



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**Escuela de Ingenierías Industriales**

**Departamento de Química Física y Química Inorgánica**



**DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA PARA EL  
ANÁLISIS DE UVAS BASADA EN SENSORES EQCM MODIFICADOS**

**D<sup>a</sup>. Celia García Hernández**

**Trabajo Fin de Máster**

**Máster Interuniversitario en Nanociencia y Nanotecnología Molecular**

**Dirigido por**

**Prof. D<sup>a</sup>. María Luz Rodríguez Méndez**

***Julio de 2015***



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, muchas gracias a la profesora D<sup>a</sup>. María Luz Rodríguez Méndez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por su labor de enseñanza en todos estos meses. He aprendido muchísimo de su enorme experiencia.

También, a mis compañeros de laboratorio, por su ayuda y por aportar ratos distendidos tan agradables que han ayudado a sobrellevar mejor el trabajo.

Además, expresar el agradecimiento a los siguientes proyectos de investigación por su financiación:

- “Desarrollo de una lengua bioelectrónica específica para el análisis de la maduración de uvas”, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2015). Referencia: AGL2012-33535.
- “Desarrollo de sensores y biosensores nanoestructurados para la detección de antioxidantes de interés en alimentación”, financiado por la Junta de Castilla y León (2013-2016). Referencia: VA-032U13.

A mi novio, Sergio, por aguantarme y por su apoyo incondicional. Gracias por darme ánimos todos los días.

Y, por último, pero no menos importante, a mis padres, mis hermanos y mi sobrino. Este logro es posible gracias al esfuerzo de mis padres. Muchas gracias por la dedicación y el amor que habéis puesto en vuestros hijos.



## RESUMEN

Se ha desarrollado una lengua electrónica formada por sensores basados en microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) modificados con ftalocianinas para estudiar los procesos asociados con las variaciones de masa que acompañan la oxidación/reducción de especies electroactivas presentes en los mostos.

Para ello, se han depositado películas delgadas nanoestructuradas de ftalocianina sulfónicas de cobre, nickel y hierro sobre electrodos de platino/cristal de cuarzo mediante la técnica de Layer by Layer. El crecimiento de las películas se monitorizó con espectroscopia UV-visible. Se estudió la variación de masa observando la variación de frecuencia del cristal de acuerdo con la Ecuación de Sauerbrey.

Una vez preparados los sensores, se han analizado mostos de variedades diferentes de uva (Juan García, Prieto Picudo, Mencía Regadío, Cabernet Sauvignon, Garnacha and Tempranillo) proporcionadas por la Estación Enológica de Castilla y León (Rueda, Valladolid), por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid) y la Bodega Cooperativa de Cigales (Cigales, Valladolid). Los sensores electroquímicos de cristal de cuarzo (EQCM) aportaron información de la composición global de las muestras de uva ofreciendo, simultáneamente, información voltamétrica y másica.

Los datos de la QCM y voltamétricos fueron procesados para evaluar la capacidad de la lengua electrónica para discriminar diferentes variedades de uva. Se llevaron a cabo análisis estadísticos utilizando el modelo no supervisado de PCA (análisis de componentes principales) para discriminar las muestras de mosto y PLS (regresión de mínimos cuadrados parciales) evidenció las correlaciones entre los datos voltamétricos y másicos con los indicadores químicos.

Este trabajo de investigación supone la primera vez que una lengua electrónica basada en sensores EQCM ha sido utilizada para discriminar variedades de uva de acuerdo a su composición global, utilizando para ello la respuesta voltamétrica y másica.

**Palabras clave:** Sensores EQCM, voltametría cíclica, películas de ftalocianina, masa, uvas.



## ABSTRACT

An electronic tongue based on quartz crystal microbalance sensors (QCM) modified with phthalocyanine films was developed to study the processes associated with the mass changes accompanying the oxidation/reduction of electroactive species of grapes juices. Nanostructured sulfonic phthalocyanines thin films of copper, nickel and iron were deposited on Pt/quartz crystal through Layer by Layer technique. Growth of phthalocyanines films was monitored by UV-vis spectroscopy. Mass change was studied by observing the frequency-shift of crystal according to the Sauerbrey equation.

Once prepared, the sensors were immersed in musts to analyze six different varieties of grapes (Juan García, Prieto Picudo, Mencía Regadío, Cabernet Sauvignon, Garnacha and Tempranillo). Electrochemical quartz crystal microbalance sensors (EQCM) provided information about global composition in grapes samples giving, simultaneously, voltammetric and mass information.

The outputs of EQCM and voltammetry were processed to evaluate the capability of the electronic tongue to discriminate varieties of grape. Statistical analysis was carried out using PCA (principal component analysis) to discriminate the must samples and PLS (partial least squares) evidenced the correlations between the voltammetric and mass outputs with the chemical indicators.

This is the first time that an electronic tongue based on EQCM sensors using both responses (voltammograms and massograms) has been used to discriminate varieties of grapes according to their global composition.

**Keywords:** EQCM sensors, cyclic voltammetry, phthalocyanine films, mass, grapes.



# ÍNDICE

---

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Motivación y justificación del Trabajo Fin de Máster .....	1
1.2	Objetivos del Trabajo Fin de Máster .....	2
1.3	El Sabor y las Lenguas Electrónicas .....	3
1.3.1	El sabor y su clasificación. Receptores del sabor.....	3
1.3.2	Lengua Electrónica.....	5
1.3.2.1	Concepto y ventajas.....	5
1.3.2.2	Estado del Arte. Desde sus inicios hasta hoy .....	8
1.3.3	Principales aplicaciones de las lenguas electrónicas .....	14
1.3.4	Tipos de sensores utilizados en lenguas electrónicas .....	16
1.3.5	Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) .....	20
1.3.6	Sensores modificados con material sensible. Ftalocianinas como material modificador.....	23
1.3.7	Técnicas de modificación de sensores. Técnica Layer by Layer .....	26
1.3.8	Tratamiento multivariante de datos.....	28
1.3.9	Lenguas electrónicas en el análisis de uvas, mostos y vinos.....	29
2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	33
2.1	Reactivos y muestras de uva .....	33
2.2	Medidas electroquímicas.....	34
2.3	Determinación del factor de sensibilidad del cristal de cuarzo .....	35
2.4	Preparación de los sensores EQCM .....	37
2.5	Caracterización UV-visible de las películas LbL.....	39
2.6	Red de sensores. Lengua electrónica.....	40
2.7	Análisis estadístico.....	40
3.	RESULTADOS .....	43
3.1	Caracterización UV-Visible de las películas LbL.....	43
3.2	Análisis en disolución acuosa .....	45
3.3	Análisis de mostos de uva .....	47
3.4	Análisis estadístico.....	50
4.	CONCLUSIONES .....	56
5.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS .....	57
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	59



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Motivación y justificación del Trabajo Fin de Máster

En los últimos años, se ha desarrollado una nueva herramienta denominada lengua electrónica, capaz de imitar el sentido del gusto/sabor, que se está aplicando en el análisis de alimentos. El desarrollo de nuevos métodos de análisis para caracterizar alimentos es de vital importancia para mejorar los sistemas de control de calidad actuales de los productos agroalimentarios. La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define una lengua electrónica cómo “un sistema de multisensores, que consiste en un número de sensores poco selectivos, que utiliza procedimientos matemáticos avanzados para el procesamiento de la señal basados en el reconocimiento de patrones y/o el análisis de datos multivariados, utilizando Artificial Neural Networks (ANNs), Principal Component Analysis (PCA), etc.” [1].

Los vinos del entorno de Castilla y León suponen un valor añadido a la riqueza agroalimentaria de la Región gracias a sus Denominaciones de Origen. Los vinos de la región se asientan sobre una superficie de viñedos de más de 75.000 hectáreas de las que el 86% son vinos ligados a figuras de calidad. En el año 2011, Castilla y León ocupó un 17,2% de la cuota de consumo de vino en el mercado nacional [2]. El trabajo de investigación que se presenta supone un interés socio-económico para nuestra Región. En concreto, en el RIS3 (Documento de Estrategia Regional de Investigación e Innovación para una especialización inteligente de Castilla y León, 2014-2020, de Junio de 2013), los sensores para la industria agroalimentaria se presentan como una de las tecnologías o aplicaciones tecnológicas que se consideran más importantes para Castilla y León dentro de la macroactividad de Agroalimentación. Además, la mejora de los métodos de control de calidad de vinos está contemplada como línea prioritaria por la OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) quien, en su Plan Estratégico (2012-2014), estableció como línea prioritaria (Punto J.4) “Desarrollar y evaluar métodos de análisis sensorial de los productos vitivinícolas” entre los que se encuentran las uvas.

Por otro lado, la nanotecnología permite encontrar soluciones novedosas que se pueden traducir en una mejora del rendimiento en el sector de la agroalimentación. Si bien, puede decirse que la nanotecnología, considerada como fuente de nuevos productos con alto valor añadido, se encuentra actualmente en una etapa inicial, se trata pues de un ámbito que está adquiriendo gran protagonismo y que tiene una gran proyección en la economía mundial.

Este Trabajo Fin de Máster se engloba dentro de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad denominado “*Desarrollo de una lengua bioelectrónica específica para el análisis de la maduración de uvas*” cuyo objetivo es desarrollar una lengua bioelectrónica para su aplicación en el análisis de uva, más concretamente, a la maduración de las uvas desde el envero hasta la post-vendimia con el fin de determinar el momento óptimo de la vendimia. En este proyecto colaboran activamente la Bodega Cooperativa de Cigales y la Estación Enológica de Castilla y León. Gracias a esta colaboración se dispuso de muestras de uva de diferentes variedades así como de los análisis químicos de las uvas (contenido de azúcar, pH, acidez, polifenoles, grado alcohólico, etc.).

## 1.2 Objetivos del Trabajo Fin de Máster

El objetivo principal de este trabajo de investigación es el desarrollo de una red de sensores nanoestructurados que conformen una lengua electrónica para el análisis mostos de diferentes variedades de uva. Estos sensores serán de tipo electroquímico basados en sensores QCM (microbalanza de cristal de cuarzo), que permitirán obtener de forma simultánea información másica. Además, el recubrimiento con películas nanoestructuradas de material sensible, en este caso de ftalocianinas, permitirá mejorar su especificidad.

Los objetivos específicos para llevar a cabo el trabajo de investigación son:

- Preparación de películas nanoestructuradas de ftalocianinas sobre la superficie de los sensores mediante la técnica de Layer by Layer.
- Caracterización de las películas nanoestructuradas de ftalocianinas mediante espectroscopia UV-visible.

- Evaluación de la respuesta de los sensores obtenidos a través de un antioxidante conocido para la evaluación de su reproducibilidad.
- Análisis de mostos de diferentes variedades mediante voltametría cíclica con el registro simultáneo de los cambios de masa que se producen en los sensores.
- Evaluación de la capacidad de la lengua electrónica para discriminar diferentes variedades de uva mediante análisis multivariante de datos (PCA).
- Obtención de correlaciones entre los parámetros químicos de las uvas y los datos obtenidos durante los análisis con la lengua electrónica (PLS).

### 1.3 El Sabor y las Lenguas Electrónicas

#### 1.3.1 El sabor y su clasificación. Receptores del sabor

El sabor se percibe principalmente por la lengua, aunque también por la cavidad bucal (paladar blando, pared posterior de la faringe y la epiglotis). Las papilas gustativas de la lengua registran los cuatro sabores básicos: dulce, ácido, salado y amargo, en determinadas zonas preferenciales de la lengua; así, lo dulce en la punta, lo amargo en el extremo posterior y lo salado y ácido en los bordes [3].

Además y en relación con la descripción de sensaciones gustativas, ha surgido un quinto sabor denominado umami (humámico, en castellano). La palabra proviene del japonés y se traduce como “sabroso” o sabor cárnico. Es frecuente designar el umami como el quinto sabor básico. Aún se desconoce en qué zonas de la lengua están localizados los receptores correspondientes.

El sabor ácido lo originan los iones hidronio (iones  $H_3O^+$ ) de los ácidos, aunque ello no basta para conferir toda la sensación de ácido. La sensación ácida percibida sensorialmente es proporcional al ácido determinado químicamente (valor pH). El sabor salado lo provocan sales inorgánicas de bajo peso molecular, por ejemplo la sal común o de cocina (NaCl), cloruro potásico (KCl), bromuro sódico (NaBr) o yoduro sódico (NaI). El sabor dulce

generalmente se asocia, de forma espontánea, con el azúcar. Pero existe una amplia gama de otros compuestos que también tienen un sabor dulce, entre otros, los polialcoholes (sorbitol, manitol, xilitol), los conocidos edulcorantes sintéticos (sacarina, ciclamato, aspartamo) y los aminoácidos. El sabor amargo viene definido por muchos compuestos químicos, y en especial por los alcaloides, como la cafeína o la quinina.

Entre los principales compuestos que producen la sensación gustativa de umami se cuentan las sales del ácido glutámico (principalmente el glutamato monosódico) y las sales disódicas de los purín-5'-monofosfatos, en especial el inosin-5'-monofosfato (IMP), guanosin-5'-monofosfato (GMP) y el adenosin-5'-monofosfato (AMP).

Las investigaciones sobre los mecanismos de recepción del sabor de las sustancias son muy recientes. Los receptores de amargura Taste-2 receptors (T2Rs) presentes en las células del gusto fueron descubiertos en el año 2000 seguido del descubrimiento de los receptores de dulzor (T1R2+T1R3) y los receptores del gusto umami (T1R1+T1R3). Aunque los mecanismos de recepción de los sabores salado y ácido todavía no han sido completamente definidos, poly-cystic kidney disease 2-like 1 protein (PKD2L) y epitelial sodium channel (ENaC) han sido identificados como los posibles receptores, respectivamente [4].

Cada receptor del gusto recibe múltiples sustancias químicas que constituyen un único sabor. Los receptores de sabor exhiben semi-selectividad más que una alta y fija selectividad. Alta selectividad significa correspondencia uno a uno a una sustancia química particular [4].

