	Se inyecta la toxina al animal y se registra el tiempo en morir así como los síntomas presentados
De enlace de receptores	Identifica la disminución de neurotransmisores antagónicos marcados
De cortes hipocampales	Se registran las respuestas neuronales extracelulares de ciertas regiones del cerebro
Ensayos Bioquímicos	
Varios	Utilizan el método ELISA con anticuerpos específicos para la toxina
Ensayos químicos	
Cromatografía en capa fina.	Se purifican extractos y se corren sobre placas para separar sus componentes, se nebuliza con ciertos reactivos que provocan un cambio de color y se identifica la presencia del analito

Análisis de aminoácidos	Las muestras son separadas por cromatografía de intercambio iónico, y las fracciones son analizadas por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm
Cromatografía líquida	Está validada como método oficial de detección, Se aísla el AD de forma selectiva para cuantificarse por métodos espectrofotométricos
Electroforesis capilar	Se carga tejido en un capilar con solución tampón, se aplica una diferencia de potencial en los extremos, las sustancias migran dependiendo su carga y son identificadas mediante un fotodetector
Espectrometría de masas	Se provoca una electronebulización de las muestras y el detector registra patrones que son distintos para cada átomo, en base a lo cual se determina la presencia y cantidad de AD

II.2. Investigación previa.

En el laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la Universidad Autónoma de Baja California se trabajó anteriormente con la toxina marina ácido domoico. Se llevó a cabo investigación en cuanto a la separación por cromatografía en capa fina, identificando posibles soportes para la fase estacionaria y tipos de la misma. Se hicieron pruebas con distintas sustancias para revelar la muestra, identificando las que permitían diferenciar la toxina de otros compuestos que pudieran representar ruido para la cuantificación. Se determinaron los espectros de absorción de los complejos toxina-revelador. Lo anterior forma la base del presente trabajo y otros que se realizan simultáneamente con el fin de desarrollar un método para la detección y cuantificación de la toxina (Guerra-Rivas, entrevista, junio 1, 2013).

II.3. Desarrollo de un método para detección de ácido domoico.

En el presente trabajo se desarrolla una metodología para la detección y cuantificación de la toxina, tomando como base la separación por cromatografía en capa fina y métodos espectrofotométricos. Se busca correr muestras de tejido biológico en placas cromatográficas para separar el AD de los demás componentes. Posteriormente, revelar las placas con una sustancia química (revelador) que reaccione con la toxina para formar un complejo AD-revelador. Finalmente, poder medir la disminución de un haz de luz proveniente de un LED cuya longitud de onda sea similar a la de máxima absorbancia del complejo. Esta medición se llevará a cabo utilizando el sensor TSL202R, funcionando con señales generadas y reguladas por un ADuC706x, con parámetros que puedan ser definidos desde una computadora. Las respuestas del sensor serán digitalizadas por el microcontrolador y enviadas a la computadora para su análisis y definir un modelo de predicción para determinar la cantidad de toxina amnésica en otras muestras.

III. HIPÓTESIS:

- ✧ La cantidad de ácido domoico en una muestra es cuantificable mediante un modelo predictivo generado con base en la regresión de datos digitalizados por el sistema electrónico.

- ✧ Algunas de las curvas de regresión generadas al contrastar indicadores (calculados a partir de los sensados de muestras) en función de la cantidad de AD, muestran un comportamiento lineal y poseen la suficiente correlación como para ser utilizadas como modelos de predicción.
- ✧ El límite de detección del método analítico propuesto es menor que la concentración máxima de toxina permitida en mariscos para consumo.

IV. OBJETIVOS.

IV.1. Objetivo general.

- ✧ Desarrollar un dispositivo electrónico que permita detectar y cuantificar ácido domoico en muestras de mariscos.

IV.2. Objetivos específicos.

- ✧ Diseñar una interfaz que permita modificar las condiciones de operación del sensor y registrar en una computadora el sensado de las muestras.
- ✧ Definir indicadores a obtener a partir de los datos del sensado, que reflejen el comportamiento lineal de la absorbancia.

- ✧ Crear curvas de regresión de indicadores en función de la cantidad de toxina y evaluar cuál de ellas representa el mejor modelo predictivo.

V. Metodología.

V.1. Condiciones de operación del sensor TSL202R.

Se armaron en placas de pruebas los circuitos descritos en las hojas de especificaciones proporcionadas por el fabricante del sensor TSL202R para hacer pruebas con sus configuraciones en serie y paralelo (Figura 2 y Figura 3). Se modificaron las frecuencias de reloj (f_{CLK}) producidas con un generador de funciones y de entrada serial (f_{SI}) generada con un temporizador LM555 y un inversor lógico respectivamente. La respuesta V_{out} fue analizada mediante un osciloscopio, verificando el funcionamiento del sensor a distintos parámetros de operación recomendados por el fabricante. Se aprecia al sensor siendo excitado con un LED y revisando su funcionamiento con el osciloscopio de NI ELVIS II (Figura 4).

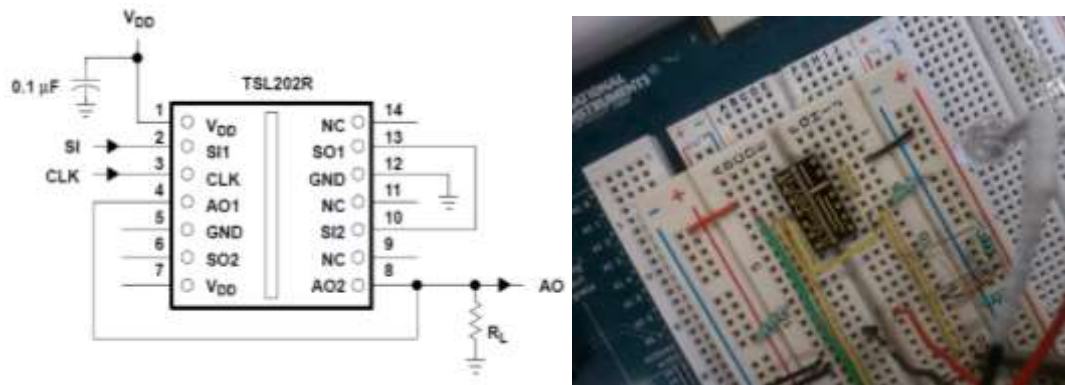


Figura 2. Configuración en serie del sensor TSL202R.

(TAOS, 2002)

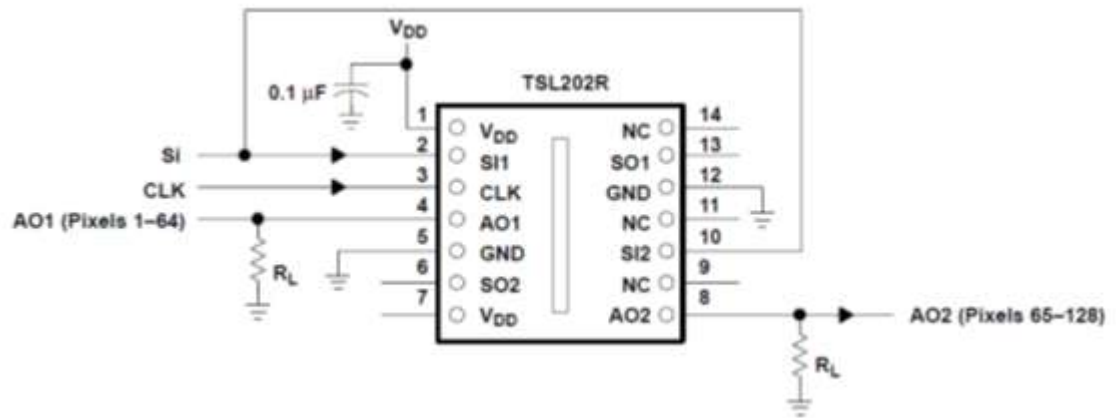


Figura 3. Configuración en paralelo del sensor TSL202R.

(TAOS, 2002)



Figura 4. TSL202R funcionando en serie y siendo verificado en osciloscopio.

V.2. Posición del LED.

Una vez verificado el funcionamiento de ambas configuraciones se armó el circuito en serie, se centró y posicionó el LED que excitaría al sensor con una estructura metálica que permitía regular la distancia entre ambos. Se calculó la distancia necesaria (d) entre el LED y el sensor para que de acuerdo al ángulo de apertura ($\alpha = 5^\circ$) el diámetro del área iluminada fuera igual a la longitud de la línea de 128 pixeles activos ($l_1 = 1.829 \text{ cm}$) y con ello poder crear un modelo de la dispersión de luz sobre la superficie del sensor. Para ello se consideró un triángulo rectángulo, cuyo ángulo α se forma entre la vertical d que une la punta del LED con el centro de la línea de los pixeles y la diagonal que lo une con alguno de los pixeles laterales. Como catetos se consideraron a la recta d y a la recta l_2 formada sobre la mitad de la línea de pixeles (Figura 5).

La distancia d fue calculada como se muestra a continuación:

$$l_2 = \frac{l_1}{2} \quad (5)$$

$$l_2 = \frac{1.829 \text{ cm}}{2} = 0.9145 \text{ cm} \quad (6)$$

$$\tan \alpha = \frac{l_2}{d} \quad (7)$$

$$d = \frac{l_2}{\tan \alpha} = \frac{0.9145 \text{ cm}}{\tan 5^\circ} = 10.4527 \text{ cm} \cong 10.5 \text{ cm} \quad (8)$$

Finalmente el LED fue colocado a 10.5 cm sobre el sensor.

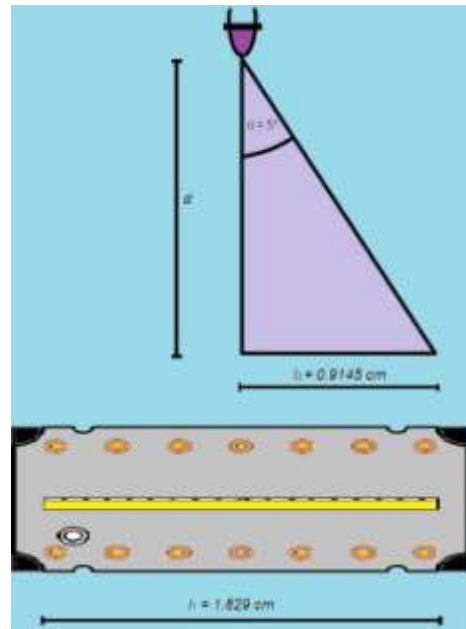


Figura 5. Triángulo considerado para el cálculo de la distancia del LED.

V.3. Programación del microcontrolador ADuC706x.

Se trabajó con el sistema de adquisición de datos ADuC706x, fue programado utilizando el compilador KEIL μ Vision3. La programación se explica en forma de bloques que estructuran al programa.

V.3.1. Señales de reloj y entrada serial.

Uno de los bloques principales del programa es el encargado de generar las señales de reloj (CLK) y entrada serial (SI) con la sincronía requerida para inicializar el sensor TSL202R y con la posibilidad de modificar el tiempo de integración. La señal SI se generó conmutando el P0.0 entre un 0 y un 1 lógico, tras generarse esta señal se conmutaba de igual manera el P0.1 en 130 ocasiones, con la finalidad de funcionar como CLK. La frecuencia de estas conmutaciones fue de 8 kHz para el CLK, mientras que SI era inicializada mediante una señal externa recibida por comunicación serial UART enviada desde una aplicación de computadora generada en Microsoft Visual Studio 2010.

V.3.2. Regulación de la intensidad del LED.

Para tener un mayor rango de posibilidades al experimentar, se aprovechó la fuente de excitación del ADuC706x, la cual permite regular la intensidad del LED. Primeramente fue necesario polarizar de forma directa el LED, conectando el cátodo a un voltaje de -2.5 V y el ánodo a IEXC0. Se verificó que con la mínima corriente generable se produjera una diferencia de potencial necesaria para polarizar el LED. La modificación de la corriente se da modificando el registro IEXCON, nuevamente el valor a cargar en el registro se mandó desde la computadora por comunicación serial UART, primeramente

como un comando que provoca la entrada a un condicional, donde se carga el registro con un valor, según la corriente que se desea generar. Las intensidades de corriente seleccionables desde la computadora fueron 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 y 2.0 mA. Los primeros 6 valores se producen con una sola fuente (IEXC0), mientras que para los 3 valores más altos fue necesario configurar en paralelo a IEXC0 e IEXC1 en PIEXC0.

V.3.3. Conversión analógica-digital.

Una vez que el TAOS y el LED funcionaban con señales generadas por el ADuC706x, se configuró la conversión analógica-digital, para poder enviar las lecturas de V_{out} de cada pixel a la computadora para su posterior análisis. Se configuró el convertidor para funcionar en modo continuo, unipolar, utilizando la referencia interna del microcontrolador de 1.3 V, con ganancia unitaria. Se programaron las autocalibraciones para ganancia y tensión de offset. El convertidor se configuró para comenzar a trabajar a partir de que el usuario desde la computadora programaba las condiciones de operación del experimento e iniciaba la operación, pero la transmisión de datos ocurría cada determinado tiempo seleccionado por el usuario mediante la computadora, cada que se cumplía ese lapso, se tomaban los 16 bits más significativos de las conversiones, lo que le permite tomar valores entre 0 y 65535 que guardaban en un vector y se enviaban una por una mediante UART para ser graficadas y almacenadas.

V.4. Interfaz microcontrolador-computadora.

Se programó una aplicación en Microsoft Visual Studio 2010 que permitía comunicar al microcontrolador con la computadora mediante UART, dando la posibilidad de modificar sus registros, regular la intensidad del LED en tiempo real desde la computadora durante la realización de los experimentos, modificar valores para el tiempo de integración del sensor (t_{int}), registrar los datos de sensado en un archivo de texto, seleccionar la frecuencia del registro, ver en tiempo real la gráfica de los datos transmitidos, correr un reloj durante el tiempo del experimento, mostrar la cantidad de registros que se tienen, iniciar y terminar el experimento. En la ventana de la aplicación se seleccionaban la corriente deseada para el LED, frecuencia de registro y tiempo de integración, se mandaban por UART una serie de valores que indicaban al microcontrolador en qué condicional entrar y en qué registros se debían de cargar cada uno de los valores enviados. Posteriormente se seleccionaba iniciar y comenzaba a funcionar el sensor hasta que el usuario deseara detener el experimento y guardar los registros en el archivo de texto mencionado anteriormente.

V.5. Divisor de voltaje.

El convertidor analógico-digital fue el encargado de digitalizar la señal de salida del TSL202R. Para que la señal a digitalizar no sobrepasara el valor del voltaje de referencia de 1.3 V, se midió el voltaje real de salida en condiciones de saturación, el cual fue de aproximadamente 3.7 V. Se decidió armar un divisor de voltaje con un factor de $\frac{1}{4}$, para asegurar que no se llega al voltaje

de saturación del convertidor. El divisor se armó con 4 resistencias de $330\ \Omega$ siguiendo la estructura mostrada. Se evaluó la señal de entrada contra la señal de salida del divisor de voltaje en condiciones de saturación, luz ambiente y oscuridad para determinar el factor real en los extremos y centro del rango de funcionamiento del sensor (Figura 6).

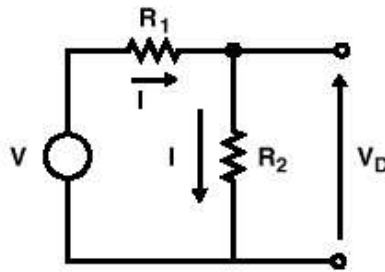


Figura 6. Divisor de voltaje común.

Para que el factor de división fuera de $\frac{1}{4}$, se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

$$V = IR_1 + IR_2 = I(R_1 + R_2) \quad (9)$$

$$I = \frac{V}{(R_1 + R_2)} \quad (10)$$

$$V_D = IR_2 = \frac{V}{(R_1 + R_2)}(R_2) = V \frac{R_2}{R_1 + R_2} \quad (11)$$

$$R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = 330\ \Omega \quad (12)$$

$$R_2 = R_3 + R_4 + R_5 = 990\ \Omega \quad (13)$$

$$V_D = V \frac{330 \, \Omega}{330 \, \Omega + 990 \, \Omega} = V \frac{330 \, \Omega}{1320 \, \Omega} = V \frac{1}{4} \quad (14)$$

donde:

$V = V_{out}$ = Voltaje de salida del TSL202R (V).

V_D = Voltaje del divisor (V).

V.6. Armazón del sensor.

Después de armarse el sensor en una placa de pruebas y definir la distancia del LED, se utilizó una fuente de voltaje doble, para generar los voltajes necesarios para la polarización del LED y hacer funcionar al TSL202R. Se fabricó una estructura en placa de PVC para fijar la placa y un arco para montar el LED a la distancia requerida. Se fijó la fuente de voltaje y se pintó en negro mate, para evitar que la luz fuera reflejada dentro de la estructura. Se fabricó y pintó de igual manera una tapa que permitió aislar la estructura de la luz exterior para poder trabajar en condiciones de oscuridad. Se muestran el proceso y la estructura final (Figura 7).



Figura 7. Proceso de elaboración de estructura para el sensor.

V.7. Desarrollo de cromatografías y sensores.

V.7.1. Determinación de condiciones del sensado.

Se identificó la intensidad máxima que no saturaba al sensor con una placa de referencia (blanco sin AD). Debido a la cercanía con la saturación, se decidió trabajar con una tolerancia mayor. Para ello se utilizó un valor de intensidad menor. Lo anterior se realizó con un tiempo de integración de 50 ms, el menor configurable, el cual se definió como óptimo, ya que al utilizar uno mayor el sensor llegaba a saturación. Se decidió sensar cada segundo, el mínimo tiempo seleccionable, ya que se corrió un ensayo y se determinó que de aumentar este tiempo, la reacción de revelado avanzaría y no podríamos evaluar la consistencia en las lecturas del sensor.

V.7.2. Cromatografías y sensores preliminares.

Se hicieron pruebas para comprobar la separación y el revelado de la toxina en distintas fases estacionarias y soportes, hasta determinar la que tenía mayores ventajas y mejores resultados. Algunas fabricadas en el laboratorio y otras comerciales. Se anotó la distancia recorrida por la toxina y se hicieron los arreglos para que al posicionar las placas sobre el sensor, la toxina quedara centrada en los pixeles 64 y 65. Para determinar el tiempo de reacción y el tiempo de lectura se corrió una placa con 2 μ l de AD a 400 ppm, después de revelarse fue leída en 115 ocasiones, con un intervalo de 60 segundos entre cada medición.

V.7.3. Cromatografías y sensores finales.

Se corrieron cromatografías en capa fina, cargando 2 μ l de ácido domoico en solución sobre cada placa. Se llevaron a cabo los experimentos, con un blanco (Cromatografía I), muestras a 5 concentraciones distintas (Cromatografías II-VI), y con el LED apagado utilizando muestras blanco (Cromatografía 0). La cromatografía 0 fue llevada a cabo para determinar el ruido en el sensor, se hicieron registros con el fin de determinar el valor de voltaje de cada pixel llamado V_{drk} , para posteriormente poder determinar los valores de absorbancia y transmitancia de la muestra de una manera más exacta. Se trabajó por triplicado, asignando a las réplicas las letras A, B y C. El tiempo de corrida, secado, revelado y sensor fueron constantes. La temperatura del medio no fue regulada ni registrada, mientras que la

temperatura de la plancha utilizada para secar las placas después de la corrida y el revelado fue constante.

Se midió cada placa 15 veces con un periodo de un segundo. Por cada réplica se generó un archivo nombrado con el número de cromatografía seguido de la letra de la réplica. Estos archivos fueron registrados en la computadora.

Las concentraciones, la cantidad de ácido domoico utilizadas y los nombres de los archivos de datos generados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones y cantidad de AD cargadas en las placas.

Nombre del archivo de datos generado	Concentración de AD (ppm)	Cantidad de AD cargada (ng)
IA, IB, IC	0	0
IIA, IIB, IIC	50	100
IIIA, IIIB, IIIC	100	200
IVA, IVB, IVC	200	400
VA, VB, VC	300	600
VIA, VIB, VIC	400	800
0A, 0B, 0C	0	0
	LED apagado, condiciones de oscuridad	

V.8. Definición y cálculo de indicadores.

V.8.1. Cálculo de irradiancia.

Se determinó una fórmula para calcular la irradiancia incidente en cada pixel a partir del valor digital que se registra y el ruido o voltaje típico en condiciones de oscuridad. Para ello se trabajó a partir de la ecuación 4:

$$E_{ei} = \frac{V_{out_i} - V_{drk_i}}{(R_e)(t_{int})} = \frac{V_{out_i} - V_{drk_i}}{(0.48)(50_{ms})} = \frac{V_{out_i} - V_{drk_i}}{(0.024)} \quad (15)$$

$$\frac{V_{out_i}}{4} = V_{D_i} \quad (16)$$

$$V_{out_i} = (4)(V_{D_i}) \quad (17)$$

$$\frac{V_{drk_i}}{7.65} = V_{E_i} \quad (18)$$

$$V_{drk_i} = (7.65)(V_{E_i}) \quad (19)$$

Sustituyendo 17 y 19 en 15, tenemos:

$$E_{ei} = \frac{(4)(V_{D_i}) - (7.65)(V_{E_i})}{(0.024)} \quad (20)$$

$$V_{D_i} = V_{dig_i} \frac{1.3}{65535} = V_{dig_i}(19.8367 \times 10^{-6}) \quad (21)$$

$$V_{E_i} = V_{drkdig_i} \frac{1.3}{65535} = V_{drkdig_i}(19.8367 \times 10^{-6}) \quad (22)$$

Insertando las ecuaciones 21 y 22 en 20 y factorizando:

$$E_{ei} = \frac{19.8367 \times 10^{-6}}{0.24} \left((4)(V_{D_i}) - (7.65)(V_{E_i}) \right) \quad (23)$$

Como ecuación final se tiene la siguiente:

$$E_{e_i} = 826.53 \times 10^{-6} \left((4)(V_{D_i}) - (7.65)(V_{E_i}) \right) \quad (24)$$

donde:

V_{out} = Voltaje de salida (V).

V_{drk} = Voltaje de salida en condiciones de oscuridad (V).

R_e = Responsividad del sensor a determinada longitud de onda.

E_e = Irradiancia incidente ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$).

t_{int} = Tiempo de integración (s).

i = Valor referente al i-ésimo pixel.

V_D = Voltaje del divisor en respuesta a V_{out} (V).

V_E = Voltaje del divisor para en respuesta a V_{drk} (V).

V_{dig} = Voltaje digitalizado.

V_{drkdig} = Voltaje en condiciones de oscuridad digitalizado.

Con esta ecuación se calcularon las irradiancias incidentes de cada pixel en los registros de las lecturas para utilizarse posteriormente.

V.8.2. Cálculo de indicadores.

Se determinaron 4 tipos de indicadores identificados con la etiqueta I-1, I-2, I-3 e I-4. De cada uno se calcularon 4 variantes denominadas con un guión y un número arábigo seguido a la nomenclatura anterior. Los indicadores se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Indicadores y variantes calculados.