La información percibida por las papilas gustativas es transmitida a los nervios del gusto mediante la comunicación con neurotransmisores y finalmente alcanza el área gustativa en el cerebro.

## 1.3.2 Lengua Electrónica

### 1.3.2.1 Concepto y ventajas

Actualmente, el principal método de evaluación de sabor en la industria alimentaria consiste en análisis sensoriales, en los cuales evaluadores experimentados llamados panelistas sensoriales prueban las muestras para evaluarlas. No obstante, estos análisis tienen algunos inconvenientes como la baja objetividad y reproducibilidad así como la gran tensión impuesta a los panelistas. Para resolver este problema, se ha desarrollado una tecnología sensorial para discriminar y cuantificar el sabor de alimentos y bebidas de forma objetiva, llamada lengua electrónica. El nombre fue acuñado debido a que las lenguas electrónicas operan de forma similar al sentido del gusto humano.

La similitud entre la lengua biológica y la lengua electrónica se manifiesta en cada una de sus etapas. Así, en los sistemas de lengua electrónica la función del alimento lo realizan muestras de carácter líquido, que al tener un contacto íntimo con los sensores actúan de forma similar a la relación de los alimentos con las papilas gustativas. Los sensores no suelen ser todos iguales sino que poseen normalmente diferentes tipos de sensibilidad, de la misma forma que hay diferentes papilas para diferentes gustos. Los sensores del sistema de lengua electrónica realizan medidas que adquieren forma de señal eléctrica, esta señal suele precisar de un acondicionamiento antes de ser transmitida a un ordenador. De forma semejante, los nervios sensitivos del gusto transmiten la señal nerviosa al cerebro. En el ordenador se realiza un análisis de los datos para reconocer patrones de medidas o realizar clasificaciones por analogía mediante un software con los algoritmos apropiados para procesar la señal obtenida, que equivale al trabajo que realizan las neuronas del cerebro para procesar la información de la memoria y asociar el nuevo producto a un sabor conocido. En la Figura 1 se puede ver la analogía del sistema gustativo humano y las lenguas electrónicas.

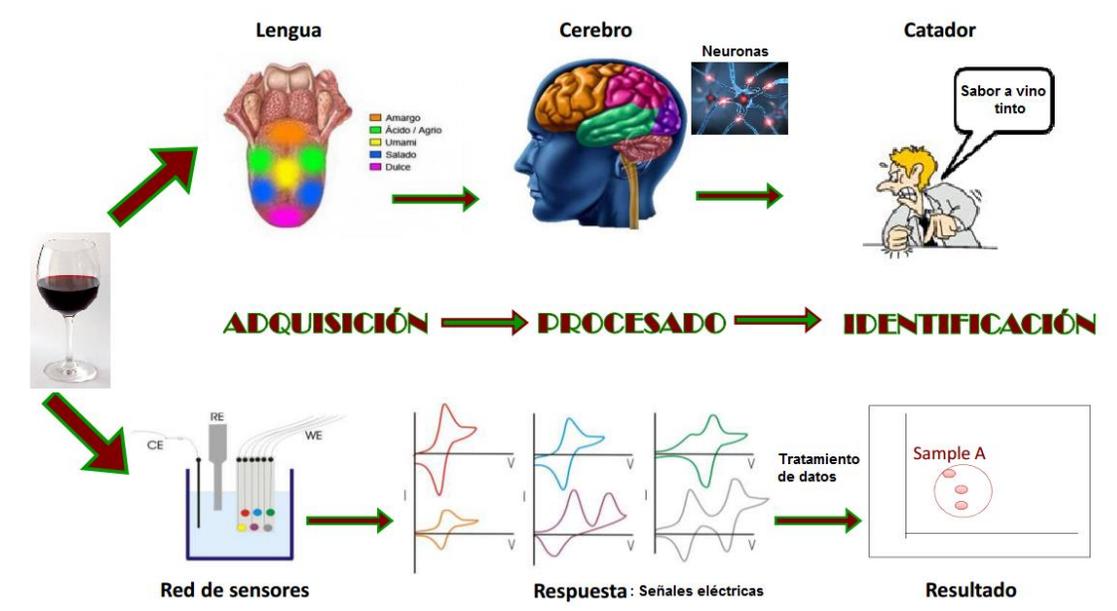


Figura 1. Analogía entre lengua humana y lengua electrónica.

Como ya se ha indicado anteriormente la IUPAC define una lengua electrónica como “un sistema de multisensores, que consiste en un número de sensores poco selectivos, que utiliza procedimientos matemáticos avanzados para el proceso de la señal basados en el reconocimiento de patrones y/o el análisis de datos multivariados, utilizando Artificial Neural Networks (ANNs), Principal Component Analysis (PCA), etc.” [1]; Sin embargo, los grupos de investigación que más han trabajado en este ámbito están de acuerdo en dar una definición más específica de lengua electrónica: “un instrumento analítico compuesto por una red de sensores no específicos, con baja selectividad química con especificidad parcial (sensibilidad cruzada) a diferentes componentes en una disolución, acoplados a un método apropiado de reconocimiento de patrones y/o calibración multivariante para el procesamiento de datos” [5].

Aunque, generalmente el concepto de sensor químico se utiliza para detectar específicamente una determinada sustancia química con una alta sensibilidad, los sensores gustativos biológicos no reconocen necesariamente sustancias químicas de forma individual.

Como ya se ha mencionado anteriormente, cada uno de los receptores de los cinco sabores básicos recibe simultáneamente múltiples sustancias químicas, mostrando un comportamiento semi-selectivo. Por lo tanto, es prácticamente imposible medir el sabor de

alimentos o bebidas que contienen varios cientos de tipos de sustancias gustativas por métodos analíticos químicos, tales como cromatografía de gases o cromatografía líquida, aunque sí que pueden utilizarse estos métodos para medir la concentración de sustancias químicas. Además, hay que tener en cuenta que existen interacciones entre los diferentes gustos (por ejemplo, el amargor del café es suprimido si se añade azúcar).

Las lenguas electrónicas presentan una selectividad global lo que se traduce en la descomposición de una sustancia química en cualidades del sabor y su cuantificación, en vez de discriminar cada sustancia química de forma individual [4, 6-8].

La combinación de sensores químicos no específicos con sensibilidad parcial se traduce en una sensibilidad cruzada, y la respuesta de la red de sensores que conforman la lengua electrónica frente a una muestra a analizar es una colección de señales (“fingerprint”, en castellano huella dactilar) que se puede relacionar a ciertas características o cualidades de la muestra utilizando el software apropiado. Las lenguas electrónicas son muy utilizadas para conseguir respuestas cualitativas sobre las muestras a estudio y solamente en algunos casos para predecir concentraciones de especies individuales [4, 6, 9-12].

Las lenguas electrónicas tienen el objetivo de discriminar y analizar alimentos y bebidas contribuyendo a la gestión de la calidad. Frente a los paneles de cata convencionales presentan la clara ventaja de que se pueden aplicar en flujo continuo para el control de calidad de procesos en línea en los procesos industriales, mientras que, no se puede tener a un experto catador de forma continua analizando muestras. Además, también se pueden utilizar para reconocer adulteraciones en los productos elaborados.

En la Tabla 1 se recogen las principales ventajas que presenta el uso de las lenguas electrónicas frente al uso de paneles de cata y las técnicas de análisis químico tradicionales, que incluyen el análisis químico y el análisis con equipos de alta generación (cromatografía gaseosa, HPLC, etc.).

Tabla 1. Principales ventajas de las lenguas electrónicas.

	Lenguas Electrónicas	Análisis Químico	Análisis Equipos alta Generación	Paneles de Cata
Simpleza, robustez	Si	No	No	Si
Gastos de diseño o adquisición	Bajos	Medios	Altos	Altos
Consumo de tiempo en mediciones	Bajo	Alto	Alto	Medio
Necesidad de personal altamente cualificado	No	No	Si	Si
Contaminación/ Destrucción de la muestra	No	Si	Si	Si
Generación de residuos	Baja	Alta	Baja	Alta
Posibilidad de medición <i>in situ</i>	Si	Si	No	No
Posibilidad de incorporación del sistema de medición en líneas de producción (ej. Industria alimentaria)	Si	No	No	No

### 1.3.2.2 Estado del Arte. Desde sus inicios hasta hoy

En la década de los 90, mientras se llevaban a cabo investigaciones de los procesos biológicos y moleculares implicados en los receptores del gusto, por otro lado, se empezaban a desarrollar tecnologías sensitivas para evaluaciones objetivas de discriminación o de cuantificación de sabores, anteriores a los descubrimientos de los receptores del gusto indicados anteriormente.

La mayoría de los trabajos en el campo de las lenguas electrónicas han utilizado principalmente sensores potenciométricos, donde se mide el potencial de membrana creado por la difusión de iones a través de una membrana selectiva [13, 14]. También se han publicado muchos trabajos con sensores amperométricos basados en una gran variedad de materiales, entre ellos membranas dopadas con metalofalocianinas o porfirinas [15, 16] y sensores impedimétricos cubiertos con diferentes materiales orgánicos (incluyendo polímeros conductores, perilenos, ftalocianinas, nanotubos de carbono) [17]. Por último, también se han desarrollado los sensores voltamétricos que permiten una mayor versatilidad y sensibilidad

que los anteriores [18-21]. También se han desarrollado sistemas híbridos, principalmente combinando sensores voltamétricos y potenciométricos [5, 22].

El primer sistema para análisis en líquidos basado en el uso de un sistema con múltiples sensores fue desarrollado por Otto y Thomas en 1985 [23]. En este trabajo se analizaron concentraciones de iones metálicos con electrodos de ion selectivo (ISEs, ion-selective electrodes) no específicos. Se demostró la capacidad de la red de sensores para determinar concentraciones de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  en líquido intracelular, orina o sueros.

En 1989, Toko y colaboradores solicitaron una patente para su sensor potenciométrico para el sabor. Desarrollaron un sensor de sabor equipado en un sistema multicanal de electrodos utilizando una membrana lipídica inmovilizada con un polímero como transductor [24]. Este sensor de sabor es considerado la primera lengua electrónica con selectividad global y se ha aplicado en el análisis de numerosas bebidas tales como cerveza, sake, café, té o leche, entre otras [4].

Después de la presentación de esta primera lengua electrónica y, hasta la fecha, se han publicado numerosos trabajos sobre esta tecnología, principalmente aplicada al análisis de alimentos y bebidas, ya que, se considera una tecnología novedosa de detección que puede contribuir en gran medida a la gestión de calidad. De este modo, a principios de los 90's, el diseño y presentación de estas nuevas herramientas de análisis tipo lengua electrónica (igualmente, nariz electrónica) se hizo muy popular. Estos sistemas tenían en común el uso de "arrays" compuestos por un número de sensores (mayormente sensores potenciométricos) para realizar análisis cualitativos de muestras, que incluían la discriminación y detección de especies químicas, identificación de aromas o sabores y la separación de productos de mayor calidad de otros de calidad inferior, entre otros aspectos.

Uno de los grupos de investigación más importantes en este campo, que se puede considerar como pionero en el diseño de lenguas electrónicas (así como de narices electrónicas) es el Laboratorio de Física Aplicada de la Universidad de Linköping (Suecia). En 1997, Winquist y Lundström desarrollaron una lengua electrónica basada en técnicas

voltamétricas para el análisis de zumos de fruta, bebidas y leche. Además, pudieron detectar el proceso de envejecimiento de la leche y del zumo de naranja con el sistema desarrollado [25].

Después de este trabajo, en el año 2000, combinaron las medidas de potenciometría, voltametría y conductividad para fabricar una lengua electrónica híbrida para el análisis de leche fermentada [26]. Se utilizaron electrodos de ión selectivo para medir el pH, el dióxido de carbono y la concentración de iones de cloro. La lengua electrónica consistía en seis electrodos de trabajo de diferentes metales.

En el año 2002, Winquist y colaboradores desarrollan un sistema de medida basado en la técnica de análisis de inyección de flujo aplicado a una lengua electrónica voltamétrica para el análisis de diferentes disoluciones estándar y para la clasificación de diferentes zumos de manzana [27].

Otro grupo de investigación que se dedica al diseño de lenguas electrónicas desde los años 90 es el que dirige el Profesor Vlasov del Departamento de Química de la Universidad de San Petersburgo (Rusia) que junto con el grupo de los Profesores Di Natale y Paolesse en la Universidad de Tor Vergata de Roma (Italia) han realizado importantes avances en el desarrollo de lenguas electrónicas potenciométricas. En 1997, este grupo aplicó sensores potenciométricos de ión selectivo en estado sólido basados en vidrio de calcogenuro en una lengua electrónica para detectar iones de metales pesados en disoluciones [28], en el análisis de bebidas (té, cerveza, café, zumos, bebidas sin alcohol, etc.) [29] y en el análisis de aguas contaminadas [30]. Más adelante, entre los años 2003 - 2007 publicaron algunos trabajos en los que se aplicaban estos electrodos en el análisis de aguas minerales, vinos y bebidas alcohólicas [1, 31, 32].

Durante los últimos años, se han utilizado diferentes materiales electroactivos como polímeros conductores o ftalocianinas para aumentar la sensibilidad de los sensores aplicados en lenguas electrónicas gracias a sus propiedades electrocatalíticas [33].

La primera lengua electrónica voltamétrica basada en electrodos modificados químicamente se desarrolló en los años 2003-2004 en el Laboratorio de Química Inorgánica y Química Física de la Universidad de Valladolid dirigido por la Profesora María Luz

Rodríguez-Méndez [34, 35]. Esta lengua electrónica estaba basada en sensores preparados con pasta de grafito donde las ftalocianinas se mezclaron con polvo de grafito y aceite mineral (Nujol) y se aplicaron en el análisis de vinos. En los años siguientes, Rodríguez-Méndez y colaboradores publicaron numerosos trabajos basados en lenguas electrónicas voltamétricas con electrodos modificados con ftalocianinas en el análisis de vinos y uvas [18, 19, 20, 36-49].

En los últimos 10 años, se han publicado numerosos artículos de lenguas electrónicas basadas en sensores modificados. Además, se ha comprobado que las películas delgadas tienen un gran potencial para mejorar la sensibilidad de los sensores químicos ya que aumenta la relación superficie/volumen y se incrementa el número de sitios activos que permiten a que las moléculas de analito se adsorban y desorban más fácilmente [33]. Se están utilizando numerosas técnicas de deposición de películas delgadas nanoestructuradas sobre las superficies de los electrodos como, por ejemplo, spin-coating, drop casting, Langmuir-Blodgett, Layer by Layer, Autoensamblado, deposición física de vapor o electrodeposición [33, 43, 50].

Además de polímeros conductores o ftalocianinas, otros materiales como las partículas metálicas (nanopartículas de oro) o nanotubos de carbono han demostrado propiedades electrocatalíticas para aplicaciones en lenguas electrónicas [51]. Recientemente, Rodríguez-Méndez y colaboradores investigaron el uso de sensores voltamétricos basados en electrodos químicos de películas de Langmuir-Blodgett (LB) de n-dodecanotiol funcionalizado con nanopartículas de oro para el análisis de ácidos orgánicos y fenólicos de interés en la industria del vino [43].

Yendo un poco más allá, se está investigando la combinación de más de un material sensible como, por ejemplo, ftalocianinas y nanopartículas metálicas en un mismo electrodo con el fin de aprovechar la interacción sinérgica que se produce debido a esta combinación. Se ha demostrado que existe tal efecto en la interacción entre las nanopartículas de oro y la ftalocianina de nickel tratasulfonada [52] y también se ha demostrado un efecto sinérgico entre las nanopartículas metálicas de plata y oro y la ftalocianina de zinc en su estudio de reducción electrocatalítica de  $O_2$  sobre electrodos de carbono vítreo [53].

También de reciente surgimiento son los llamados biosensores electroquímicos que se están aplicando en el campo de las lenguas electrónicas dando lugar a las llamadas *lenguas bioelectrónicas*. Se presentan como una alternativa interesante para el análisis de fenoles y azúcares gracias a su alta sensibilidad y selectividad [33]. Estos sensores contienen enzimas tales como tirosinasa o glucosa oxidasa que se combinan con mediadores electrónicos (ftalocianinas, nanopartículas metálicas, polímeros conductores, etc.) Se ha demostrado que la red de biosensores combina las ventajas de una red clásica de sensores electroquímicos que proveen información global de las muestras a analizar con la especificidad de la reacción enzima-sustrato típica de los biosensores [38, 41].

Actualmente, existen diversos grupos de investigación a nivel internacional que han realizado importantes avances en el diseño de lenguas electrónicas y que han dedicado esfuerzos en el campo de la alimentación. Estos grupos están dirigidos por los mayores expertos en lenguas electrónicas. Algunos ejemplos se citan a continuación:

- Análisis de aceite de oliva. Prof. Constantin Apetrei en la Universidad de Galati (Rumania) y María Luz Rodríguez-Méndez en la Universidad de Valladolid (España).
- Análisis de Té. Prof. Banerjee y Prof. Ghosh en la Universidad de Jadavpur (India).
- Análisis de fermentación alcohólica en el proceso de elaboración del vino. Prof. Buratti en la Universidad de Milan (Italia).
- Análisis de leche. Prof. Ciosek en la Universidad Tecnológica de Varsovia (Polonia).
- Análisis de uvas y cavas. Prof. Manel del Valle en la Universidad Autónoma de Barcelona (España).
- Análisis de carne y pescado. Prof. Gil en la Universidad Politécnica de Valencia (España).

- Análisis de zumos de frutas. Prof. Jiménez-Jorquera en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona (España).
- Análisis de aceites vegetales y quesos. Prof. Lvova en la Universidad de San Petersburgo (Rusia).
- Análisis de café. Prof. Oliveira en la Universidad de Sao Paulo (Brasil).
- Análisis de vino. Prof. Paolesse y Prof. Di Natale en la Universidad de Tor-Vergata (Italia).
- Análisis de gliadina en alimentos. Prof. Peres en el Instituto Politécnico de Bragança (Portugal).
- Análisis de uvas, mostos y vinos. Prof. María Luz Rodríguez-Méndez en la Universidad de Valladolid (España).
- Análisis de fermentación de alimentos. Prof. Rudnitskaya en la Universidad de Aveiro (Portugal) y Prof. Legin en la Universidad de San Petersburgo (Rusia).
- Análisis de cervezas. Prof. Toko en la Universidad de Kyushu (Japón) y Prof. María Luz Rodríguez-Méndez en la Universidad de Valladolid (España).
- Análisis de agua de consumo. Prof. Vagin y Winqvist en la Universidad de Linköping (Suecia).

Por su parte, hasta el momento, no hay constancia de la aplicación de una QCM como lengua electrónica en el análisis de alimentos. En el campo de la alimentación, se ha desarrollado un inmunosensor piezoeléctrico basado en QCM para determinar residuos de pesticidas y metabolitos en zumos de frutas [54].

La mayoría de las aplicaciones de los sensores QCM es en narices electrónicas para el análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). El grupo de sensores de la Universidad de Tor Vergata de Roma dirigido por los Profesores Di Natale y Paolesse ha diseñado una nariz

electrónica comercial basada en sensores QCM recubiertos con porfirinas para el análisis de gases y vapores orgánicos (VOCs) [55-58]. También tienen una amplia aplicación como inmunosensores piezoeléctricos para el reconocimiento de interacciones biomoleculares [59-61].

Las QCM se han utilizado como sensor gravimétrico en muchos tipos de estudios electroquímicos (EQCM), entre los que se incluyen: deposición de metales; estudios de corrosión; formación de óxidos; estudio de disoluciones (ej. oxidación de fenoles); adsorción/desorción de surfactantes; adsorción/desorción de enzimas; cambios en la conductividad de películas poliméricas durante procesos redox; estudios de electropolimerización; estudios de inserción de iones; estudios de transferencia de carga durante procesos redox (ej. ftalocianinas y fullerenos) [62-72].

El grupo de Rodríguez-Méndez de la Universidad de Valladolid ha estudiado la oxidación de fenoles que se encuentran presentes en los vinos con electrodos de platino de cristal de cuarzo modificados con bisftalocianina de lutecio [39].

### **1.3.3 Principales aplicaciones de las lenguas electrónicas**

Las lenguas electrónicas han tenido muchas aplicaciones en varias áreas industriales, principalmente en la industria farmacéutica y en la industria de alimentación.

En la industria alimentaria se ha empleado esta novedosa tecnología en los controles de calidad durante la producción, en la etapa de almacenamiento de alimentos (aguas minerales, vinos, zumos, café, leches, etc.), en la optimización de biorreactores, en el control de los procesos de envejecimiento (quesos, vinos), en el análisis del envejecimiento del sabor en las bebidas (zumos de frutas, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, leche, etc.) o en la cuantificación del amargor de bebidas o compuestos disueltos (amargor del café o de la cerveza), entre otros.

En la Tabla 2 se recogen algunos ejemplos de aplicaciones de lenguas electrónicas en el campo de la alimentación.

Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones de lenguas electrónicas en alimentos y bebidas.

<b>Alimento / Bebidas</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>
<i>Aceite de oliva</i>	Combinación de una lengua, nariz y ojo electrónicos para caracterizar aceites de oliva con diferente grado de acidez.	[73]
<i>Té</i>	Predicción del contenido en teaflavina y tearubigina en té negro utilizando una lengua electrónica voltamétrica	[74]
<i>Bebidas alcohólicas (fermentación)</i>	Aplicación de una lengua electrónica para el estudio de la fermentación del vino rojo.	[75]
<i>Leche</i>	Clasificación de diferentes tipos de leche mediante una lengua electrónica.	[76]
<i>Uvas y vinos</i>	Aplicación de una lengua electrónica para estudiar el efecto de trozos de madera y microoxigenación en el proceso de envejecimiento del vino tinto.	[36]
	Aplicación de una lengua electrónica y bioelectrónica basada en ftalocianinas en el análisis de uvas rojas.	[37]
	Aplicación de una lengua bioelectrónica con enzimas y bisftalocianina de lutecio en el análisis de uvas.	[38]
	Aplicación de una lengua bioelectrónica para la cuantificación del contenido total en polifenoles en vino.	[77]
<i>Carne</i>	Estudio de los cambios físico-químicos y microbiológicos en carne fresca de cerdo mediante una lengua electrónica potenciométrica.	[78]
<i>Pescado</i>	Estudio de la frescura del pescado mediante una lengua electrónica basada en sensores	[79]
<i>Zumos de frutas</i>	Clasificación y caracterización de diferentes zumos de uva blanca utilizando una lengua electrónica híbrida.	[80]
<i>Aceites vegetales</i>	Aplicación de una lengua electrónica potenciométrica en el control de calidad de aceite vegetal.	[81]
<i>Quesos</i>	Estudio de la liberación de sal de quesos suaves en el entorno oral y digestivo.	[82]
<i>Café</i>	Análisis de café con una lengua electrónica.	[83]
<i>Gliadina en alimentos</i>	Aplicación de una lengua electrónica para la semi-cuantitativa de gliadina en alimentos.	[84]
<i>Fermentación de alimentos</i>	Estudio de medios de cultivo de fermentación con una lengua electrónica.	[85]
<i>Cerveza</i>	Discriminación de cerveza utilizando una lengua electrónica portátil.	[86]
<i>Aguas de consumo</i>	Análisis de agua de consumo mediante una lengua electrónica voltamétrica.	[87]

En la industria farmacéutica se ha empleado para cuantificar la eficiencia en el enmascaramiento del sabor de comprimidos, jarabes, polvos, cápsulas o pastillas, así como para analizar la estabilidad de las medicinas en términos del sabor.

Además, también se han aplicado las lenguas electrónicas en el campo de la medicina, en diagnósticos no invasivos (orina, sudor, saliva, etc.) o en el análisis clínico; en el campo de la seguridad, en la detección de armas químicas y biológicas y en la detección de drogas y explosivos; en el campo de la vigilancia ambiental, en el monitoreo de la contaminación industrial y de agricultura, en la identificación de sustancias tóxicas o en la detección de fugas peligrosas y, en la industria química, en la pureza de productos o en el seguimiento de procesos.

#### **1.3.4 Tipos de sensores utilizados en lenguas electrónicas**

El corazón de una lengua electrónica es la red de sensores, capaces de captar señales físicas o químicas de su entorno y convertirlas en señales eléctricas.

Un sensor químico es un sistema que permite obtener una respuesta en tiempo real al recibir un estímulo. Están constituidos básicamente por una membrana sensible (receptor, R) a un estímulo o señal primaria de naturaleza electroquímica, óptica, térmica, másica, etc.; un transductor (T) que convierte esta señal primaria en una señal secundaria de tipo eléctrica; y un sistema de adquisición y acondicionamiento (A) para su lectura (Fig. 2). Así, la información transformada puede ser cuantificada, manipulada y procesada por sistemas electrónicos o informáticos.

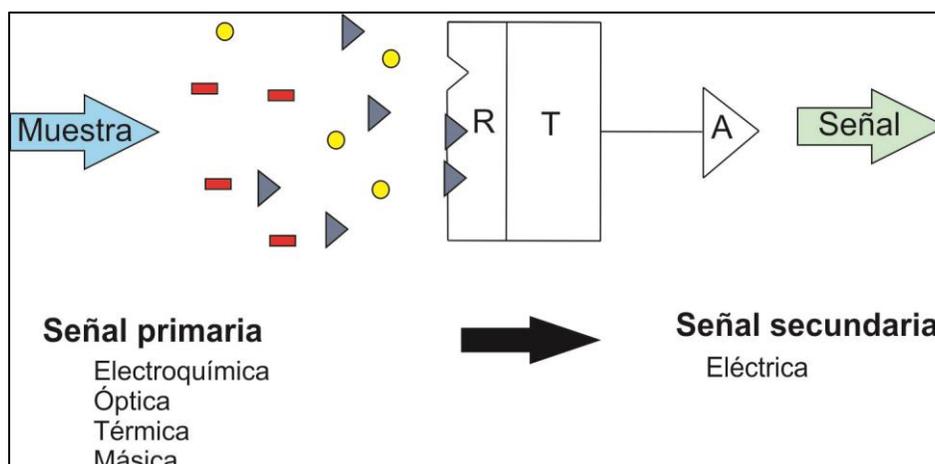


Figura 2. Esquema básico del funcionamiento de un sensor químico.

Los sensores utilizados en las lenguas electrónicas pueden ser de tipo óptico, electroquímico o gravimétrico, entre otros. Entre los sensores electroquímicos, los más utilizados son los potenciométricos, amperométricos, voltamétricos e impedimétricos debido a su especificidad, alta sensibilidad, bajo tiempo de respuesta y facilidad de operación [88, 89].

En los sensores potenciométricos, un electrodo de trabajo cubierto con una membrana se introduce en la muestra a analizar. El potencial creado en la interfase membrana/solución, que depende de la naturaleza del material del electrodo y de la composición de la solución es medido. Estos sensores se pueden preparar de diferentes materiales, membranas y técnicas [13].

En los sensores voltamétricos, se aplica un voltaje de polarización mientras se mide la corriente. Los voltamogramas muestran picos asociados a la oxidación y reducción de las moléculas presentes en la solución y su intensidad es proporcional a la concentración. Este sistema es muy versátil porque se pueden utilizar diferentes materiales en los electrodos y se pueden aplicar diferentes técnicas de estudio (voltametría cíclica, voltametría de pulso o voltametría de onda cuadrada) [18, 19, 87].

En los sensores amperométricos, se aplica la voltametría como etapa preliminar para estudiar el potencial de oxidación del analito. Una vez establecido se llevan a cabo medidas amperométricas para medir la corriente eléctrica entre los electrodos [90].