Variable Indicador	1	2	3	4
1	Valor máximo de los registros	Disminución del valor máximo de los registros con respecto a un blanco	Razón entre el valor máximo medido y el valor máximo blanco	Negativo del logaritmo de la razón entre el valor máximo medido y el valor máximo blanco
2	Sumatoria de los registros	Disminución de la sumatoria de los registros con respecto a un blanco	Razón entre la sumatoria de los registros medidos y la sumatoria del valor blanco	Negativo del logaritmo de la sumatoria de los registros medidos y la sumatoria del valor blanco
3	Promedio de los registros	Disminución del promedio de los registros con respecto a un blanco	Razón entre el promedio de los registros medidos y el promedio del valor blanco	Negativo del logaritmo de la razón entre el promedio de los registros medidos y el promedio del valor blanco
4	Promedio de la irradiancia calculada en los dos pixeles centrales	Disminución del promedio de la irradiancia calculada de los dos pixeles centrales con respecto a un blanco	Razón entre la irradiancia calculada de los dos pixeles centrales y el promedio del valor blanco	Negativo del logaritmo de la razón entre la irradiancia calculada de los dos pixeles centrales y el promedio del valor blanco

VI. Análisis estadístico.

Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson para cada uno de los indicadores calculados y evaluar la bondad de ajuste del modelo lineal al conjunto de datos. Posteriormente se trataron los datos a partir de los cuales se obtuvo el coeficiente de correlación con mayor valor y se determinó su normalidad, tanto para las repeticiones de las lecturas del sensor como para las réplicas de las muestras por el método de Shapiro-Wilk. Por el método de mínimos cuadrados se definió la función lineal que mejor se ajustaba al conjunto de datos seleccionados. En la sección de anexos se muestran las tablas de resultados de los análisis estadísticos generadas en SPSS.

VII. Resultados.

VII.1. Operación del sensor.

En la Tabla 4 se muestran las frecuencias de operación que fueron verificadas en la configuración en serie. Según las especificaciones proporcionadas por el fabricante el sensor puede trabajar con frecuencias de CLK entre 5 y 5000 kHz. Las frecuencias de SI deben encontrarse entre 10 y 38.5 kHz. Se comprobó el correcto funcionamiento del sensor entre las frecuencias recomendadas.

En las condiciones 1 y 2 la salida proporcionada por el sensor se notaba disminuida en comparación a las demás condiciones. En las condiciones 3 a 8

la salida V_{out} del sensor no fue afectada por la frecuencia CLK, lo que sí ocurrió al cambiar SI. Con las mismas condiciones de luz y la misma frecuencia SI el valor de salida del sensor se comportaba de manera constante.

Tabla 4. Frecuencias de operación verificadas en la configuración en serie.

Condición	CLK (Hz)	SI (Hz)	Funcionamiento
1	1 k	5	No
2	1 k	5 m	No
3	5 k	5	Si
4	5 k	5 m	Si
5	100 k	5	Si
6	100 k	5 m	Si
7	500 k	5	Si
8	500 k	5 m	Si
9	1 M	5	Si
10	1 M	5 m	Si

Para comprobar el correcto funcionamiento de los 128 pixeles, se utilizaron frecuencias CLK y SI que cumplieran con las especificaciones del fabricante. Se muestran 6 cuadros que representan pruebas realizadas (Figura 8). En el cuadro 1 el sensor presenta saturación en todos sus pixeles. En los cuadros 2 a 6 fue expuesto a luz tenue, a partir del cuadro 3 se impide la incidencia de luz en algunos pixeles. Los 128 pixeles reaccionaban adecuadamente.

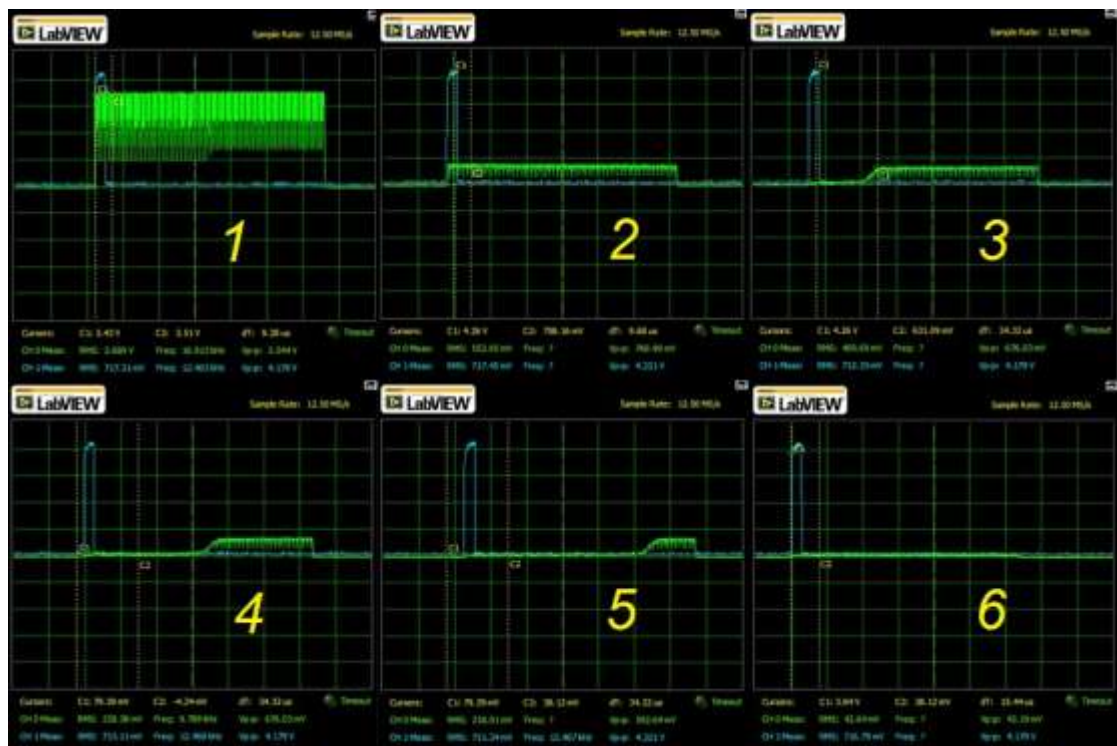


Figura 8. Verificación del funcionamiento de los pixeles del circuito armado.

VII.2. Programación del ADuC706x.

Se logró configurar el microcontrolador para hacer funcional al TAOS con distintos tiempos de integración. En la parte superior de las Figuras 9, 10, 11, 12 y 13 se aprecia V_{out} , mientras que debajo de ellas se observan SI y CLK. Se colocaron las señales en distintas posiciones para poder comparar entre las entradas en la parte inferior y salidas del sensor en la sección superior, además se utilizaron distintas escalas de voltaje al analizar en osciloscopio para diferenciar entre SI y CLK. La escala de frecuencia fue constante en las imágenes mencionadas anteriormente. La Figura 14 permite apreciar una diferencia aproximada de 8.1 divisiones entre el inicio y final de la frecuencia de

CLK, lo que resulta en 16.2 ms. Ya que cada división representa una escala de 2 ms, los 130 pulsos de CLK tienen una frecuencia de 61.7 Hz. Cada pulso una diferencia de 124.6 ms, lo que resulta en una frecuencia de CLK es 8 kHz. La frecuencia de CLK es independiente de SI.

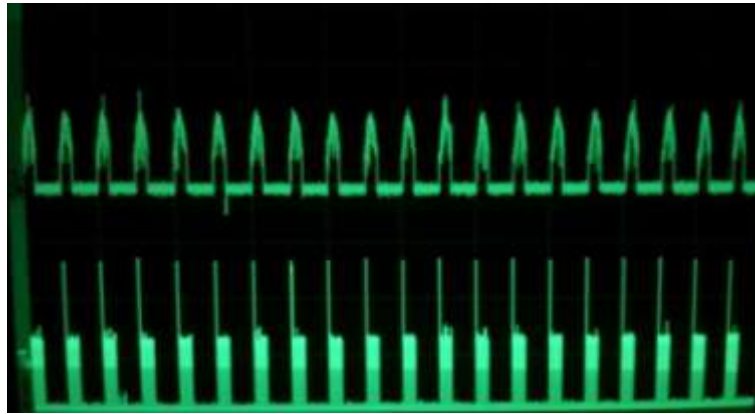


Figura 9. SI = 50 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.



Figura 10. SI = 100 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.

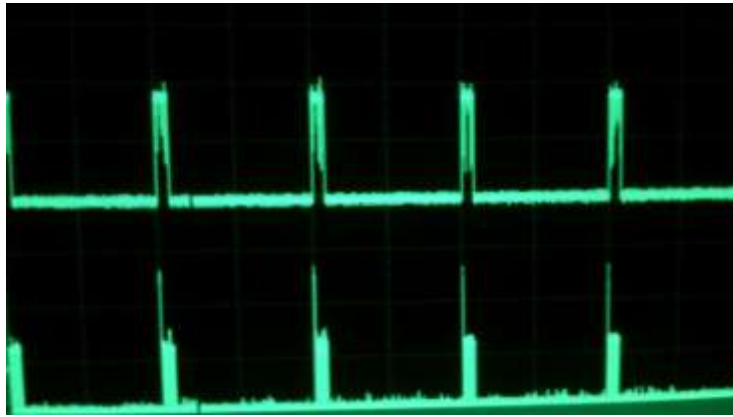


Figura 11. SI = 200 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.

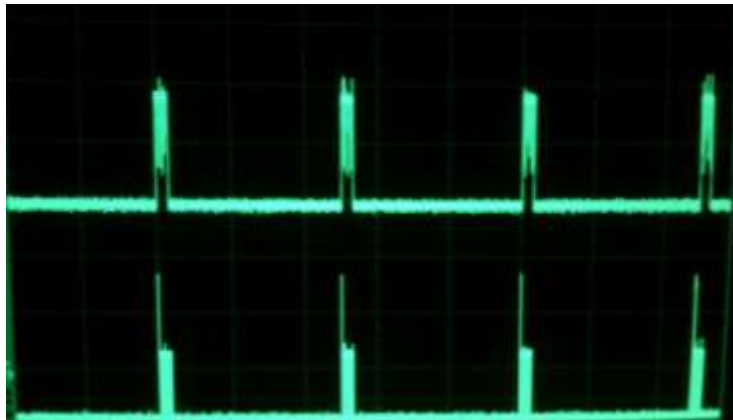


Figura 12. SI = 250 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.



Figura 13. SI = 250 ms, t/Div=100 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.

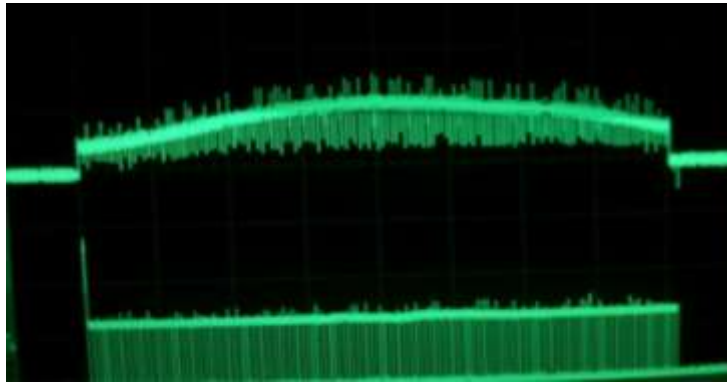


Figura 14. SI = x ms, t/Div=2 ms, V/Div: $V_{out}=500\text{mV}$, SI=1V, CLK=2V.

Se comprobó que la diferencia de potencial generada entre el voltaje negativo de la fuente y PIEXC0 cuando este último es activado, es suficiente para sobrepasar los voltajes de polarización reales y teóricos de la configuración en directo de los LEDs utilizados. Se excitaron dos LEDs candidatos a utilizarse, denominados LED1 y LED2 (Figura 15). Las ventajas y desventajas de cada LED con respecto a algunas características se muestran a continuación (Tabla 5). Se seleccionó y utilizó el LED1 para el prototipo de sensor.



Figura 15. Haz de luz de LED1 y LED2.

Tabla 5. Características LED1 y LED2.

Características	LED1	LED2
Longitud de onda pico (nm)	5 por debajo del complejo a cuantificar	10 por encima del complejo a cuantificar
Variación de Longitud de onda pico (nm)	±10	Desconocido
Angulo de iluminación respecto a la horizontal	5°	35°
Potencia óptico frontal	8.4 mW @ 20mA	Desconocido
Intensidad luminosa	Desconocido	250 a 300 mcd
Corriente máxima	30 mA	20 mA
Haz de luz	Degradado heterogéneo	Degradado uniforme

VII.3. Interfaz ADuC706x-computadora y parámetros de operación.