En los sensores impedimétricos, el electrodo se somete a una señal eléctrica alterna de diferente frecuencia. Entre las diferentes representaciones gráficas de los datos impedimétricos, las más comunes son los diagramas de Nyquist y los diagramas de Bode que dan información sobre el proceso electroquímico que ocurre en el electrodo en disolución [88].

Dentro de los sensores gravimétricos las microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM) se presentan como una alternativa o complemento a los sensores electroquímicos. En los sensores QCM el elemento sensible es un resonador cubierto por un electrodo capaz de detectar cambios de masa del orden de  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  o  $\text{ng}/\text{cm}^2$  que se traducen en un cambio en la frecuencia de oscilación del cristal pero, además, proporcionan señales electroquímicas (EQCM, electrochemical quartz cristal microbalance) cuando se conectan a un potenciostato [39]. La Figura 3 muestra un diagrama esquemático de una EQCM. En este sentido suponen una ventaja frente a los sensores electroquímicos tradicionales ya que proporcionan más información (máscica y electroquímica). En la Figura 4, se observa un ejemplo típico de representación del voltamograma y masograma obtenido durante la electrodeposición de Cu mediante voltametría cíclica a partir de una disolución de  $\text{CuSO}_4$  sobre un cristal de cuarzo cubierto con un electrodo de Au. Se puede observar un descenso claro en la frecuencia del cristal durante la deposición de Cu (reducción), lo que se traduce en un aumento en la masa depositada sobre el cristal [91].

Recientemente, se están introduciendo con éxito sensores bioquímicos en la tecnología de las lenguas electrónicas (lenguas bioelectrónicas). Estos sistemas combinan las ventajas de las redes de sensores clásicas, que proporcionan una información global de la muestra, con la especificidad típica del biosensor [9, 92]. En los biosensores se pueden incorporar enzimas específicas para la detección de fenoles (por ejemplo, tirosinasa, lacasa o peroxidasa) [38] o enzimas específicas para la detección de azúcares (por ejemplo, glucosa oxidasa o fructosa deshidrogenasa), entre otras.

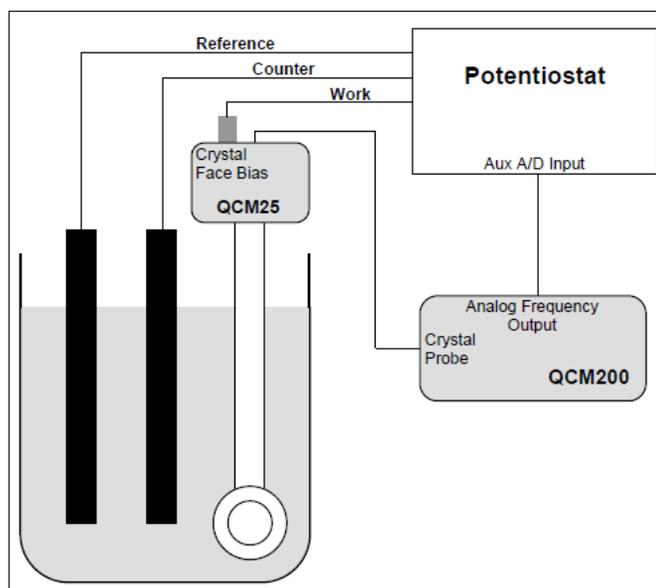


Figura 3. Microbalanza de cristal de cuarzo conectada a un potenciostato para obtener medidas electroquímicas.

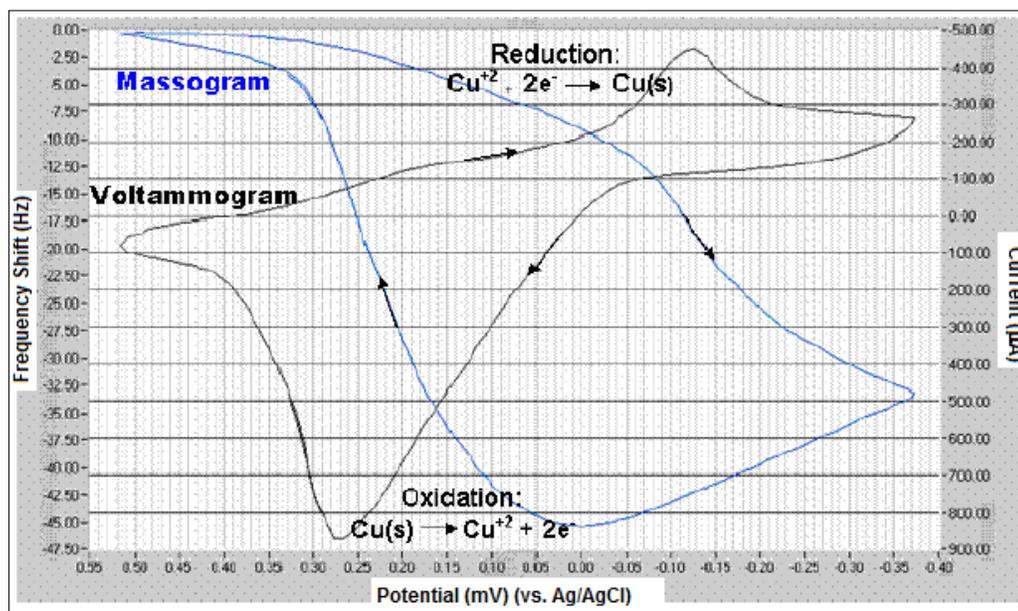


Figura 4. Voltammograma/Masograma del proceso de electrodeposición de cobre sobre un electrodo de QCM.

### 1.3.5 Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)

Las microbalanzas de cristal de cuarzo (Figura 5) se basan en el efecto piezoeléctrico del cristal de cuarzo, efecto por el cual aparece una diferencia de potencial eléctrico en el cristal cuando éste se somete a una deformación mecánica (compresión, torsión, estiramiento, etc.). Raleigh (1985) [93] fue el primer investigador en estudiar el efecto piezoeléctrico del cuarzo, aunque la primera investigación exhaustiva fue llevada a cabo por Jacques and Pierre Curie en 1880 [94].



Figura 5. Microbalanza de cristal de cuarzo (Modelo QCM200, Stanford Research Systems).

Los materiales piezoeléctricos pueden convertir la tensión mecánica en electricidad, y viceversa. Los cristales de cuarzo presentan átomos de silicio y oxígeno en un patrón repetitivo. Los átomos de silicio tienen una carga positiva y los átomos de oxígeno tienen una carga negativa. Normalmente, cuando el cristal no está bajo ningún tipo de estrés externo, las cargas se dispersan uniformemente a través del cristal. Pero cuando el cuarzo se deforma, el orden de los átomos cambia ligeramente. Este cambio causa que las cargas negativas se acumulen en un lado y las cargas positivas se acumulen en el lado opuesto. Cuando se conectan en un circuito externo los extremos del cristal se puede utilizar esta diferencia de potencial para producir corriente. Por el contrario, enviar una corriente eléctrica a través del cristal cambia su forma.

Un resonador piezoeléctrico de cristal de cuarzo es una porción cortada de un cristal de cuarzo natural o sintético. Una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) consiste en un disco delgado de cuarzo con una lámina de electrodo depositada sobre el mismo (Figura 6) [95].

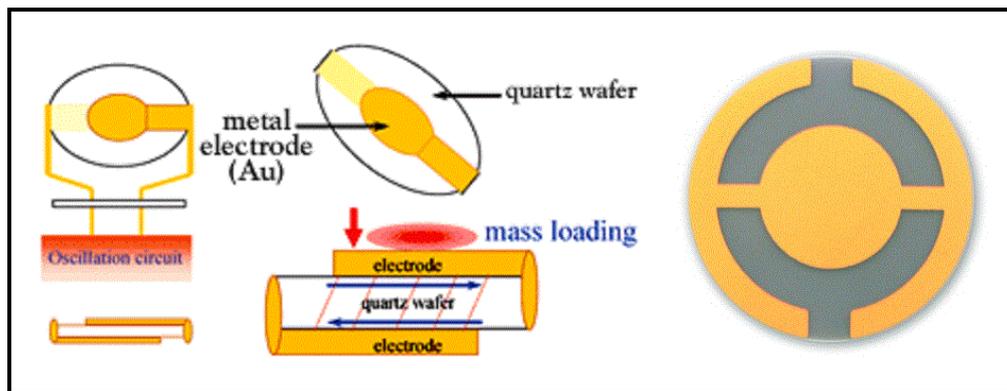


Figura 6. Esquema de un cristal piezoeléctrico típico

La aplicación de un potencial eléctrico externo al material piezoeléctrico produce un estrés mecánico interno que deforma el cristal. Como el QCM es piezoeléctrico, un campo eléctrico alterno aplicado al dispositivo induce una onda acústica que se propaga a través del cristal y encuentra la mínima impedancia cuando el espesor del mismo es un múltiplo de la mitad de la longitud de onda de la onda acústica. Un QCM es un dispositivo en modo cizalla en el que la onda acústica se propaga en dirección perpendicular a la superficie del cristal [96]. Para que esto ocurra, el cristal de cuarzo se tiene que cortar en una orientación específica con respecto de los ejes del cristal. Para el caso de las microbalanzas de cristal de cuarzo, el corte más utilizado es el corte AT, que se obtiene cortando el cristal a  $35^\circ$  de inclinación con respecto al plano XZ, ya que presenta un excelente comportamiento térmico debido a que la frecuencia se mantiene bastante estable frente a las variaciones de temperatura [97].

La deposición de una película delgada de material sobre la superficie del cristal de cuarzo disminuye la frecuencia fundamental de oscilación del cristal en proporción a la masa de la película. Una oscilación en resonancia se consigue incluyendo el cristal en un circuito de oscilación donde las oscilaciones eléctricas y mecánicas son próximas a la frecuencia fundamental del cristal. La frecuencia fundamental depende del espesor de la oblea, su estructura química, su forma y su masa. Sauerbrey (1959) fue el primero en reconocer el

potencial en la utilización de esta tecnología y demostrar la naturaleza sensitiva de estos dispositivos piezoeléctricos. El resultado de su trabajo se plasma en la Ecuación de Sauerbrey (Ec. 2), que relaciona el cambio de masa por unidad de superficie en el electrodo de QCM con el cambio observado en la frecuencia de oscilación del cristal [98]:

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde  $\Delta f$  es el cambio observado en la frecuencia de oscilación,  $C_f$  es la constante de Sauerbrey o factor de sensibilidad del cristal y  $\Delta m$  es el cambio en la masa por unidad de área.

La microbalanza de cristal de cuarzo permite detectar cambios de masa del orden de  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  o  $\text{ng}/\text{cm}^2$ .

La aplicación de las QCM tiene sentido, ya que muchos procesos físicos y químicos se pueden estudiar observando los cambios de masa asociados a los mismos. En la mayoría de los procesos electroquímicos, se producen cambios de masa de material que se deposita o se pierde sobre el electrodo de trabajo [91]. Es de interés monitorizar estos cambios de masa de manera simultánea a la respuesta electroquímica y la QCM ofrece esta posibilidad. Por otro lado, proporcionan señales electroquímicas (EQCM) cuando se conectan a un potencióstato (*véase apartado 1.3.4*).

En el presente trabajo de investigación, se ha utilizado una microbalanza de cristal de cuarzo en las medidas electroquímicas (EQCM) de voltametría cíclica. Los sensores que se han utilizado son cristales de cuarzo (corte AT y frecuencia de oscilación de 5 MHz) con una lámina de platino como electrodo. El uso de este dispositivo durante la voltametría cíclica ha permitido registrar de manera simultánea información voltamétrica y másica (voltamogramas y masogramas, respectivamente), lo que se traduce en una ventaja a la hora de extraer información de los experimentos realizados.

### 1.3.6 Sensores modificados con material sensible. Ftalocianinas como material modificador

La modificación de la superficie de los electrodos con material electroactivo y electrocatalítico (por ejemplo, ftalocianinas, nanopartículas o polímeros conductores) mejora la selectividad de los electrodos [20, 34, 40]. En lenguas electrónicas voltamétricas, los voltamogramas muestran picos de oxidación y reducción asociados tanto a las muestras analizadas como a los materiales sensibles que modifican el electrodo. La interacción entre el electrodo y la disolución mejora extraordinariamente la selectividad de los electrodos debido a: 1) el carácter oxidativo o de reducción de la muestra puede modificar el potencial de oxidación del material del electrodo; 2) la actividad electrocatalítica del material del electrodo puede facilitar la oxidación/reducción de los componentes disueltos en la muestra; 3) el carácter ácido/básico de la muestra puede protonar/desprotonar el electrodo y, 4) la naturaleza y concentración de iones presentes en la muestra que difunden hacia el interior del material sensible mantienen la electroneutralidad.

#### Ftalocianinas como material sensible [42]

Una ftalocianina (Pc) es un macrociclo simétrico formado por cuatro unidades isoindólicas (Figura 7).

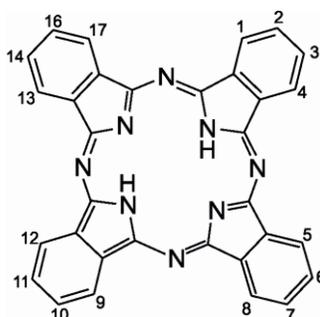


Figura 7. Anillo de ftalocianina.

La molécula más sencilla es la ftalocianina sin metal central ( $H_2Pc$ ) cuya estructura ofrece múltiples posibilidades de modificación a partir de la introducción de diferentes iones metálicos, ligandos axiales o coordinación a sistemas aromáticos diferentes (Figura 8).

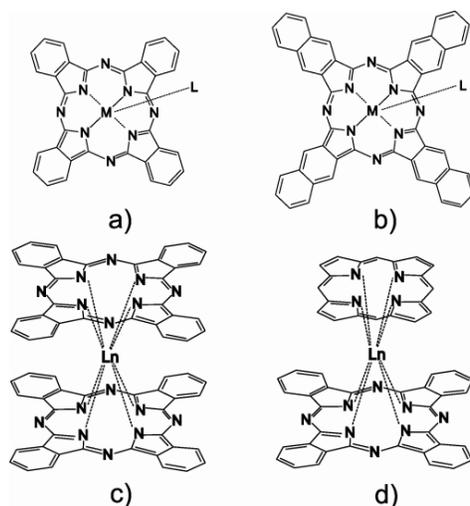


Figura 8. a) Metaloftalocianina, b) Naftalocianina, c) Bisftalocianina de lantánico, d) Ftalocianina-porfirinira heteroléptica.

Las metaloftalocianinas (MPc) consisten en un anillo de ftalocianina coordinado a un ión metálico (+2) situado en la cavidad central (figura 8.a). Las naftalocianinas (NPC) se caracterizan por una estructura con conjugación extendida (figura 8.b). Las ftalocianinas también pueden formar complejos tipo sándwich (*double decker*), en los cuales un ión lantanoide está coordinado a los dos anillos de ftalocianina ( $\text{LnPc}_2$ ) (figura 8.c). Así mismo, los complejos triples (*triple decker*) consisten en la asociación de dos iones lantanoideos con tres anillos de ftalocianina. Existen también derivados dobles y triples heterolépticos, que contienen diferentes ligandos tetrapirrólicos (Figur 8.d.) Los complejos denominados *double* o *triple decker* presentan fuertes interacciones  $\pi$  que dan lugar a interesantes propiedades electrónicas y ópticas. Existen estructuras más complejas donde los anillos de ftalocianina forman dímeros, trímeros o estructuras poliméricas, en las cuales los anillos de Pc se encuentran unidos mediante enlace covalente.

A continuación, se enumeran las propiedades más interesantes de las metaloftalocianinas que hacen que estos compuestos sean muy empleados como materiales sensibles:

- *Semiconductividad*: Las MPc se comportan como semiconductores de tipo p cuando están dopadas con oxígeno, presentando conductividades en el rango  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$   $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 300K. Las bisftalocianinas de lantánidos,  $\text{LnPc}_2$ ,

presentan una alta conductividad intrínseca ( $\sigma=10^{-6}-10^{-3} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a  $T=300\text{K}$ ) asociada al estado neutro radical y a la fuerte interacción electrónica entre los dos anillos de Pc.

- *Propiedades ópticas:* El sistema  $\pi$  conjugado que poseen las ftalocianinas da lugar a intensas bandas de absorción en la región 400-700 nm con coeficientes de extinción molar de aproximadamente  $2\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  en disolución. Algunos derivados presentan también bandas en la región NIR, coincidentes con las longitudes de onda que se emplean en telecomunicación. La interacción de las ftalocianinas con compuestos aceptores y donadores de electrones originan cambios reversibles en el espectro de absorción electrónica.
- *Propiedades electroquímicas, electrocatalíticas y electrocromáticas:* El anillo Pc es un sistema aromático de 18 electrones que en estado neutro posee dos cargas negativas Pc ( $2^-$ ). La estructura electrónica de las ftalocianinas permite tanto la oxidación, dando lugar a las especies Pc ( $1^-$ ) y Pc (0) por cesión de uno y dos electrones, respectivamente, como la reducción del anillo de Pc, dando lugar a las especies Pc ( $3^-$ ), Pc ( $4^-$ ), Pc ( $5^-$ ) y Pc ( $6^-$ ) en etapas que implican de uno a cuatro electrones. Además, se puede producir una variación en el estado de oxidación del ión del metal central. Un ejemplo de ello es la CoPc, donde el Co (II) puede oxidarse a Co (III) o reducirse a Co (I). Los potenciales electroquímicos a los cuales tienen lugar las oxidaciones y reducciones dependen de la naturaleza del ión del metal central, la clase de ftalocianina y la presencia de sustituyentes en el anillo aromático.
- Otras propiedades son su alta estabilidad térmica y química y que se pueden aplicar de forma sencilla en la preparación de electrodos químicamente modificados.

En el trabajo de investigación que se presenta se han utilizado sales sulfónicas de ftalocianinas. Estos compuestos son derivados de ftalocianina que se producen mediante la introducción de uno o más grupos sulfónicos, que facilitan la solubilidad en agua.

### 1.3.7 Técnicas de modificación de sensores. Técnica Layer by Layer

En la tecnología de modificación de las superficies de electrodos, la nanotecnología juega un papel muy importante. Por una parte, proporciona nuevos materiales con mejores propiedades electrocatalíticas (nanopartículas, nanotubos de carbono, etc.) [43, 99, 100] y, por otro lado, los materiales sensibles se pueden depositar en forma de películas nanoestructuradas utilizando técnicas como Self assembling monolayer (SAM), Layer by Layer (LbL), Langmuir-Blodgett (LB) o electrodeposición, entre otras [101-104], entre otras. Estas películas nanoestructuradas aumentan la relación superficie/volumen e incrementan la sensibilidad de los sensores.

Las técnicas de deposición de materiales sensibles tienen especial interés en el campo de los biosensores porque con ellas se puede conseguir inmovilizar las enzimas en películas con estructuras similares a las membranas biológicas. Este entorno biomimético ayuda a preservar la funcionalidad de las enzimas [38, 103].

En el presente trabajo de investigación se ha utilizado la técnica de Layer by Layer para depositar películas de ftalocianinas (sales sulfónicas de ftalocianinas) sobre la superficie de los sensores. Esta técnica consiste en la inmersión de forma alternada de un sustrato en suspensiones de carga opuesta dando lugar a una bicapa y, con posteriores inmersiones se pueden obtener multicapas (Figura 9). Las películas nanoestructuradas LbL poseen una alta relación superficie/volumen, la cual hace que aumente el número de sitios activos y con ello aumenta la sensibilidad de los sensores. Algunas particularidades de esta técnica se enumeran a continuación:

- Las multicapas pueden prepararse depositando alternativamente compuestos o polielectrolitos bipolares catiónicos y aniónicos.
- Las capas se mantienen unidas gracias a las fuerzas electrostáticas.
- Es fácil, rápido y se puede controlar con exactitud la estructura, composición de la capa y grosor de la película.

- La estabilidad de las películas depende de varios factores (disolvente, fuerza iónica, pH, concentración, temperatura de la disolución, etc.)
- Las películas pueden eliminarse cuando se sumergen en disolventes con sales.

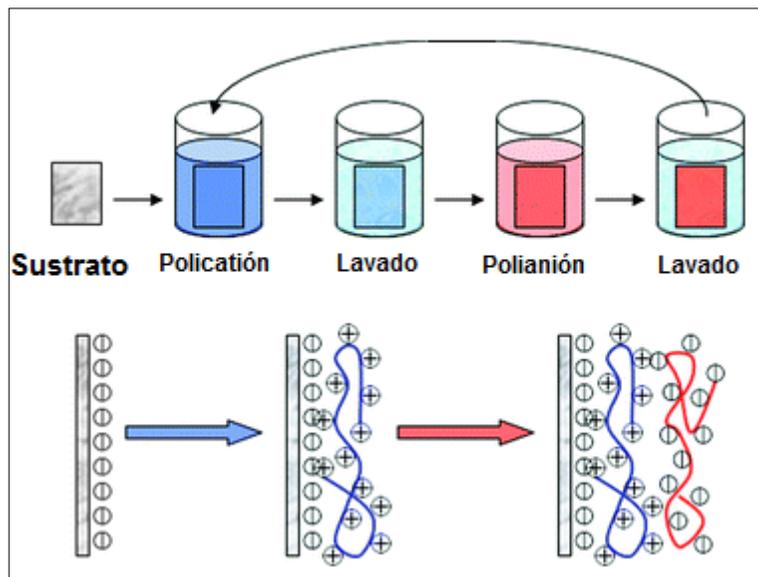


Figura 9. Esquema de la técnica Layer by Layer.

Además, el crecimiento de las películas se puede monitorizar con espectroscopía UV-Visible [105]. Se supone que la calidad de las películas es óptima si al aumentar el número de capas aumenta la absorbancia según la Ley de Lambert-Beer (Ec. 2). Según esta ley, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración (a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas), también depende de la distancia que recorre la luz a través de la muestra (paso óptico) y, por último, depende del coeficiente de extinción molar del material, que es una constante de proporcionalidad y es específica de cada cromóforo. Existe una relación lineal directa entre la absorbancia y el número de capas depositadas mediante la técnica de Layer by Layer (si el sustrato no es transparente, las medidas de absorbancia sobre el sustrato se han de hacer con medidas de reflexión).

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

(Ec. 2)

Donde,  $I_0$  es la intensidad de la radiación que llega al detector después de atravesar el blanco,  $I$  es la intensidad de la radiación que llega al detector después de pasar por la muestra,  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar,  $C$  es la concentración de la disolución y  $l$  es el paso óptico.

### 1.3.8 Tratamiento multivariante de datos

Partiendo de una red de sensores en la que posiblemente todos los sensores responden a diversos analitos, se genera una enorme y compleja cantidad de datos que debe ser procesada utilizando análisis multivariante. La quimiometría se encarga de la extracción de la información a partir de un procesamiento adecuado. Durante el tratamiento de datos se pueden distinguir cuatro etapas: pre-procesamiento de las señales, reducción de la dimensionalidad, predicción y validación. El pre-procesamiento de datos lleva a cabo un tratamiento previo para obtener una información de los datos suprimiendo información redundante, no significativa y así retener los datos clave. Algunos ejemplos de los procedimientos utilizados para reducir la dimensionalidad (reducir el número de datos) y extraer la información útil son los polinomios de Legendre, la transformada de Fourier, o los Kernels.

Dependiendo del tipo de aplicación, están disponibles diferentes métodos para el procesamiento de datos. Si el objetivo es el análisis cualitativo, PCA es el primer paso para visualizar si las muestras se pueden separar en clases (discriminación, clasificación). Otra herramienta para discriminar las muestras, aunque menos utilizada en el análisis de datos de lenguas electrónicas, es PARAFAC (parallel factor analysis). Después, se puede aplicar un reconocimiento de patrones o medios para predecir la pertenencia a cualquiera de las clases. Para ello, se pueden utilizar herramientas como SIMCA (soft independent modeling of class analogy), LDA (Linear discriminant analysis), SVM (support vector machines) o ANN. Cuando el propósito es cuantitativo, hay varias herramientas que dan información numérica como resultado final. Algunos de ellos son PCR (principal component regression), que parte

de una primera transformación de la PCA para construir una regresión multivariante, PLS (partial least squares regression) o ANN.

Cuando se necesita desarrollar una aplicación cualitativa con una lengua electrónica, el procesamiento de los datos multivariantes generados por sensores no específicos se realiza normalmente utilizando PCA. El objetivo de esta herramienta es reducir la cantidad de variables a nuevas variables latentes (componentes principales) en un espacio de variables reducido para facilitar la identificación o clasificación. Además, este nuevo espacio simplifica la interpretación de la variabilidad contenida en la información disponible. En este caso, la dificultad es encontrar una explicación a esas componentes principales de acuerdo a la composición de las muestras. PCA es un método lineal no supervisado de reconocimiento de patrones muy potente que reduce la dimensionalidad de los datos multivariantes y ayuda a visualizar las diferentes categorías de los perfiles multivariantes con altas similitudes y diferencias entre los conglomerados de las muestras. En esencia, PCA lleva a cabo un cambio de direcciones de los ejes en el espacio de datos para obtener como el primer eje aquel con una varianza máxima.

### **1.3.9 Lenguas electrónicas en el análisis de uvas, mostos y vinos**

Se ha demostrado que la ingesta de antioxidantes (por ejemplo, polifenoles) puede reducir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y mejorar muchos otros aspectos de la salud en las personas. Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los principales grupos que contribuyen a la ingesta total de polifenoles y, en este sentido, las uvas son una de las mayores fuentes de antioxidantes [106, 107]. Además de los beneficios para la salud, los antioxidantes presentes en los alimentos tienen una influencia notable en sus características organolépticas, en su calidad y en su conservación.

Por esta razón, en los últimos años se han desarrollado muchos estudios para determinar los antioxidantes contenidos en alimentos y bebidas que incluyen métodos cromatográficos, electroforéticos, ópticos y electroquímicos [38, 39, 44, 73, 108, 109].

Las lenguas electrónicas se presentan como una herramienta muy útil para analizar mezclas de líquidos complejos de alimentos y bebidas que pueden sustituir a los paneles de cata tradicionales que, a menudo son costosos, subjetivos, requieren de personal cualificado y de tiempo. En el campo de las uvas, mostos y vinos, se han realizado numerosos trabajos de investigación que incluyen el análisis electroquímico de este alimento con lenguas electrónicas.

La composición química de los vinos tiene una influencia directa en sus propiedades organolépticas. Cada vino tiene una composición química diferente que depende de la variedad y estado de maduración de las uvas, de la extracción de los diferentes componentes en el mosto y de las reacciones que ocurren durante el proceso de vinificación, el tratamiento de post-fermentación y del envejecimiento del vino. La maduración y calidad de las uvas se establece de acuerdo a su contenido en azúcares, mientras el contenido en fenoles influye en la madurez.

El grupo de sensores de la Universidad de Valladolid, UvaSens, dirigido por la Prof. María Luz Rodríguez-Méndez ha llevado a cabo muchos estudios en uvas, mostos y vinos en las diferentes etapas de elaboración del vino. Así, se han aplicado lenguas electrónicas para discriminar uvas de acuerdo con su variedad y vendimia [41]. Durante la maceración, el contacto entre el mosto y las pieles aumenta la concentración de fenoles. Aplicando diferentes técnicas de prensado se puede aumentar la extracción de fenoles. Se ha estudiado el incremento en la concentración de fenoles después de utilizar las técnicas de prensado de Flash Release y microoxigenación [45].