La aplicación generada para comunicar el microcontrolador y la computadora permitió comunicar exitosamente ambos dispositivos desde una pantalla de aplicación (Figura 16). Se muestra la pantalla principal al entrar a la aplicación (Figura 16-Cuadro 1). La primer configuración requerida fue el puerto de comunicación COM, que era revisado en la computadora y registrado en la aplicación (Figura 16-Cuadro 2), consecutivo a esto se seleccionaba el tiempo de integración a 50, 100, 150, 250 o 500 ms (Figura 16-Cuadro 3), corriente del LED a 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 o 2.0 mA (Figura 16-Cuadro 4), frecuencia de registro a 1, 5, 15, 30, 60 s o ninguna (Figura 16-Cuadro 5). Una vez configurados los parámetros de operación se seleccionaba el botón de

inicializar, se escribía el nombre de la muestra a analizar y la ubicación donde se guardaba (Figura 16-Cuadro 6). Finalmente se mostraba una gráfica que mostraba en el eje x cada uno de los 128 pixeles y en el eje y el valor de V_{out} correspondiente a cada uno. La gráfica era en tiempo real y se guardaban registros según lo seleccionado en la configuración, indicando en un contador el número de registros que se tenían. Cuando se deseaba terminar se seleccionaba el botón de alto y se generaba un archivo de texto (Figura 17). Este archivo en la parte superior izquierda muestra los parámetros de operación y la fecha del experimento, presenta los datos en forma de 128 columnas y un renglón por cada registro tomado.

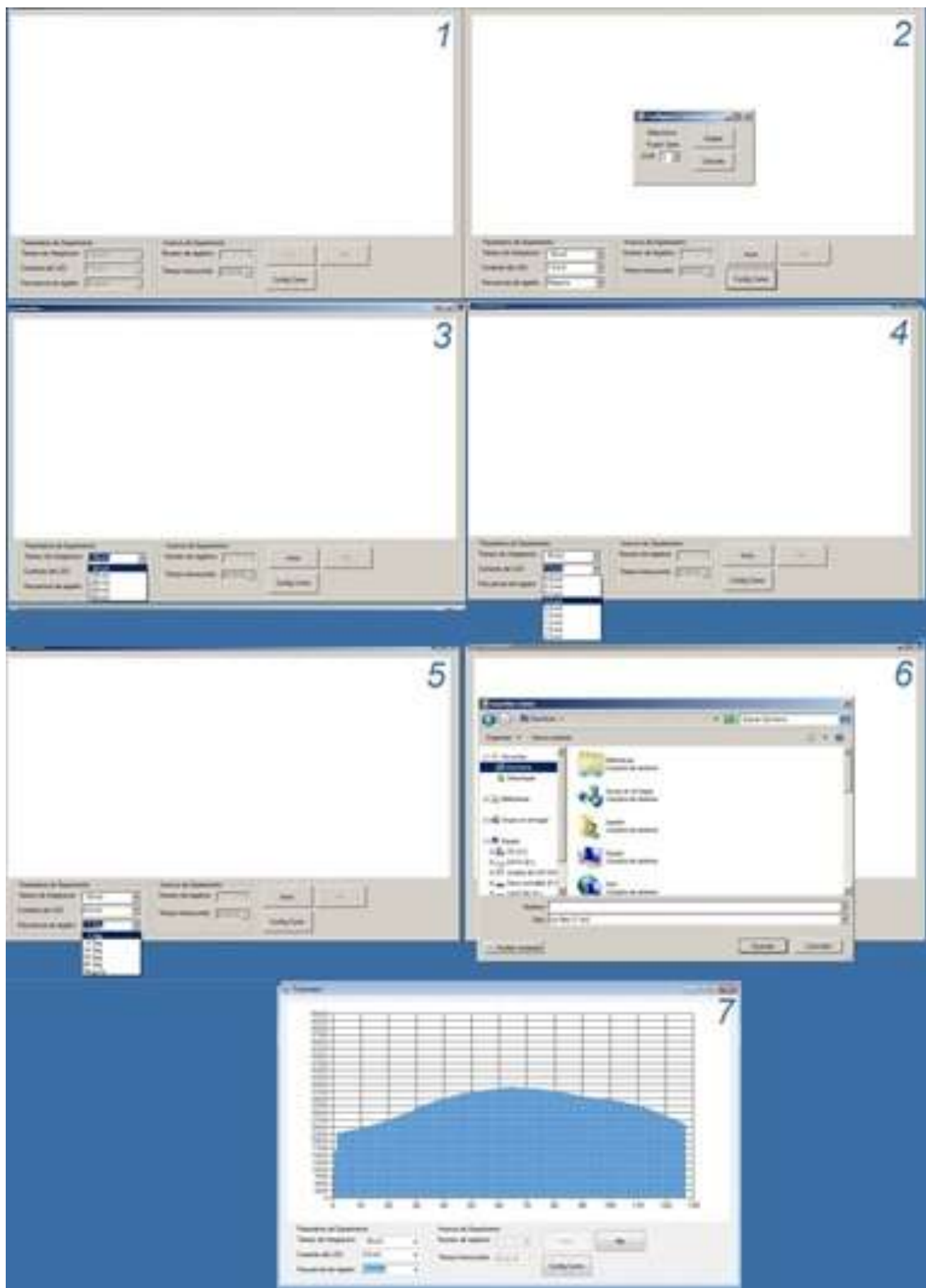


Figura 16. Interfaz ADu706x-computadora.

Ordrk1: Bloc de notas Archivo Edición Formato Ver Ayuda Mediciones del Toxímetro UABC Fecha de experimento: 18/12/2013 Tiempo de integración: 50 mS Corriente del LED: 0.0 mA Frecuencia de registro: 1 Seg Condiciones de operación Registro 1 Píxeles 1 a 10									
24	405	690	653	659	643	649	649	645	651
30	405	688	645	658	649	650	657	650	655
25	400	695	647	659	642	655	653	645	655
21	404	686	659	652	651	654	652	639	653
22	409	685	653	658	659	661	655	649	648
24	415	693	652	654	651	653	656	654	648
24	408	692	652	659	648	658	651	653	656
20	408	689	647	662	640	651	651	650	641
22	407	690	657	660	643	659	658	654	651
25	405	689	657	657	647	657	659	650	652

Pixel 1

Registros 1 a 10

Figura 17. Archivo de registros.

VII.4. Divisor de voltaje.

Se muestran las señales de entrada y salida del divisor de voltaje en condiciones de saturación (Figura 18), luz ambiente (Figura 19) y oscuridad (Figura 20). La relación entre los voltajes de ambas nos permiten conocer los factores reales del divisor para distintos valores de la señal de entrada. Para la primer condición el factor real fue de 1/4.07 y para la segunda condición de 1/4.02, son tan pequeñas las variaciones que se pueden aproximar a 1/4. En condiciones de oscuridad el factor real del divisor de voltaje fue de 1/7.65 (Tabla 6).

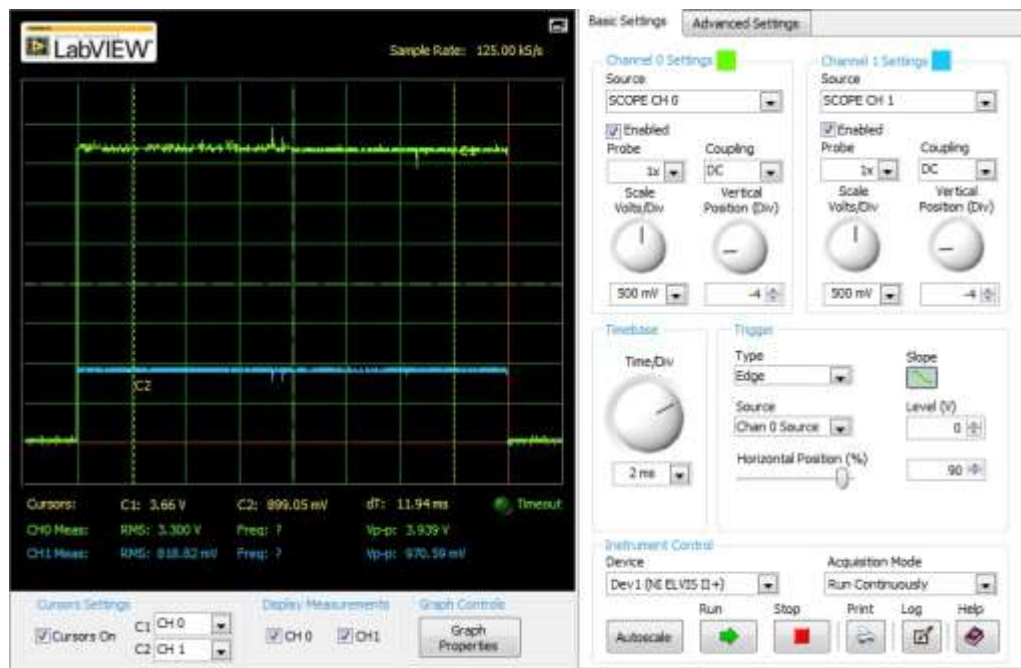


Figura 18. V_{out} , saturación, antes-después del divisor de voltaje, factor=1/4.

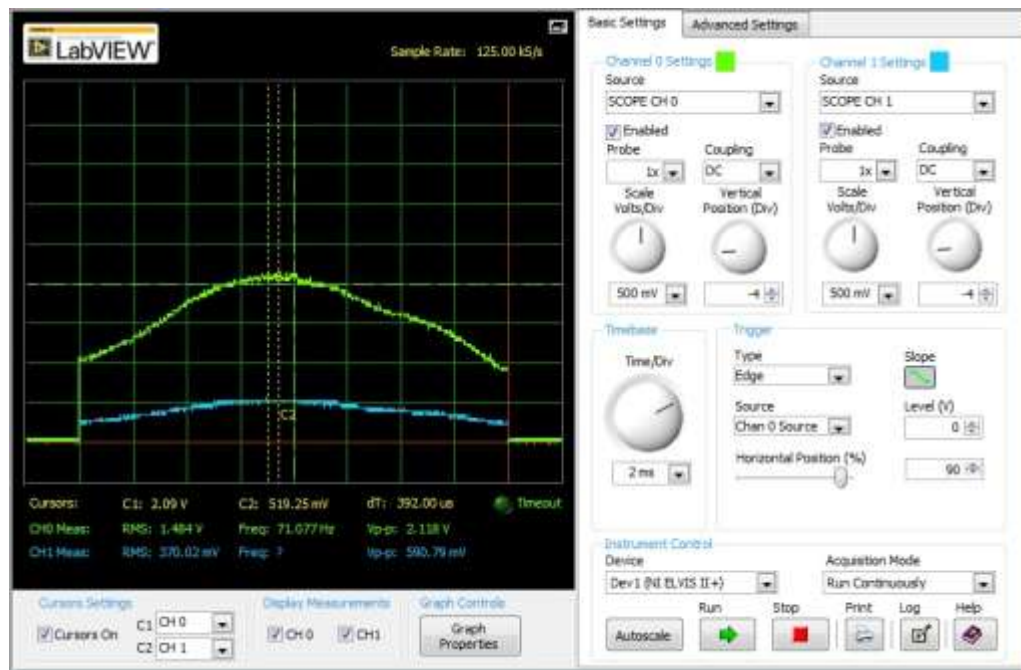


Figura 19. V_{out} , luz ambiente, antes-después del divisor de voltaje, factor=1/4.