Tras la fermentación de los mostos de uva se obtiene el producto final, el vino. Éste es después envejecido en barricas de roble durante 1-2 años antes de ser embotellado. Esta etapa influye mucho en las características organolépticas que adquiere el vino influenciadas por la retención y liberación de los compuestos volátiles de los posos durante el envejecimiento. También influyen el oxígeno que difunde a través de los pequeños poros de las barricas, el origen de la madera de roble y su grado de tostado en el sabor final del vino. Posteriormente, se continúa con el proceso de envejecimiento del vino en botellas y en un ambiente reductor que mejora aún más las propiedades organolépticas.

Se ha aplicado una lengua electrónica para discriminar vinos tintos según su tiempo de envejecimiento y el origen de las barricas [46].

Debido a que la etapa de envejecimiento en barricas requiere de mucho tiempo y de costes elevados, se aplican técnicas innovadoras que aceleran el envejecimiento de los vinos. Una de estas técnicas consiste en añadir piezas de madera de diferentes tamaños en tanques de acero inoxidable con microoxigenación incorporada. Se ha aplicado una lengua electrónica para discriminar entre vinos envejecidos por las técnicas tradicionales y vinos envejecidos con prácticas alternativas [36, 47].

Tras el envejecimiento, los vinos son embotellados. Tradicionalmente, las botellas se sellan con tapones elaborados con corcho natural, ideales para sellar el líquido al tiempo que permiten la oxigenación desde el exterior a través de pequeños poros. Los tapones tradicionales de corcho natural se asocian a vinos de alta calidad. Actualmente, la industria vinícola utiliza tapones sintéticos con una porosidad determinada elaborados con polímeros. Se ha estudiado el efecto de la transferencia de oxígeno en tapones sintéticos utilizando una lengua electrónica [45].

Se han evaluado las propiedades organolépticas de los vinos producidas por las distintas variedades de uva, vendimias, Denominaciones de Origen, etc. Las uvas de partida de elaboración del vino son las que determinarán tanto el sabor como las características organolépticas finales del producto. Hay muchas variedades de uva y cada bodega utiliza diferentes técnicas enológicas para elaborar diferentes estilos de vino con diferentes sabores y características.

Se ha utilizado una lengua electrónica para discriminar vinos de diferentes Regiones de España (Rioja, Rueda, Riebra de Duero) y su envejecimiento [34, 48]. Además, esta lengua electrónica se utilizó también para determinar diferencias entre vendimias de diferentes años [20].

También se ha podido discriminar con una lengua bioelectrónica entre diferentes variedades de uva utilizando mostos preparados a partir de las uvas [38].

Las condiciones meteorológicas o un almacenamiento inapropiado, entre otras variables, pueden estropear el vino. En este sentido, existen muchos puntos donde es muy útil el uso de lenguas electrónicas para evaluar posibles adulteraciones o fraudes. Algunas prácticas de adulteración consisten en dilución con agua, adición de alcohol u otras sustancias, mezcla con vino de menor calidad o elaborado con uvas de una región diferente o el uso de técnicas de envejecimiento prohibidas.

Se ha aplicado una lengua electrónica para detectar adulteraciones en vinos tintos (adición de etanol, ácido tartárico, ácido tánico, SO<sub>2</sub>, ácido acético y sacarosa) [49].

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1 Reactivos y muestras de uva

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado reactivo analítico, sin purificación adicional y adquiridos en Sigma-Aldrich. Las soluciones se obtuvieron disolviendo las sustancias en agua desionizada (resistividad de  $18,2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ) obtenida a partir de un sistema de Mili-Q (Millipore).

Seis muestras de uvas tintas se incluyen en el estudio (Juan García, Tempranillo, Prieto Picudo, Mencía Regadío, Cabernet, Garnacha). Todas las variedades se cosecharon en septiembre de 2013 por la *Bodega Cooperativa de Cigales* y el *Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL)*, ambos ubicados en la zona de Valladolid. Para obtener los mostos, 200 bayas se introdujeron en una bolsa de plástico y se aplastaron durante un minuto. La *Estación Enológica de Castilla y León* llevó a cabo los análisis químicos según los reglamentos internacionales [110]. Los indicadores químicos analizados incluyeron el la densidad, el contenido en azúcar, el contenido polifenólico (índice total de polifenoles, TPI), el grado Brix y los grados 16,8 y 17,5 (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de los análisis químicos llevados a cabo con métodos de análisis químico tradicionales.

Variedad uva	Densidad (g/mL)	Azúcar (g/L)	IPT	Grado Brix	Grado (16,8)	Grado (17,5)
Prieto Picudo	1,0943	224,1	19	22,89	13,31	12,80
Garnacha	1,0800	187,4	15	19,68	11,13	10,70
Cabernet-Sauvignon	1,1035	246,4	28	24,75	14,64	14,10
Tempranillo	1,0884	209,1	28	21,53	12,42	11,95
Juan García	1,0911	216,0	29	22,18	12,83	12,35
Mencía Regadío	1,0862	203,3	23	21,05	12,08	11,60

## 2.2 Medidas electroquímicas

Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo con una microbalanza de cristal de cuarzo (Modelo QCM200 + QCM25 Crystal Oscillator, adquirido en Stanford Research Systems) conectada a un potenciostato/galvanostato (Modelo EG&G PARSTAT 2273). Los cristales de cuarzo que se utilizaron tienen 1 pulgada de diámetro, 5 MHz de frecuencia de oscilación y un corte AT planoconvexo. Además, están cubiertos con un electrodo de platino.

La técnica electroquímica que se llevó a cabo fue la voltametría cíclica. Para ello, se utilizó una celda convencional de tres electrodos (Fig. 10). Los sensores EQCM se utilizaron como electrodo de trabajo, el electrodo de referencia fue  $\text{Ag}|\text{AgCl}/\text{KCl } 3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  y como contraelectrodo se utilizó una lámina de platino. Los voltamogramas cíclicos se registraron a una velocidad de barrido de  $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Se registraron las variaciones en la frecuencia de oscilación de forma simultánea a los procesos redox de la voltametría cíclica.

En primer lugar, se llevó a cabo la voltametría cíclica junto con el registro de la QCM en disolución acuosa de KCl para estudiar el comportamiento electroquímico de los sensores en disolución libre de especies con actividad redox. Después, se analizó catecol con la lengua electrónica, un antioxidante con actividad redox y de interés en la industria del vino ya que se encuentra presente en los mostos y vinos. Y, por último, se analizaron los distintos mostos.

Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente ( $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

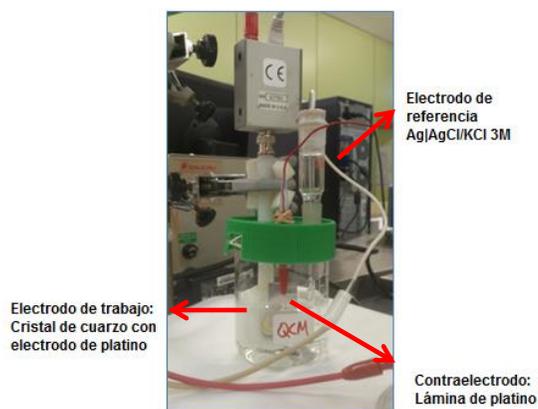


Figura 10. Celda electroquímica utilizada durante la voltametría cíclica.

### 2.3 Determinación del factor de sensibilidad del cristal de cuarzo

La interpretación cuantitativa de los datos obtenidos en la EQCM está basada en la combinación de la Ecuación de Sauerbrey (Ec. 1) y la Ley de Faraday (Ec. 3). La primera relaciona los cambios de frecuencia con los cambios de masa, mientras que la segunda relaciona la carga que pasa durante un experimento electroquímico con el número de moles del material electrolizado.

$$Q = -n \cdot F \cdot M \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde  $Q$  es la carga que pasa durante un experimento electroquímico,  $M$  es el número de moles del material electrolizado,  $n$  es el número de electrones involucrados en el proceso electroquímico y  $F$  es la constante de Faraday ( $9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

Por lo tanto, en condiciones ideales, la carga será directamente proporcional al cambio de frecuencia observado, que a su vez estará relacionado con la masa molar aparente de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Q = -n \cdot F \cdot M \cdot \frac{M_W}{M_W} = \frac{n \cdot F}{M_W} \cdot \Delta m \rightarrow \Delta m = -\frac{Q \cdot M_W}{n \cdot F}$$

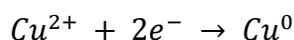
$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m = \frac{10^6 \cdot M_W \cdot C_f \cdot Q}{n \cdot F \cdot A} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde  $\Delta f$  es la variación de frecuencia observada (Hz),  $M_W$  es la masa molar aparente de la especie depositada ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $Q$  es la carga integrada durante la reducción (C),  $F$  es la constante de Faraday ( $9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $n$  es el número de electrones transferidos durante la electrodeposición,  $A$  es el área activa para la deposición sobre el electrodo de trabajo (contacto líquido) ( $\text{cm}^2$ ) y  $C_f$  es el factor de sensibilidad o constante de Sauerbrey para el cristal utilizado ( $\text{Hz} \cdot \text{cm}^2 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ).

De acuerdo con la ecuación (4), de la representación de  $\Delta f$  frente a  $Q$  se podrá determinar el factor de sensibilidad del cristal  $C_f$ . Para ello, se hace un calibrado previo de la EQCM con una reacción electroquímica conocida, por ejemplo la electrodeposición de plata o cobre.

Con este propósito, se llevó a cabo una calibración del cristal de cuarzo por deposición galvanostática de cobre en la superficie de platino.

El cristal de cuarzo se sumergió en una disolución  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  en  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{pH} = 1,37$ ) y se llevó a cabo una cronopotenciometría ( $-2 \text{ mA}$ ;  $70 \text{ s}$ ). El cobre se depositó sobre el electrodo de platino durante la electrodeposición. La reacción implicada en la electrodeposición es:



Dónde  $\text{Cu}^{2+}$  son los iones de cobre en disolución y  $\text{Cu}^0$  es cobre sólido.

La variación en la frecuencia de oscilación se representó frente a la carga mostrando una excelente linealidad ( $y = 7 \cdot 10^{-5}x - 0,0632$ ;  $R^2 = 0,9996$ ) (Fig. 11).

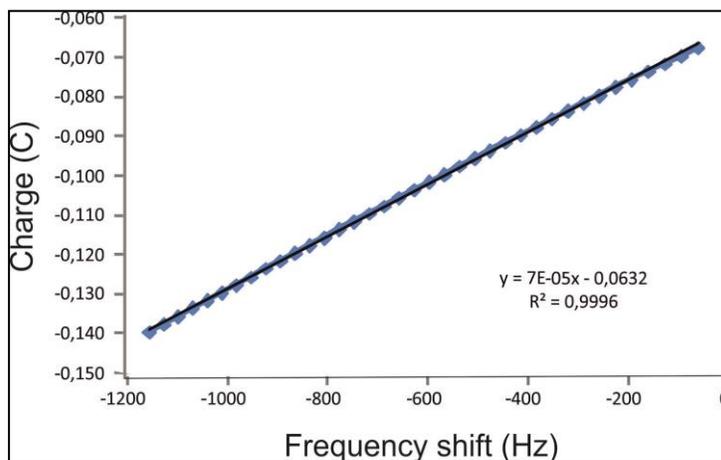


Figura 11. Representación gráfica obtenida durante la cronopotenciometría de cobre ( $-2 \text{ mA}$ ;  $70 \text{ s}$ ).

Según la representación lineal obtenida durante el proceso de calibración, la constante experimental de Sauerbrey fue de  $59,4 \text{ Hz}\cdot\text{cm}^2\cdot\mu\text{g}^{-1}$ , lo cual es consistente con el valor teórico de  $56,6 \text{ Hz}\cdot\text{cm}^2\cdot\mu\text{g}^{-1}$ .

$$C_f = \frac{Q}{\Delta f} = \frac{n \cdot F \cdot A}{10^6 \cdot M_w \cdot \text{pendiente}} = \frac{2 \cdot 9,648 \cdot 10^4 \frac{\text{C}}{\text{mol}} \cdot 1,37 \text{ cm}^2}{10^6 \cdot 63,546 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 7 \cdot 10^{-5} \frac{\text{C}}{\text{Hz}}} = 59,4 \frac{\text{Hz} \cdot \text{cm}^2}{\mu\text{g}}$$

## 2.4 Preparación de los sensores EQCM

Para llevar a cabo el crecimiento de películas LbL sobre los cristales de cuarzo se utilizó hidrocloreuro de polialilamina (PAH) y metalofalocianinas tetrasulfónicas de cobre, hierro y níquel: Sal sódica del ácido tetrasulfónico de ftalocianina de cobre (III), sal sódica del ácido tetrasulfónico de ftalocianina hierro (III) y sal sódica del ácido tetrasulfónico de ftalocianina de níquel (II) (Fig. 12).

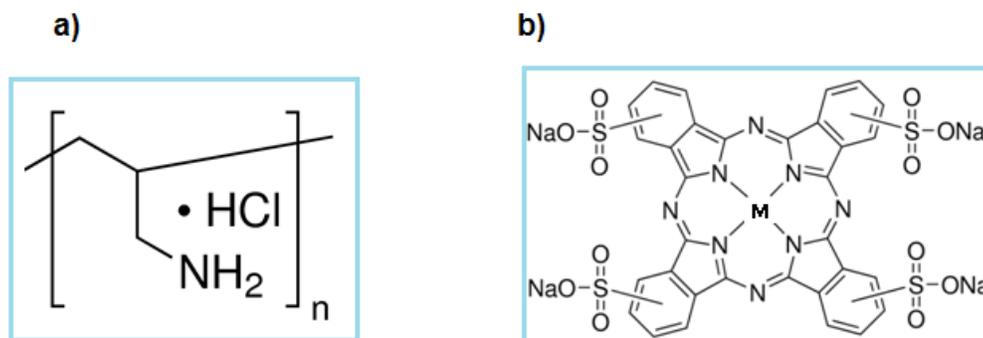


Figura 12. a) Hidrocloreuro de polialilamina y b) Metalofalocianina tetrasulfónica (M: metal).

Antes de llevar a cabo el crecimiento de las películas, el cristal de cuarzo recubierto de platino se limpió utilizando una mezcla 3:1 de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (solución Piraña; mezcla de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno al 30%) y se enjuagó a fondo con agua desionizada (resistividad de  $18,2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

Las películas LbL se depositaron sobre la superficie utilizando PAH como capa positiva y las sales sulfónicas de las ftalocianinas de cobre, hierro y níquel (en adelante  $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ ,  $\text{FePc}^{\text{SO}_3^-}$  y  $\text{NiPc}^{\text{SO}_3^-}$ ) como capa negativa. Se utilizaron disoluciones con las siguientes concentraciones:  $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-} = 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{FePc}^{\text{SO}_3^-} = 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NiPc}^{\text{SO}_3^-} = 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{PAH} = 0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las películas LbL de  $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$  /PAH (y, por tanto,  $\text{FePc}^{\text{SO}_3^-}$  /PAH y  $\text{NiPc}^{\text{SO}_3^-}$  /PAH) se fabricaron mediante inmersiones del sensor EQCM en las disoluciones. Los grupos catiónicos del PAH interactúan con los grupos aniónicos de la ftalocianina mediante fuerzas electrostáticas que mantienen unidas las películas. De acuerdo con lo anterior, se llevó a cabo la siguiente secuencia (Fig. 13): 1) Inmersión en disolución de PAH (5 min). 2) Inmersión en agua desionizada para eliminar el exceso no adsorbido de PAH (1 min). 3) Inmersión en disolución de  $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$  (5 min). 4) Inmersión en agua desionizada para eliminar el exceso no adsorbido de  $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$  (1 min). Después de los cuatro pasos anteriores se forma una bicapa. Esta secuencia se repitió 20 veces para obtener 20 bicapas. Este procedimiento también ha sido reportado en la literatura utilizando otros tipos de electrodos [105].

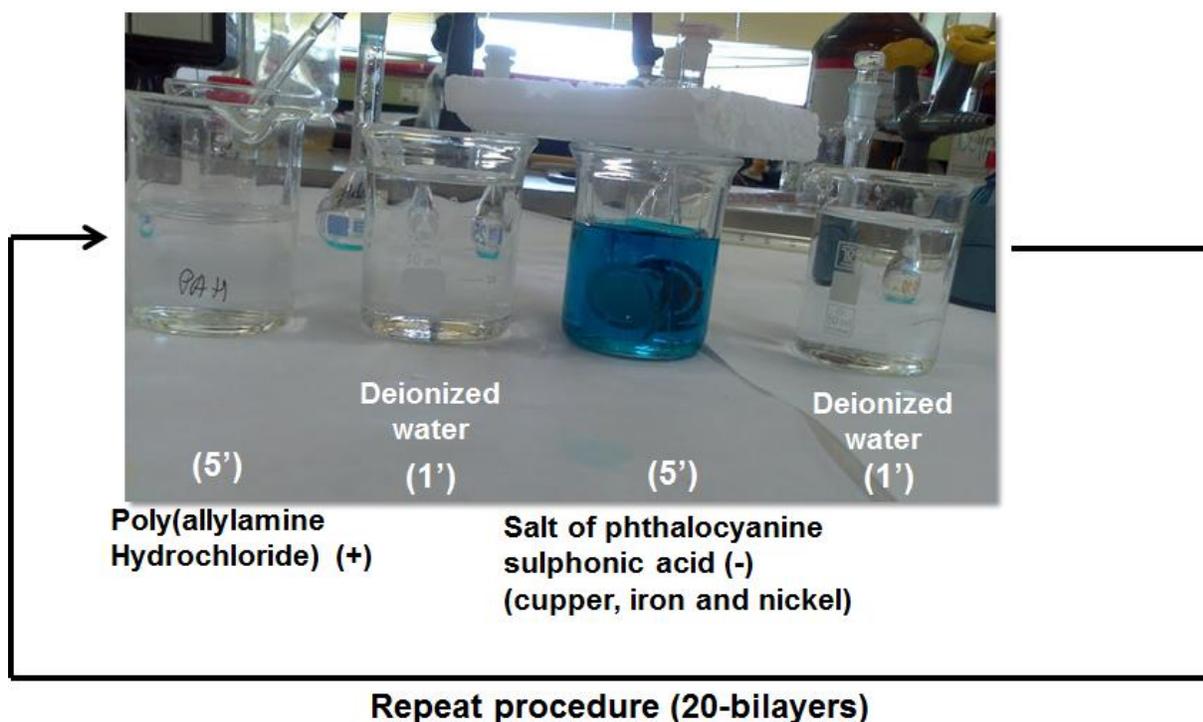


Figura 13. Secuencia Layer by Layer utilizada para depositar las películas de PAH y ftalocianina sulfónica.

En la Figura 14 se muestra el cristal de cuarzo con electrodo de platino después de depositar 20 bicapas de  $\text{FePc}^{\text{SO}_3^-}/\text{PAH}$ .



Figura 14. Cristal de cuarzo con electrodo de platino con 20 bicapas  $\text{FePcSO}_3^-/\text{PAH}$  depositadas mediante LbL.

## 2.5 Caracterización UV-visible de las películas LbL

Para testar la calidad de las películas comprobando que existe una relación lineal entre el número de bicapas depositadas y la absorbancia, se monitorizó el crecimiento de películas LbL con espectroscopía UV-vis de absorción (Modelo UV-2600, adquirido en Shimadzu) (Fig. 15). Las medidas se realizaron en reflexión.



Figura 15. Espectrofotómetro UV-vis en el que se llevaron a cabo las medidas de absorbancia.

## 2.6 Red de sensores. Lengua electrónica

Después del crecimiento de 20 bicapas LbL sobre la superficie de los cristales de cuarzo con electrodo de platino se obtuvieron los siguientes sensores: Pt/CuPc<sup>SO<sub>3</sub><sup>-</sup></sup>/EQCM, Pt/FePc<sup>SO<sub>3</sub><sup>-</sup></sup>/EQCM y Pt/NiPc<sup>SO<sub>3</sub><sup>-</sup></sup>/EQCM.

Además de los tres sensores anteriores, se utilizó un cristal de cuarzo con electrodo de platino sin películas LbL en los experimentos electroquímicos (Pt/EQCM). De este modo, se tiene una red de cuatro sensores que conformarán la lengua electrónica que se va a utilizar para analizar los mostos.

## 2.7 Análisis estadístico

Los datos registrados durante la voltametría cíclica, tanto los voltamogramas como los masogramas, suponen una gran cantidad de información (las señales registradas son curvas de pares de valores intensidad-potencial o masa-potencial, respectivamente). Por ello, es imprescindible aplicar técnicas de análisis de datos multivariantes para explorar y evaluar la información obtenida.

Se han llevado a cabo dos operaciones: una primera, que consistió en el pre-tratamiento de las señales voltamétricas y másicas y, posteriormente, la implementación de técnicas de análisis de datos multivariantes.

A través de un método matemático de carácter integral, capaz de reducir el número de datos contenidos en los voltamogramas y los masogramas, se redujo el número de variables contenidas en éstos a unas pocas. Este método fue implementado por el Prof. Ricardo Gutiérrez-Osuna, de la Universidad de Texas [111] y se basa en la integración de la curva mediante la aplicación de una función matemática denominada “kernel”, que se encarga de recorrer toda la curva voltamétrica (o másica) operando y extrayendo unos pocos valores representativos de ella (Fig. 16). En otras palabras, captura la característica dinámica de la respuesta global. Utilizando este método, se obtuvieron 10 variables a partir de cada voltmograma y masograma para el análisis estadístico.

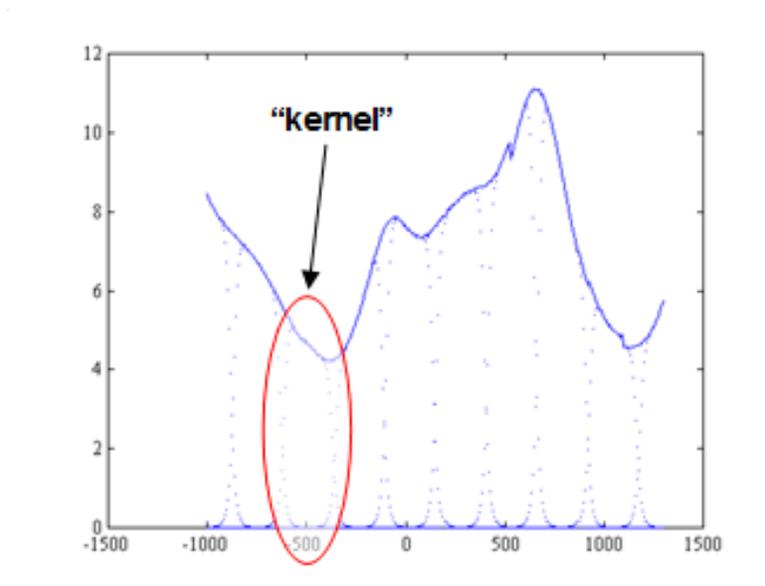


Figure 16. Aplicación de la función “kernel” sobre una señal voltamétrica.

Otro factor a tener en cuenta, es el tipo de información que aportan los voltamogramas y masogramas registrados, es decir, los valores de intensidad de corriente, de masa por unidad de superficie y los valores de voltaje. Básicamente, la intensidad de corriente está ligada a las características cinéticas de los procesos redox ocurridos, además de poseer una relación directa con la concentración de la especie electroactiva responsable del pico. Los valores de la masa por unidad de superficie aporta información sobre diferentes procesos que ocurren sobre la superficie del cristal como son formación de películas poliméricas debido a la polimerización de las especies electroactivas, procesos de adsorción/desorción de especies presentes en la disolución o procesos de difusión de iones a través del material del electrodo para mantener la electroneutralidad en el material del electrodo. Por otra parte, los valores de potencial registrados son magnitudes termodinámicas de tales especies, específicas y exclusivas, siempre en unas condiciones experimentales determinadas.

El siguiente paso es una normalización de los valores obtenidos mediante la aplicación auto-escalado. Se trata de un centrado de datos (sustracción a cada valor de la media de la totalidad de los valores de intensidad de las señales) seguido de una división por la desviación estándar, de forma que todos los valores posean media 0 y varianza 1. Así, todos los valores tienen la misma escala, obviando la diferencia de rangos experimentales.

Una vez pre-procesados los datos voltamétricos y másicos se llevan a cabo los análisis de datos multivariantes. En este sentido, el PCA marca el punto de partida del desarrollo del análisis. Como técnica no supervisada que es, servirá para analizar y explorar la estructura de los datos, encontrar relaciones o clases entre ellos, estudiar la influencia de cada sensor en la distribución de clases, e incluso depurar la matriz de datos por detección y eliminación de espurios (valores con excesiva varianza residual o influencia anómala dentro del conjunto), ya sean variables u objetos.

Por otra parte, PLS se utilizará para establecer correlaciones entre los resultados numéricos proporcionados por la lengua electrónica tras analizar muestras de mostos (matriz de datos X, predictores), y los parámetros químicos proporcionados por la *Estación Enológica de Castilla y León* (datos Y, a predecir).

Con el análisis PCA se obtendrá la siguiente información de interés:

- Gráfico de puntuaciones o “scores”: localización de los objetos o muestras en el espacio regido por las componentes principales.
- Gráfico de cargas o “loadings” y elipses de correlación: distribución y contribución de las variables o sensores en el PCA.
- Varianza explicada por las componentes principales.

Mientras que, del análisis PLS se obtendrán los siguientes parámetros estadísticos:

- RMSEC: Raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración.
- RMESP: Raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción.
- $R^2_c$ : Coeficiente de correlación al cuadrado de calibración.
- $R^2_p$ : Coeficiente de correlación al cuadrado de predicción.
- LV: número de variables latentes.

## 3. RESULTADOS

---

### 3.1 Caracterización UV-Visible de las películas LbL

Las películas se obtuvieron con la secuencia de cuatro pasos descrita en el apartado anterior, que se llevó a cabo 20 veces para obtener 20 bicapas. El crecimiento de las bicapas se monitorizó cada 4 bicapas con espectroscopia UV-vis indicando un aumento en la absorbancia con el aumento del número de bicapas. Los máximos de absorbancia en la región UV-vis (380 - 780 nm) fueron 640 nm para las películas de  $\text{FePc}^{\text{SO}_3^-}/\text{PAH}$ , 620 nm para las películas de  $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{PAH}$  y 620 nm para las películas de  $\text{NiPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{PAH}$ .

La Figura 17 muestra los espectros de absorción UV-vis y la absorbancia frente al número de capas durante el crecimiento de las películas. Con 20 bicapas depositadas se observó una relación lineal entre el número de bicapas y la absorbancia con altos coeficientes de regresión lineal ( $R^2$ ), pero a partir de 20 bicapas se perdía la linealidad y, por tanto, la calidad de las películas depositadas.