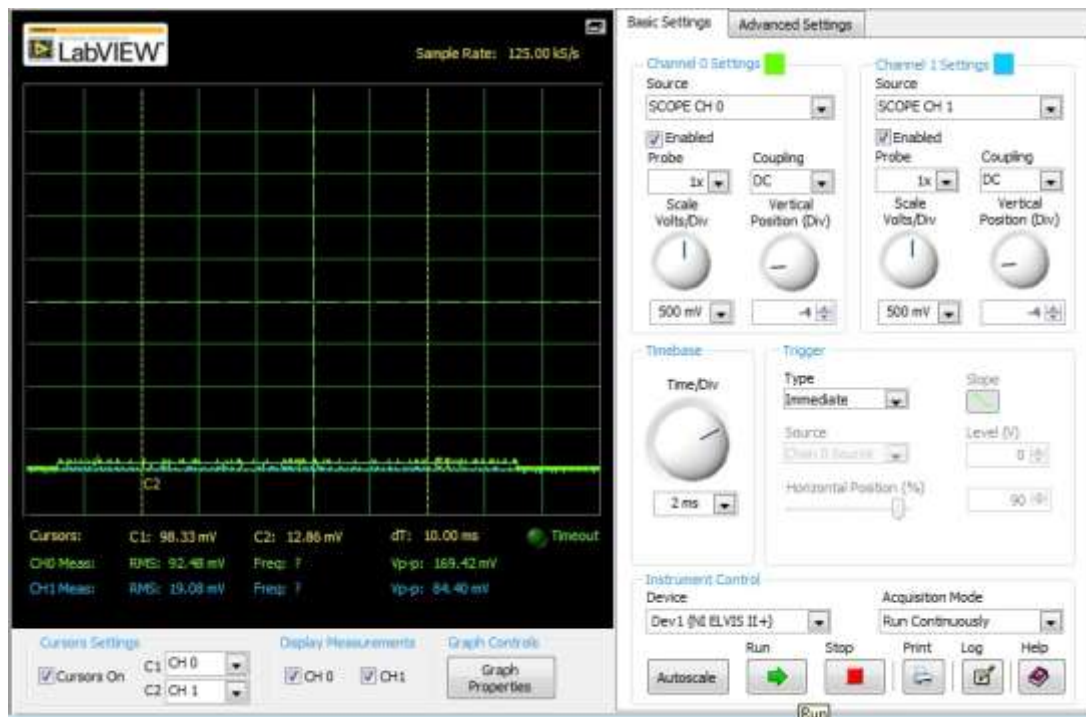


Figura 20. V_{out} , oscuridad, antes-después del divisor de voltaje, factor=1/4.

Tabla 6. Divisor de voltaje en distintas condiciones del sensor.

Condición	V_{out}	$V_{out} \cdot \text{Factor}_{real}$	Factor de división
Saturación	3.66 V	0.899 V	1/4.07
Luz Ambiente	2.09 V	0.519 V	1/4.02
Oscuridad	0.09833 V	0.01286 V	1/7.65

VII.5. Parámetros de sensado.

Se encontró que utilizando una placa blanco, a un $T_I = 50$ ms, se llegaba a saturación del TAOS con una corriente de 1 mA. Con el mismo T_I y una corriente de 0.8 mA la diferencia entre los pixeles centrales y saturación era muy pequeña. Se decidió. Utilizar el mínimo T_I como valor final y una corriente

de 0.6 para asegurar que aún en caso de una placa más delgada no se saturara el sensor.

VII.6. Resultados de los ensayos.

Para una placa fabricada en el laboratorio cargada con 800 ng de ácido domoico la reacción con el revelador tarda aproximadamente 90 minutos en terminar, la temperatura no fue medida. La dispersión de la mancha en la placa produce la disminución de la transmitancia en 50 pixeles. Se graficaron los resultados cada 5 minutos desde el minuto 5 hasta el 95 (Figura 21), en ese lapso de tiempo la reacción no se detuvo, por lo que se decidió medir cada muestra a un tiempo específico después del revelado. El secado de las placas y su colocación en el sensor requerían un poco más de 5 minutos, por lo que se decidió comenzar a leer a partir del minuto 9, guardando 15 registros por placa.

Se calculó la irradiancia incidente sobre cada pixel, midiéndose las distintas placas cargadas con distintas cantidades de toxina (Ecuación 23), la gráfica generada (Figura 22) nos permitió observar el comportamiento del sensor y tomar decisiones sobre los indicadores.

En los 4 tipos de los indicadores calculados (Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10), al considerarlos como variable en función de la cantidad de AD cargada en las placas, la variante número 4 presentaba una mejor correlación lineal. La mayor correlación se obtuvo con el indicador I-4-4 ($r = 0.99424$). La ecuación de regresión lineal (Figura 23) es:

$$(I - 4 - 4) = (0.003)(ng \text{ de AD}) + 0.0139 \quad (25)$$

Despejando llegamos a:

$$ng \text{ de AD} = \frac{(I-4-4) - (0.0139)}{(0.003)} \quad (26)$$

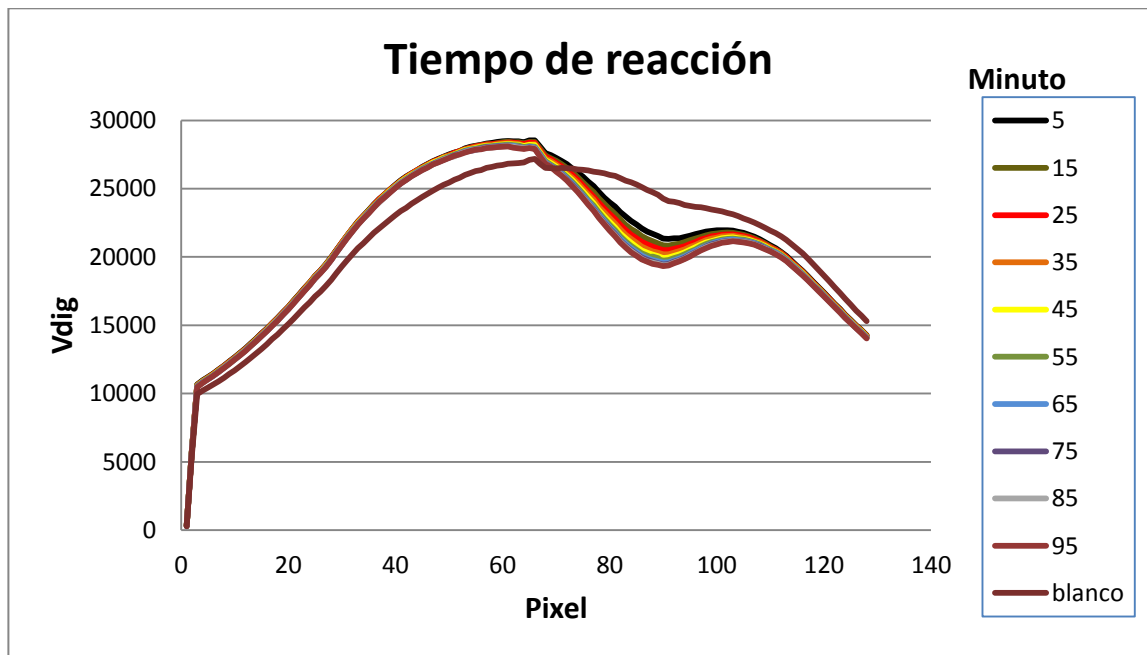


Figura 21. Comportamiento de la reacción en el tiempo.

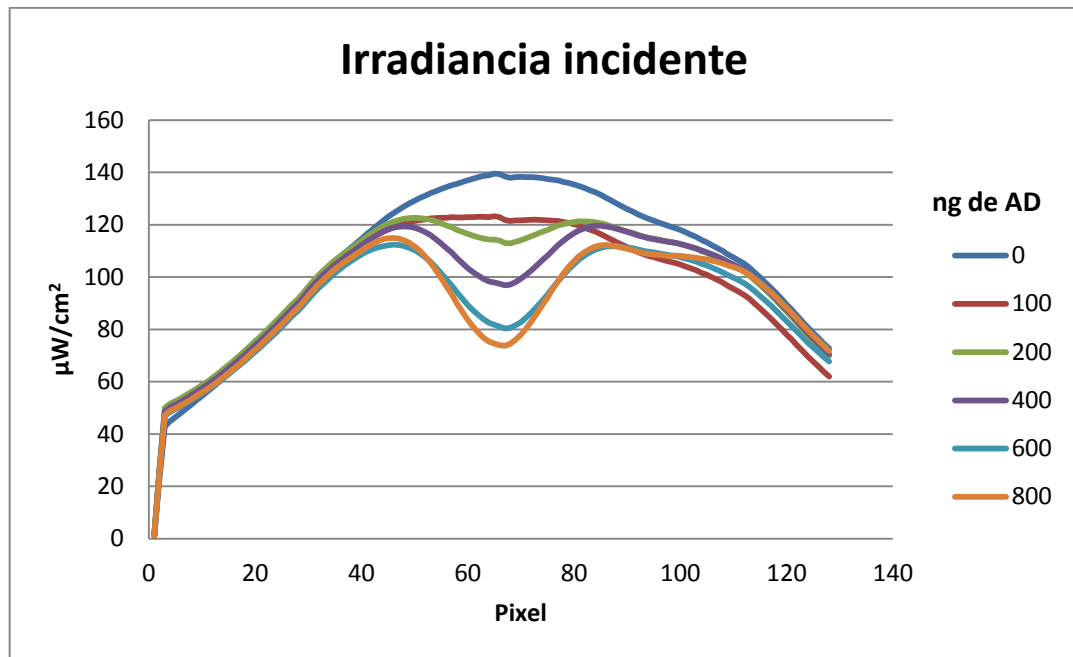


Figura 22. Irradiancia incidente sobre el sensor

Tabla 7. Indicador 1.

ppm	ng deAD	I-1-1	I-1-2	I-1-3	I-1-4
0	0	43820.56667	0	1	0
50	100	38811.1	5009.466667	0.885682294	0.052722037
100	200	38349.2	5471.366667	0.875141581	0.057921681
200	400	37490.26667	6330.3	0.855540435	0.06775946
300	600	35233.66667	8586.9	0.804044068	0.094720148
400	800	36038.4	7782.166667	0.822408352	0.084912488
Correlación		0.833442741	0.833442741	0.833442741	0.845999678

Tabla 8. Indicador 2.

ppm	ng deAD	I-2-1	I-2-2	I-2-3	I-2-4
0	0	4265256.7	0	1	0
50	100	3949512.767	315743.9333	0.925973053	0.033401652
100	200	4033890.033	231366.6667	0.945755512	0.024221119
200	400	3909229.367	356027.3333	0.91652851	0.037854021
300	600	3654398.4	610858.3	0.856782758	0.067129282
400	800	3675428.3	589828.4	0.86171327	0.064637219
Correlación		0.911270121	0.911270121	0.911270121	0.915834966

Tabla 9. Indicador 3.

ppm	ng deAD	I-3-1	I-3-2	I-3-3	I-3-4
0	0	33322.31797	0	1	0
50	100	30855.56849	2466.749479	0.925973053	0.033401652
100	200	31514.76589	1807.552083	0.945755512	0.024221119
200	400	30540.85443	2781.463542	0.91652851	0.037854021
300	600	28549.9875	4772.330469	0.856782758	0.067129282
400	800	28714.28359	4608.034375	0.86171327	0.064637219
Correlación		0.911270121	0.911270121	0.911270121	0.915834966

Tabla 10. Indicador 4.

ppm	ng deAD	I-4-1	I-4-2	I-4-3	I-4-4
0	0	139.27354	0	1	0
50	100	123.09476	16.1787737	0.883834544	0.053629028
100	200	114.28974	24.9837978	0.820613458	0.085861365
200	400	98.120992	41.152543	0.704520009	0.152106668
300	600	82.20489	57.0686455	0.590240562	0.228970948
400	800	74.924869	64.3486666	0.537969173	0.26924261
Correlación		-0.983457	0.98345679	0.983456786	0.994182593

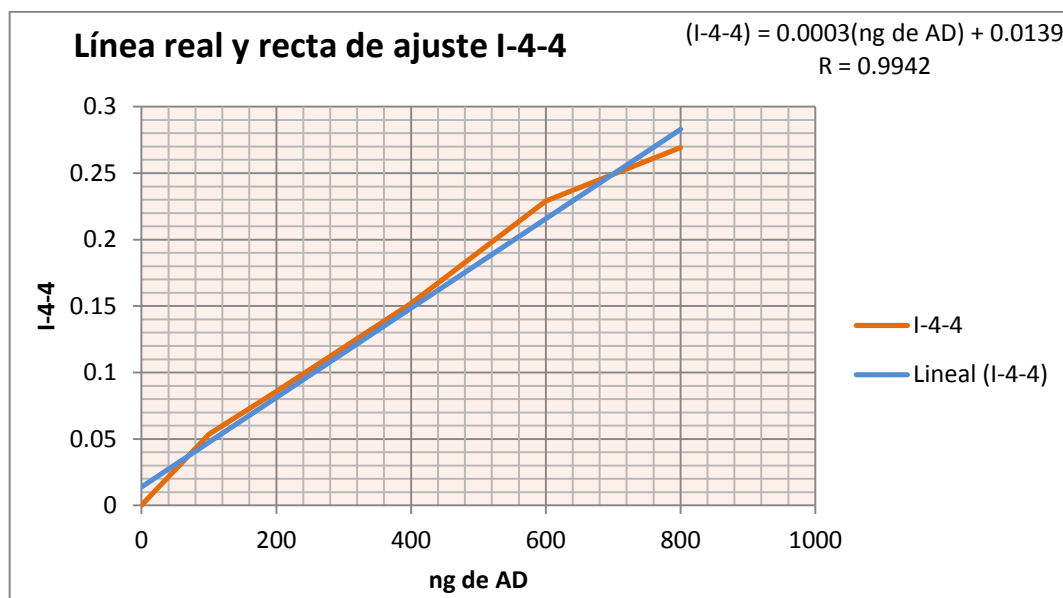


Figura 23. Línea real y recta de ajuste I-4-4.

VII.7. Resultados del análisis estadístico.

Para analizar los datos se formaron “grupos” tomando las 10 primeras mediciones de cada archivo mencionado en la Tabla 2, asignándole a cada grupo de datos el mismo nombre que el archivo del cual fueron extraídos. También se tomaron los grupos de datos obtenidos de las réplicas de una cromatografía y se les asignó el nombre de “Conjunto”, seguido del número de la cromatografía de la cual provienen los datos.

Después del análisis estadístico, se obtuvo que 19 de 21 grupos de datos se comportaron normalmente. De los conjuntos de datos 4 de 7 cumplieron con el supuesto de normalidad. Todos los conjuntos mostraron homogeneidad de varianzas y sólo 1 no presentó diferencias significativas entre los grupos que lo conformaban (Tabla 11).

Tabla 11. Pruebas estadísticas realizadas sobre los conjuntos de datos.

Datos	Normalidad	Homogeneidad de varianzas	ANOVA
Grupo IA	•	-	-
Grupo IB	•	-	-
Grupo IC	•	-	-
ConjuntoI	•	•	•
Grupo IIA	•	-	-
Grupo IIB	•	-	-
Grupo IIC	•	-	-
ConjuntoII	X	•	X
Grupo IIIA	•	-	-
Grupo IIIB	•	-	-
Grupo IIIC	•	-	-
ConjuntoIII	•	•	X
Grupo IVA	•	-	-
Grupo IVB	•	-	-
Grupo IVC	•	-	-
ConjuntoIV	X	•	X
Grupo VA	•	-	-
Grupo VB	•	-	-
Grupo VC	•	-	-
ConjuntoV	X	•	X
Grupo VIA	•	-	-
Grupo VIB	•	-	-
Grupo VIC	X	-	-
ConjuntoVI	•	•	X
Grupo 0A	X	-	-
Grupo 0B	•	-	-
Grupo 0C	•	-	-
Conjunto0	•	•	X
•	El conjunto de datos pasa la prueba		
X	El conjunto de datos no pasa la prueba		
-	No aplica la prueba al conjunto de datos		

VIII. Discusión.

Una vez que se determinó que el sensor óptico TSL202R funcionaba dentro de los parámetros de operación establecidos por el fabricante (Tabla 4), que idealmente su respuesta V_{out} no se veía afectada por la frecuencia CLK, solamente por SI, y además, todos los pixeles funcionaban correctamente en las configuraciones en serie y paralelo (Figura 8), fue necesario decidir la configuración y frecuencias a utilizar.

En experimentos previos se comprobó que la longitud de la marca del AD con respecto al eje sobre el cual corre la muestra, no superaba los 0.5 cm, en algunos tipos de placas el tamaño era menor incluso a 0.1 cm, lo que indica que utilizar la mitad de los pixeles del sensor (configuración en paralelo, 64 pixeles, 0.9145 cm) permitía registrar la medición a lo largo de toda la marca. Por otro lado el utilizar la configuración en serie nos permitiría registrar datos de otros componentes que se quedaban atrás a una mayor distancia en la separación de componentes. Para el prototipo experimental resultó más conveniente una configuración en serie (Figura 2) y poder analizar una línea más amplia de la placa. Pero de esta forma es importante considerar que el sensor será excitado por un LED cuyo haz de luz no es homogéneo (LED1, Figura 15), que el punto más uniforme es el centro del haz y que éste se colocaría perpendicularmente al centro de la línea de pixeles y entre ambos la sección de la placa donde se ubicaba la muestra de AD. Lo anterior nos permite llegar a la conclusión que de analizar otros compuestos que se encuentren tras la marca de AD, las lecturas

y registros serían válidos solo en dos casos: que la heterogeneidad del haz de luz sea constante en todos los LEDs fabricados y que el posicionamiento del mismo sea respetado; o bien, que el análisis sea considerado válido sólo para el prototipo en el cual se realizó el experimento. Debido a que el prototipo definitivo sólo va a trabajar sobre la marca a analizar, lo más conveniente será una configuración en paralelo (Figura 3) y trabajar solamente con 64 pixeles, lo que implicaría cambiar la programación del microcontrolador y exigirle que tras SI sólo se generen 64 pulsos de CLK más un pulso extra que se requiere para descargar el sistema. Lo anterior implicaría una optimización de los recursos del ADuC706x.

Desde este punto se sabía que el sensor sería excitado por un microcontrolador que generaría las dos funciones de entrada, que la señal de salida del sensor posee la misma frecuencia que CLK, y que debido a lo anterior, la frecuencia del convertidor analógico-digital representaba una limitante o variable a considerar para la selección de las frecuencias. ADuC706x tiene un cristal que le permite trabajar a una frecuencia de 10.24 MHz, cada instrucción del programa requiere distinto número de ciclos de reloj para ser ejecutada, generalmente 4, lo que significa que un programa muy simple podría trabajar a frecuencias cercanas a los 2.56 MHz, tomando en cuenta que se requieren de configuraciones más complejas para generar las señales, hacer las conversiones, almacenar y transmitir, se trabajará con frecuencias bastante bajas en comparación de los 5 MHz que es la frecuencia máxima a la cual puede funcionar el sensor. La frecuencia máxima a la cual puede funcionar el

convertidor analógico digital del ADuC706x es de 8 kHz ($t=125\text{ }\mu\text{s}$), por lo que se decidió que esta frecuencia es una buena opción para CLK, lo que requeriría una SI con un tiempo mayor o igual a 129 pulsos ($t=16.125\text{ ms}$, $f=62\text{ Hz}$). Con base en esto se consideró apropiado programar un tiempo de integración mínimo de 50 ms y programar otros valores múltiplos de este valor, lo que permitiría analizar visualmente de una manera más sencilla la gráfica de V_{out} generada en la aplicación programada (Figura 16). Se programaron tiempos de integración seleccionables de 50, 100, 150, 250 y 500 ms, aunque la hoja de datos de TSL202R recomienda un valor máximo de 100 ms. El tiempo de integración seleccionado para operar fue de 50 ms, ya que permitía utilizar 4 intensidades de corriente sin que el sensor llegara a saturación analizando placas blanco (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mA). Al trabajar con 100 ms sólo hubo dos intensidades que no provocaban saturación al analizar placas blanco (0.2 y 0.4 mA). Además de los argumentos expuestos anteriormente, los valores seleccionables como tiempo de integración mayores que 100 ms, estaban fuera de los parámetros recomendados, y con ello no se asegura el comportamiento de V_{out} explicado en la ecuación (4), lo que provocaría que al querer en un futuro calcular los valores de irradiancia incidente en los pixeles, se obtuvieran valores erróneos.

La selección de parámetros de operación fue llevada a cabo tomando en cuenta que se utilizaría LED1. La selección del LED fue complicada, el argumento más fuerte para seleccionar LED1 fue que la longitud de onda pico se encontraba apenas 5 nm por debajo del complejo que sería cuantificado,

mientras que el de LED2 era de 10 nm. Esto implica una mayor responsividad del sensor al complejo que queremos cuantificar, esto es muy importante ya que a pesar de que en el presente trabajo se utilizaron muestras cargadas sólo con la toxina, se desea cuantificar toxina en placas cargadas con extractos de mariscos, y se desea que el sensor reaccione lo menos posible con los componentes de las muestras.

Se deseaba definir una ecuación que aproximara el valor de la irradiancia incidente sobre cada pixel, para ello se requería que el haz fuera dispersado solamente sobre la línea de pixeles, pero se decidió omitir este paso, pues el haz de luz de LED1 era irregular y se desconocía el valor de intensidad luminosa producida, lo que implica que la aproximación sería incorrecta. Con LED2 se podría haber generado esta ecuación, pero su ángulo de iluminación es muy amplio y se tendría que colocar muy cerca del sensor, lo que provocaría saturación e incluso falta de espacio para los componentes que podría requerir el prototipo final del sensor. Si se tuviera un LED con las mismas características que LED1, pero con un haz homogéneo se podría calcular esta ecuación para comparar con los valores que pueden ser calculados.

Para lograr hacer funcionar el sensor, el voltaje a digitalizar debe ser menor que el voltaje de referencia del convertidor (1.3 V), el voltaje de salida máximo teórico del sensor en condiciones de saturación debería ser de 3.5 V, pero fue de 3.66 V. Por lo anterior fue necesario armar un divisor de voltaje (Figura 6), se decidió armar el circuito más sencillo, con resistencias de una sola denominación (330 Ω), si el factor de división a utilizar fuera 3, el voltaje

máximo alcanzado sería de 1.22 V, lo cual no saturaría el convertidor. En caso de que el voltaje de referencia interno estuviera por debajo de las especificaciones del componente se saturaría, para asegurar se decidió utilizar un factor de división de 4.

Para valores de voltaje cercanos a la saturación el factor de división se mantenía, al igual que en los valores medios del rango de salida de voltaje, caso contrario en el voltaje generado en condiciones de oscuridad, el factor calculado (Tabla 6) fue de 7.65, esto puede ser debido al mismo ruido generado por el dispositivo o por el osciloscopio, pero fue tomado como tal para el cálculo de irradiancia en base a la ecuación de voltaje de TSL202R.

El ensayo previo corrido para determinar el tiempo de inicio de registro arrojó una gráfica que permite ver la evolución de la reacción en el tiempo (Figura 21). En esta reacción se cargaron 2 μ l de una solución a 400 ppm (800 ppm), en los 55 minutos mostrados en la gráfica la reacción no termina, por lo que la absorbancia del complejo continúa aumentando. El objetivo del proyecto es crear un dispositivo electrónico que permita determinar la cantidad de AD en muestras de mariscos, de una forma rápida y sencilla, por lo que esperar a que termine la reacción no fue una opción aceptable. Por ello la medición se llevó a cabo durante un tiempo fijo después de revelar la muestra, sin importar la cantidad de ácido domoico cargada. El tiempo elegido fue de 9 minutos, primeramente por necesidad, ya que tras el revelado la placa tenía que ser secada para acelerar la reacción y después ser colocada sobre el sensor. Para optimizar este tiempo sería recomendable correr un conjunto de placas

cargadas con distintas cantidades de AD y evaluar los tiempos de finalización de la reacción en función de la cantidad de toxina cargada. También es importante considerar que una muestra menos concentrada implicaría un menor tiempo de reacción y una muestra mezclada con otros componentes podría requerir mayor tiempo. Para el prototipo final se tendrían que hacer todas las pruebas con placas cargadas con extractos contaminados intencionalmente.

De este ensayo también se desprende una teoría sobre la composición de las placas. Al notar que en las regiones terminales de la línea de píxeles, a pesar de haber sido reveladas con el mismo químico y se espera que no se encuentren en esas zonas residuos de la toxina, se aprecia un comportamiento distinto con respecto a un blanco sin correr. Después de haber sido corrida la placa la primer sección permite pasar más luz, mientras que la región terminal se comporta en el sentido inverso, deja pasar menos luz, lo que podría deberse a que la matriz es lavada y las partículas sueltas son acumuladas en la región final. Debido a este hecho y a que estas placas eran irregulares en su grosor se decidió trabajar los ensayos finales con placas comerciales, aunque respetando los parámetros seleccionados. La irregularidad de las placas se consideró un fuerte elemento en contra de su utilización en los ensayos, se obstruía irregularmente el paso de la luz, y la distribución del calor al secar las placas, lo que evitaría que los experimentos fueran comparables entre sí, y los modelos generados a partir de estos experimentos no serían representativos.

Del experimento anterior se tomó la decisión de utilizar un segundo entre cada medición, ya que la reacción no se detenía y por ello la frecuencia de

registro debería ser la mínima configurable. Se utilizó un segundo entre cada medición y se guardaron 10 registros consecutivos para analizar la normalidad de los registros del sensor. De 21 muestras corridas, tres no se comportaron normalmente, esas 21 muestras representan tres réplicas de siete experimentos de placas cargados con distintas cantidades de ácido domoico. De los grupos de datos obtenidos en cada uno de esos siete experimentos distintos tres no se comportaron normalmente. Para concluir con lo obtenido en el análisis estadístico de los siete grupos de datos, todos presentaron homogeneidad de varianzas y solo uno no tuvo diferencias significativas entre los grupos internos. Para asegurar la normalidad de los datos se propone programar la interfaz en futuros ensayos para que muestree con dos contadores. Con uno se le indicaría el tiempo entre cada registro y con el otro el número de registros cada vez, para este último deberá utilizarse el menor tiempo requerido por el microcontrolador, para disminuir el ruido que ocasiona el avance de la reacción en el tiempo.

Los resultados del análisis estadístico son confusos en el aspecto de que algunos grupos se comportan normalmente y otros no, por lo cual no es posible utilizar estadística no paramétrica para analizar los datos. A pesar de que los grupos internos de los conjuntos presentaron homogeneidad de varianzas, por lo que el análisis ANOVA es aplicable, se encontró que existieron diferencias significativas entre grupos de datos que debieron ser prácticamente idénticos.

Existen herramientas estadísticas que permiten evaluar la existencia de diferencias significativas entre grupos y conjuntos de datos y que pueden refutar resultados arrojados por el análisis ANOVA. Se decidió no aplicarlas ya que la

irregularidad de los datos se le atribuyó a una variable no considerada, la cual es la temperatura. Es decir, tanto la temperatura del medio, como la temperatura de la plancha de calentamiento en la cual fueron secadas las muestras después de la corrida y del revelado, son hechos a los que se les puede atribuir que la velocidad de reacción fue más alta en algunas muestras que en otras.

De estos experimentos se desprendió que la influencia del ambiente y el tiempo de trabajo de la plancha en la temperatura de su superficie deben ser consideradas como variables de los experimentos. La irregularidad de la temperatura implica distinta velocidad y tiempo de reacción, el funcionamiento de TSL202R también es afectado por la temperatura, por ello colocar placas a distintas temperaturas provoca cambios en las mediciones.

Para evitar problemas con la temperatura es necesario trabajar a temperatura constante, recomendable entre 20 y 25 °C. Esta temperatura es apropiada pues es ligeramente superior a las temperaturas registradas en el laboratorio, lo que implicaría siempre tener que aumentar un poco la temperatura dentro del sistema y poder trabajar a la temperatura mencionada. Para ello es posible aislar el sistema electrónico en una estructura que evite o retrase la transferencia de calor entre el medio y el interior de la misma. La temperatura puede ser registrada programando el ADuC706x para que utilice la termoresistencia que tiene integrada y el convertidor analógico digital. Mediante su convertidor digital analógico se puede excitar una resistencia térmica que

esté en contacto con las placas y que regule la temperatura en un ambiente cerrado.

A pesar de que algunos datos no cumplieron con la normalidad esperada y existieron diferencias significativas donde no debía haberlas, se calcularon los indicadores y las variaciones de los mismos mencionados anteriormente (Tabla 3).

Cada uno de los indicadores y variaciones se definió con un objetivo, para comprobar o desmentir una hipótesis.

El indicador número 1 identificaba el valor máximo registrado en los 128 pixeles. El valor máximo para las muestras se registró en los pixeles 64 y 65 (Figura 22), ya que el LED se posicionó para que el centro de su haz iluminara entre estos pixeles. De igual manera las placas fueron acomodadas para que la marca de AD quedara centrada en esta zona. El valor de este indicador disminuiría al aumentar la cantidad de toxina en la marca, pues el complejo absorbía luz a una longitud de onda cercana a la de emisión del LED. Tras las mediciones se detectó que en placas que fueron cargadas con más de 100 ng de toxina este indicador deja de ser válido, pues los pixeles de la zona que presenta disminución comenzaron a registrar valores menores que los de las zonas donde no hubo disminución. Por lo tanto los valores máximos se estancan, dejan de representar la disminución ocasionada por el aumento de la cantidad de toxina y se vuelven dependientes de la homogeneidad de las placas y el deslave que sufren con las corridas. Debido a lo anterior el indicador 1 fue descartado en el presente trabajo para obtener una recta de regresión,

pero considerando que puede ser utilizado en un experimento donde las cantidades cargadas no sobrepasen los 100 ng de toxina, esto sería útil, pues se espera que el sensor detecte en alimentos concentraciones cercanas a las 40 ppm, si se extrajera efectivamente esta cantidad de las muestras, y se cargaran 2 μ l de toxina, el indicador sería viable. Es importante considerar que los métodos de extracción o purificación de muestra deben ser sencillos, y por ello es muy probable que poco efectivos, por lo que es posible que la proporción extraída sea incluso más pequeña.

El indicador número 2, que se generaba de sumar los valores medidos de cada pixel, también fue descartado, a pesar de aumentar la disminución en los pixeles centrales, el comportamiento de los pixeles laterales variaba, incluso de forma irregular entre algunas muestras al aumentar la concentración de AD (Figura 22), la irradiancia sobre los pixeles centrales disminuía y en los laterales aumentaba, mientras que entre otras placas el comportamiento fue el inverso. Este fenómeno puede deberse a problemas al correr las placas, pero no se tiene una prueba que lo confirme. Otro punto importante a resaltar es que este indicador tenía una finalidad meramente experimental, pues al correr muestras contaminadas con otras toxinas que se empalmen o acerquen demasiado a la marca de AD, el indicador sería afectado fuertemente. Una opción para disminuir este ruido es definir el indicador como cierto número de pixeles, sobre los cuales no se empalmen otros compuestos distintos a los que se encuentren en los blancos.

Con el indicador número 3 y sus derivados, se obtuvieron valores de correlación superiores a 0.9, con valores muy cercanos al indicador número 3, pero por las mismas razones fue descartado. Este indicador proviene del promedio de los valores registrados en todos los pixeles, pero la irregularidad en el comportamiento de los pixeles laterales hace perder credibilidad sobre este indicador.

Finalmente el indicador número 4 fue el que nos permitió obtener la mayor correlación ($r=0.9942$) con la cantidad de toxina cargada en la placa, fue precisamente con la variante número 4. La variante número 4 se calcula como el negativo del logaritmo del indicador número 3, el cual a su vez, se calcula como el valor medio de irradiancia calculado de los pixeles 64 y 65 entre el mismo cálculo de la muestra blanco. Lo anterior se debe a que se quiere hacer un cálculo similar al que realizan los equipos espectrofotométricos. El indicador puede ser calculado de igual manera, como el logaritmo de la división del valor blanco sobre el valor calculado, esta relación es equivalente a determinar la transmitancia, la cual debe mostrar un comportamiento logarítmico, y al calcular el logaritmo de esta relación, se obtiene otro valor similar a la absorbancia, la cual debe mostrar un comportamiento lineal. El comportamiento de los datos tendió a la linealidad (Figura 23). Es importante mencionar que se desconoce si al trabajar a condiciones constantes de temperatura se podrán generar modelos con una mayor correlación lineal. Este modelo surgió de un conjunto de datos que no tuvieron el comportamiento esperado y aún más importante, no se puede asegurar que el modelo sea representado por la Ley de Beer-Lambert,

pues esta parte del supuesto de que el haz de luz atraviesa un volumen constante donde la concentración de analito varía, y en el presente trabajo no se pudo determinar la dispersión del AD sobre la placa y como influenciaba la cantidad cargada en esta distribución.

Las ventajas de este indicador es que utiliza solo una porción muy pequeña de la placa, esto permite que en caso de que se traslape la marca de AD con la de otro compuesto que se presente de forma variable, se pueda utilizar otro pixel, siempre y cuando se coloque el centro del haz de luz perpendicularmente sobre él.

Para finalizar esta discusión, es necesario hacer algunas recomendaciones para futuros experimentos como éste. Es necesario un LED con pico de emisión a la misma longitud de onda y ángulo de apertura que LED1 pero con un haz homogéneo. Si emite luz a una longitud de onda o ángulo distinto, las condiciones de operación deberán calcularse nuevamente.

El tiempo entre registros debe ser lo menor posible para poder evaluar la normalidad en la toma de registros y evitar que el avance de la reacción interfiera en el cálculo.

La temperatura debe ser constante, es importante que se elija una temperatura superior a la del ambiente donde será utilizado el sensor, pues mientras la temperatura deseada sea superior a la ambiente esta se podrá elevar, en cambio si la deseada es inferior a la temperatura ambiente, es muy difícil crear un sistema de enfriamiento dentro de la cabina del sensor.

Para disminuir la luz del LED en caso de ser necesario, o enfocarla a un solo punto es posible utilizar filtros y colimadores, lo que sería de utilidad para que distintos sensores trabajaran de una forma más homogénea.

Los indicadores que fueron descartados en este trabajo pueden resultar aplicables, pero para ello es necesario hacer nuevos experimentos con las recomendaciones mencionadas y posiblemente restringir el número de píxeles a considerar para su cálculo.

IX. Conclusiones.

- ✧ El dispositivo electrónico generado utilizando el sensor TSL202R, el sistema de adquisición de datos ADuC706x, el fotodiodo denominado LED1 y la interfaz programada, registra datos de ensayos de cromatografía en capa fina que permiten detectar ácido domoico en soluciones con concentración mínima de 50 ppm.
- ✧ El indicador denominado I-4-4 permitió generar una curva de regresión lineal con un $r=0.9942$.
- ✧ Para el modelo final del sensor es más conveniente una configuración de TSL202 en paralelo.

- ✧ Es necesario utilizar un LED con las mismas especificaciones que LED1 pero que su haz de luz tenga un comportamiento regular, o utilizar filtros y colimadores para homogenizar el funcionamiento de distintos LED.
- ✧ La temperatura es un parámetro variable que no fue considerado al realizar la parte experimental, lo que provocó respuestas inesperadas e irregulares en los registros del sensor que le hacen perder validez a los modelos generados a partir de ellos.
- ✧ Es necesario repetir los experimentos realizados en el presente trabajo pero tomando en consideración las recomendaciones generadas en esta tesis.
- ✧ No se encontraron argumentos definitivos que indiquen que el dispositivo que se está diseñando no pueda detectar o cuantificar concentraciones de AD por debajo de las que fueron verificadas en el presente trabajo o de los límites permisibles en alimentos, es necesario realizar ensayos con concentraciones menores de la toxina
- ✧ El presente trabajo concluye como un estudio exploratorio del método de detección, generándose conocimiento que define el rumbo de futuras investigaciones.

X. Referencias.

1. Álvarez-Falconi, P. P. (2009). Ácido domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 26 (4), 505-516.
2. Analog Devices (2012). ADuC7060/ADuC7061 Data Sheet.
3. Anderson, D. M., Glibert, P. M, & Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication nutrient Sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25 (4b), 704-726.
4. Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E. & Hernández-Sandoval, F. E. (2011). El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiología*, 21 (3), 381-413.
5. Carey, F. A. (2003). *Química Orgánica* (6 Ed). D. F., México: McGraw Hill.
6. Cyprus International Institute for Environmental and Public Health & Harvard School of Public Health (2013). Effects of global warming on global harmfulalgal blooms occurrence in United States of America.
7. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms [GEOHAB] (2006). *Harmful Algal Blooms in Eutrophic Systems*.
8. Hallegraef, G. M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32 (2), 79-99.

9. Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H. G., Sellner, K., Stockwell, D. A., Stoecker, D. K. & Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8, 3-13.
10. Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S. & Boyle, C. (2004). Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 545–557.
11. Kreuzer, M. P., Pravda, M., O'Sullivan, C. K. & Guilbault, G. G. (2002). Novel electrochemical immunosensors for seafood toxin analysis. *Toxicon*, 40, 1267-1274.
12. Kubo, T., Nomachi, M., Nemoto, K., Sano, T., Hosoya, K., Tanaka, N. & Kaya, k. (2006). Chromatographic separation for domoic acid using a fragment imprinted polymer. *Analytica Chimica*, 577, 1-7.
13. Lefebvre, K. A. & Robertson, A. (2010). Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicon*, 56, 218-230.
14. Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S. Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hockb, B. & Turner A.P.F. (2004). Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 145–152.
15. Microsoft (2013). Visual Basic. Recuperado 23 de noviembre de <http://msdn.microsoft.com/en-us/vstudio/hh388573.aspx>
16. Microsoft (2013). Visual Studio. Recuperado 23 de noviembre de <http://www.visualstudio.com/>

17. Olsen, E. D. (1990). Métodos Ópticos de Análisis. Recuperado 26 de noviembre de <http://books.google.com.mx/books?id=gtRcq1g4DmYC&pg=PA94&lpg=PA94&dq=absorcion+grupos+cromoforos&source=bl&ots=C4Rm77Vxak&sig=0BLVjG1U-pRgdHPkISbF-942CSY&hl=es-419&sa=X&ei=3vi3UrSbEMj6oATw1ICIBA&ved=0CDwQ6AEwAg#v=onepage&q&f=false>
18. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO] (2005). Biotoxinas Marinas.
19. Skoog, D. A., West, D. M. y Hooler, F. J. (2001). Fundamentos de Química Analítica, Volumen 2. Recuperado 25 de noviembre de <http://books.google.com.mx/books?id=CU7yWvK1kGQC&pg=PA507&dq=radiacion+electromagnetica&hl=en&sa=X&ei=rwm5UunMHIqGogTh5oGYBA&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false>
20. Stevens, R. C., Soelberg, S. D., Eberhart, B. L., Spencer, S., Wekell, J. C., Chinowsky, T. M., Trainer, V. L. & Furlong, C. E. (2007). Detection of the toxin domoic acid from clam extracts using a portable surface plasmon resonance biosensor. *Harmful Algae*, 6, 166–174.
21. Striegel, M. E. y Hill, Jo (1997). Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis. Recuperado 25 de noviembre de <http://books.google.com.mx/books?id=ytFOAgAAQBAJ>
22. Texas Advanced Optoelectronics Solutions (2002). TSL202R Data Sheet.

23. Trainer, V. L., Bates, S. S., Lundholm, N., Thessen, A. E., Cochlan, W. P., Adams, N. G. & Trick, C. G. (2012). Pseudo-nitzschia physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*, 14, 271-300.
24. Walton, H. y Reyes, J. (2005). *Análisis Químico e instrumental moderno*. Recuperado 23 de noviembre de <http://books.google.es/books?id=htRP2dHJkXgC&pg=PA146&dq=ley+de+lambert+y+beer&hl=es&sa=X&ei=xwePUsgwKcn8igLJtIDoDA&ved=0C DIQ6AEwAA#v=onepage&q&f=true>
25. Yu, Q., Chen, S., Taylor, A. D., Homola, J., Hock, B. & Jiang, S. (2005). Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators*, 107, 193–201.

XI. Anexos.

XI.1. SPSS, Tabla de resultados de normalidad, datos 3 réplicas.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ConjuntoI	.066	30	.200 [*]	.991	30	.996
ConjuntoII	.404	30	.000	.635	30	.000
ConjuntoIII	.132	30	.193	.943	30	.107
ConjuntoIV	.182	30	.012	.916	30	.021
ConjuntoV	.149	30	.086	.919	30	.025
ConjuntoVI	.119	30	.200 [*]	.943	30	.108
Conjunto0	.117	30	.200 [*]	.958	30	.274

XI.2. SPSS, Tabla de resultados de normalidad, datos cada réplica.

Pruebas de normalidad							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Datos	IA	.168	10	.200 [*]	.966	10	.852
	IB	.177	10	.200 [*]	.965	10	.839
	IC	.146	10	.200 [*]	.965	10	.844
Datos	IIA	.202	10	.200 [*]	.920	10	.359
	IIB	.184	10	.200 [*]	.974	10	.926
	IIC	.147	10	.200 [*]	.912	10	.296
Datos	IIIA	.153	10	.200 [*]	.930	10	.452
	IIIB	.108	10	.200 [*]	.960	10	.791
	IIIC	.196	10	.200 [*]	.917	10	.330
Datos	IVA	.205	10	.200 [*]	.930	10	.444
	IVB	.255	10	.065	.884	10	.146
	IVC	.130	10	.200 [*]	.956	10	.745
Datos	VA	.197	10	.200 [*]	.898	10	.208
	VB	.132	10	.200 [*]	.957	10	.754
	IVC	.185	10	.200 [*]	.895	10	.192
Datos	VIA	.233	10	.132	.935	10	.496
	VIB	.192	10	.200 [*]	.911	10	.289
	VIC	.338	10	.002	.795	10	.012
Datos	0A	.250	10	.076	.824	10	.028
	0B	.211	10	.200 [*]	.938	10	.534
	0C	.186	10	.200 [*]	.898	10	.209

XI.3. SPSS, Tabla de resultados de ANOVA de un factor Conjuntol

Prueba de homogeneidad de varianzas

Datos

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.227	2	27	.799

ANOVA

Datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	803.317	2	401.658	1.287	.293
Intra-grupos	8429.650	27	312.209		
Total	9232.967	29			

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

(I)	(J)				Intervalo de confianza al 95%	
		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior
IA	IB	-11.6500000	7.9020157	.319	-31.242397	7.942397
	IC	-10.1500000	7.9020157	.416	-29.742397	9.442397
IB	IA	11.6500000	7.9020157	.319	-7.942397	31.242397
	IC	1.5000000	7.9020157	.980	-18.092397	21.092397
IC	IA	10.1500000	7.9020157	.416	-9.442397	29.742397
	IB	-1.5000000	7.9020157	.980	-21.092397	18.092397

Conjuntoll

Prueba de homogeneidad de varianzas

Datos

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.613	2	27	.092

ANOVA

Datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2716636.067	2	1358318.033	6452.505	.000
Intra-grupos	5683.775	27	210.510		
Total	2722319.842	29			

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

(I)	(J)				Intervalo de confianza al 95%	
		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior
IIA	IIB	-2.5000000	6.4886083	.922	-18.587970	13.587970
	IIC	-6.3960000E2	6.4886083	.000	-655.687970	-623.512030
IIB	IIA	2.5000000	6.4886083	.922	-13.587970	18.587970
	IIC	-6.3710000E2	6.4886083	.000	-653.187970	-621.012030
IIC	IIA	639.6000000 [*]	6.4886083	.000	623.512030	655.687970
	IIB	637.1000000 [*]	6.4886083	.000	621.012030	653.187970

ConjuntotIII

Prueba de homogeneidad de varianzas

Datos

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.082	2	27	.921

ANOVA

Datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	81792.867	2	40896.433	194.553	.000
Intra-grupos	5675.600	27	210.207		
Total	87468.467	29			

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

(I)	(J)				Intervalo de confianza al 95%	
		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior
IIIA	IIIB	64.3000000 [*]	6.4839403	.000	48.223604	80.376396
	IIIC	127.9000000 [*]	6.4839403	.000	111.823604	143.976396
IIIB	IIIA	-64.3000000 [*]	6.4839403	.000	-80.376396	-48.223604
	IIIC	63.6000000 [*]	6.4839403	.000	47.523604	79.676396
IIIC	IIIA	-1.2790000E2	6.4839403	.000	-143.976396	-111.823604
	IIIB	-63.6000000 [*]	6.4839403	.000	-79.676396	-47.523604

ConjuntoIV

Prueba de homogeneidad de varianzas

Datos

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.124	2	27	.060

ANOVA

Datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	50364.317	2	25182.158	105.480	.000
Intra-grupos	6445.925	27	238.738		
Total	56810.242	29			

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

(I)	(J)				Intervalo de confianza al 95%	
		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior
IVA	IVB	24.9000000 ⁺	6.9099633	.003	7.767315	42.032685
	IVC	96.6500000 ⁺	6.9099633	.000	79.517315	113.782685
IVB	IVA	-24.9000000 ⁺	6.9099633	.003	-42.032685	-7.767315
	IVC	71.7500000 ⁺	6.9099633	.000	54.617315	88.882685
IVC	IVA	-96.6500000 ⁺	6.9099633	.000	-113.782685	-79.517315
	IVB	-71.7500000 ⁺	6.9099633	.000	-88.882685	-54.617315

ConjuntoV

Prueba de homogeneidad de varianzas

Datos

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.586	2	27	.564

ANOVA

Datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	170443.850	2	85221.925	279.392	.000
Intra-grupos	8235.725	27	305.027		
Total	178679.575	29			

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

					Intervalo de confianza al 95%	
(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior
IV	VB	105.700000 ⁺	7.8105935	.000	86.334276	125.065724
	VC	183.950000 ⁺	7.8105935	.000	164.584276	203.315724
VB	IV	-1.0570000E2	7.8105935	.000	-125.065724	-86.334276
	VC	78.250000 ⁺	7.8105935	.000	58.884276	97.615724
VC	IV	-1.8395000E2	7.8105935	.000	-203.315724	-164.584276
	VB	-78.250000 ⁺	7.8105935	.000	-97.615724	-58.884276

ConjuntoVI

Prueba de homogeneidad de varianzas

Datos

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.070	2	27	.932

ANOVA

Datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10778.867	2	5389.433	74.734	.000
Intra-grupos	1947.100	27	72.115		
Total	12725.967	29			

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

					Intervalo de confianza al 95%	
(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior
VIA	VIB	27.100000 [*]	3.7977576	.000	17.683773	36.516227
	VIC	46.200000 [*]	3.7977576	.000	36.783773	55.616227
VIB	VIA	-27.100000 [*]	3.7977576	.000	-36.516227	-17.683773
	VIC	19.100000 [*]	3.7977576	.000	9.683773	28.516227
VIC	VIA	-46.200000 [*]	3.7977576	.000	-55.616227	-36.783773
	VIB	-19.100000 [*]	3.7977576	.000	-28.516227	-9.683773

Conjunto0

Prueba de homogeneidad de varianzas

Datos

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.506	2	27	.609

ANOVA

Datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	64.267	2	32.133	3.546	.043
Intra-grupos	244.700	27	9.063		
Total	308.967	29			

Comparaciones múltiples

Datos

HSD de Tukey

					Intervalo de confianza al 95%	
(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior
0A	0B	-3.0000000	1.3463256	.084	-6.338103	.338103
	0C	.2000000	1.3463256	.988	-3.138103	3.538103
0B	0A	3.0000000	1.3463256	.084	-.338103	6.338103
	0C	3.2000000	1.3463256	.062	-.138103	6.538103
0C	0A	-.2000000	1.3463256	.988	-3.538103	3.138103
	0B	-3.2000000	1.3463256	.062	-6.538103	.138103