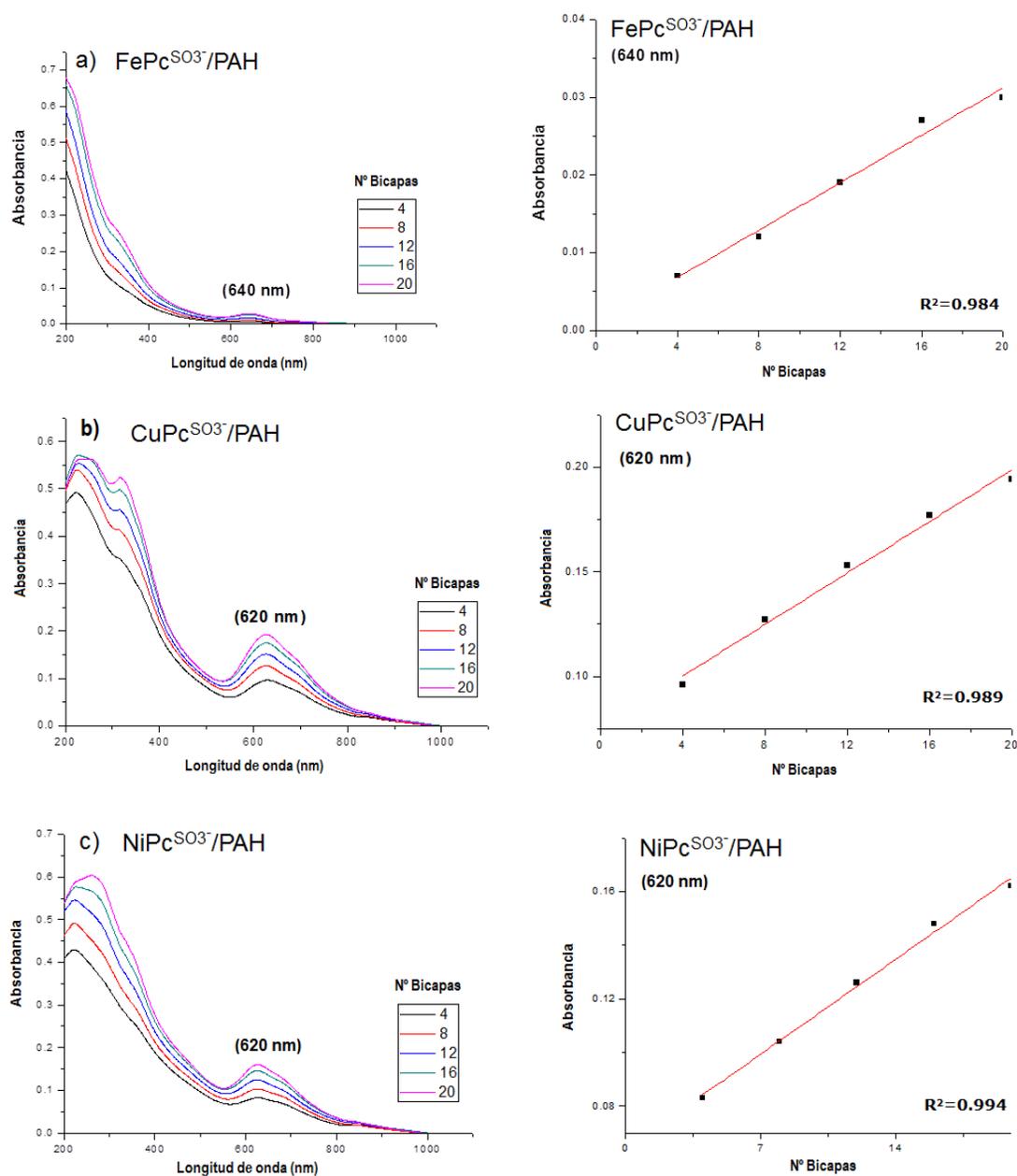


Figura 17. Espectros de absorción (1000 – 200 nm) de las bicapas depositadas sobre los cristales de cuarzo y representación lineal del número de bicapas frente a la absorbancia. a) FePc<sup>SO3-</sup>/PAH, b) CuPc<sup>SO3-</sup>/PAH, c) NiPc<sup>SO3-</sup>/PAH.

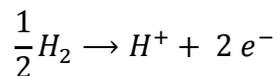
El valor de absorbancia obtenido con películas de CuPc<sup>SO3-</sup>/PAH fue mayor, seguido por las películas de NiPc<sup>SO3-</sup>/PAH y, finalmente por las películas de FePc<sup>SO3-</sup>/PAH, que muestra un valor inferior. Teniendo en cuenta que los coeficientes de extinción molar de las disoluciones de CuPc<sup>SO3-</sup>, FePc<sup>SO3-</sup> y NiPc<sup>SO3-</sup> son del mismo orden, los valores de absorbancia obtenidos después de 20 bicapas dan idea de que las películas de CuPc<sup>SO3-</sup>/PAH están más

densamente empaquetadas y, por tanto, contienen mayor cantidad de cromóforo, seguidas por las películas de NiPc<sup>SO3-</sup>/PAH y, finalmente, las películas FePc<sup>SO3-</sup>/PAH.

Después de cada análisis electroquímico, los sensores EQCM se limpiaron por inmersión en HNO<sub>3</sub> 60% (con sonicación durante 1 min) para eliminar las películas LbL y luego se enjuagaron en agua desionizada y se secaron con gas nitrógeno. Los sensores se prepararon de nuevo con 20 bicapas para cada medición electroquímica siguiendo la secuencia descrita anteriormente. Los coeficientes de variación fueron menores del 5% (calculado a partir de la absorbancia máxima después de 20 bicapas).

### 3.2 Análisis en disolución acuosa

Antes de analizar los mostos, la lengua electrónica se caracterizó en disolución acuosa. Una vez preparados, los sensores se sumergieron en una disolución acuosa de KCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup> y se llevaron a cabo estudios de voltametría cíclica. Se registraron 10 ciclos en un rango de potencial de -1,0 a 1,0 V. Las respuestas voltamétrica y másica de la lengua electrónica en KCl se ilustran en la Figura 18 (ciclo 10). Es importante destacar que, en todos los casos, los primeros ciclos (1-4) son siempre diferentes de los ciclos posteriores, pero después del quinto ciclo se obtienen voltamogramas altamente reproducibles (con un CV inferior al 8% en todos los casos). Además, estas señales se utilizan como referencia para evaluar el tiempo de vida del electrodo. Se puede ver claramente un pico anódico a 0,0 V que corresponde a la oxidación de hidrógeno en la superficie del platino. Las moléculas de H<sub>2</sub> se adsorben sobre la superficie y se produce la siguiente reacción:



Este potencial se observa a 0,0 V para los sensores Pt/EQCM y Pt/FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM, mientras que, para los sensores Pt/CuPc<sup>SO3-</sup>/EQCM y Pt/NiPc<sup>SO3-</sup>/EQCM aparece desplazado hacia un potencial más alto (alrededor de 250 mV). Además, en el barrido de reducción, aunque mucho menos intenso, se observa la reducción de H<sup>+</sup> a H<sub>2</sub> a un potencial de alrededor

de 0,0 V para los sensores de Pt/EQCM y Pt/FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM, a 75 mV para el sensor Pt/CuPc<sup>SO3-</sup>/EQCM y a 200 mV en el caso de Pt/NiPc<sup>SO3-</sup>/EQCM.

El hidrógeno se forma durante la descomposición del agua, que ocurre a potenciales negativos. Como puede verse en los voltamogramas, en todos ellos se observan diferentes picos en el barrido catódico y anódico. Todos ellos corresponden a la descomposición del agua. Cabe destacar que, el pico de oxidación que aparece a potenciales negativos correspondiente a la descomposición del agua aparece a potenciales distintos dependiendo del electrodo debido a se ve afectado por los sensores modificados con ftalocianinas sulfónicas. Este pico aparece a potenciales más positivos con los sensores de fatalocianinas sulfónicas (-600 mV para Pt/FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM y -500 mV para Pt/CuPc<sup>SO3-</sup>/EQCM y Pt/NiPc<sup>SO3-</sup>/EQCM) que en el caso del platino (-780 mV). Especialmente en el caso del sensor Pt/CuPc<sup>SO3-</sup>/EQCM el pico es mucho menos intenso que el pico de la oxidación del hidrógeno.

Los masogramas registraron aumentos y disminuciones de la masa durante la voltametría cíclica. Se puede observar un aumento en la masa durante la oxidación de H<sub>2</sub> a partir de 0 V hasta 1000 mV, seguido por una disminución en la masa durante la reducción (de 1000 mV a 0 V). Esta disminución de masa durante el barrido de reducción es mucho menos pronunciado en el caso del Pt/EQCM que en el resto de los sensores. A potenciales negativos también ocurren distintos aumentos/disminuciones en la masa. Aunque es difícil atribuir estos cambios a una sola causa, está claro que se producen por las reacciones de descomposición del agua y a la difusión de iones del interior al exterior de las películas para mantener la electroneutralidad de las películas. No se observó un aumento neto en la masa al final del experimento.

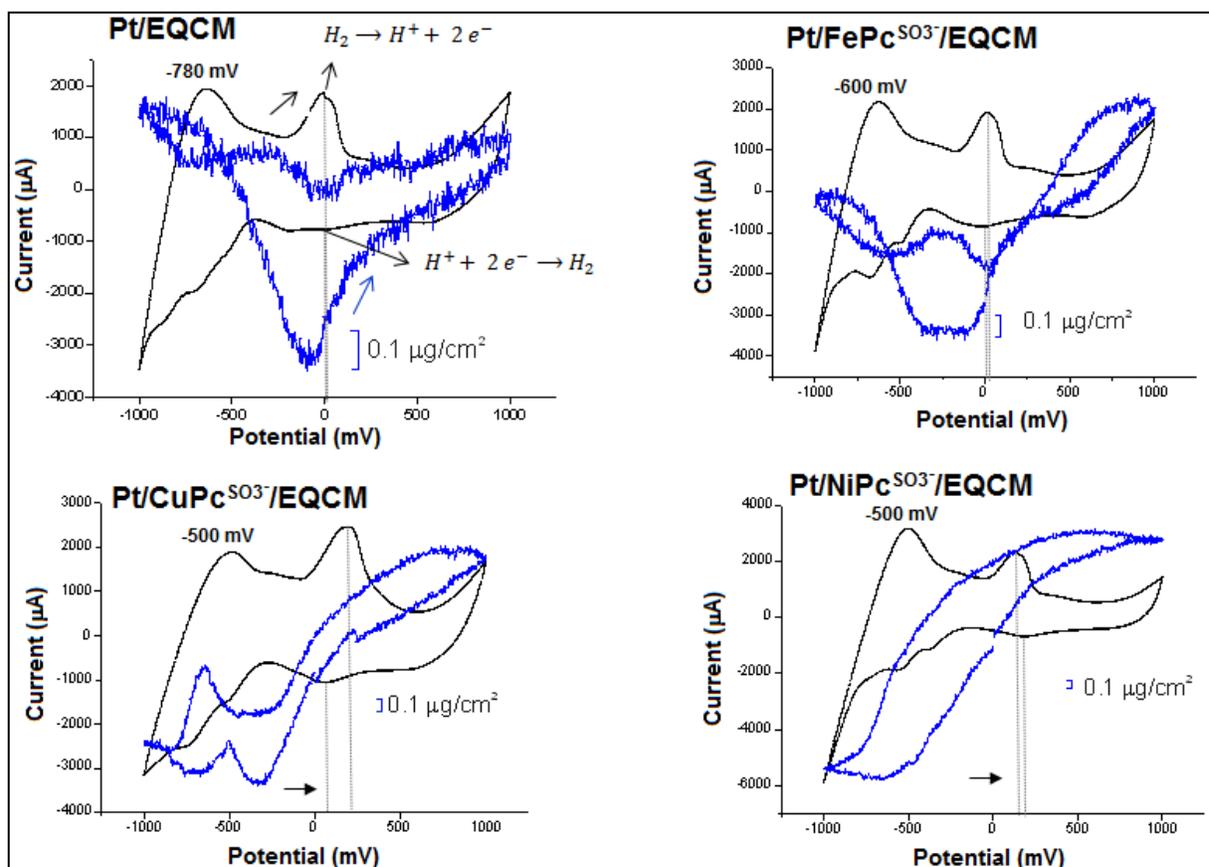


Figura 18. Respuesta voltamétrica y másica en KCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup>.

### 3.3 Análisis de mostos de uva

La lengua electrónica se utilizó para analizar mostos preparados a partir de diferentes variedades de uva (Juan García, Tempranillo, Prieto Picudo, Mencía Regadío, Cabernet, Garnacha) diluidos 1:2 en KCl 0,05 mol·L<sup>-1</sup> y se llevaron a cabo experimentos de voltametría cíclica. Anteriormente, se hicieron mediciones en el mosto sin diluir y las señales mostraron intensidades muy bajas y poco reproducibles. La voltametría cíclica se llevó a cabo en el rango de potencial de -0,6 V a 1,0 V (10 ciclos). Los voltamogramas y masogramas se registraron simultáneamente.

Los voltamogramas mostraron picos anódicos muy anchos en un amplio rango de potenciales. Sin embargo, no se observaron picos de reducción, lo que indica que el proceso de oxidación es irreversible. Estos picos de oxidación se relacionan con la oxidación de los

fenoles y de otros compuestos con actividad redox presentes en los mostos. Los voltamogramas obtenidos fueron muy estables y reproducibles, con coeficientes de variación que varían de 0,4 a 2,8%. En la Figura 19 se ilustra la respuesta voltamétrica de la lengua electrónica frente a de los mostos (ciclo 10).

Los sensores de  $\text{Pt}/\text{NiPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{EQCM}$  y  $\text{Pt}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{EQCM}$  mostraron picos de oxidación más amplios e intensos, mientras que los sensores de  $\text{Pt}/\text{EQCM}$  y  $\text{Pt}/\text{FePc}^{\text{SO}_3^-}/\text{EQCM}$  mostraron voltamogramas muy similares. Este resultado concuerda con el hecho de que la absorbancia medida en los cristales de cuarzo después de 20 bicapas de  $\text{FePc}^{\text{SO}_3^-}/\text{PAH}$  es mucho menor que en el caso de  $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{PAH}$  y  $\text{NiPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{PAH}$ , revelando que las películas se encuentran peor empaquetadas sobre los cristales de cuarzo con la ftalocianina sulfónica de hierro y, por eso, el platino está más presente. Por lo tanto, se puede decir que los sensores de  $\text{Pt}/\text{NiPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{EQCM}$  y  $\text{Pt}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{EQCM}$  presentan una actividad electrocatalítica, mientras que, ésta no se observa en el sensor de  $\text{Pt}/\text{FePc}^{\text{SO}_3^-}/\text{EQCM}$ .

En cualquier caso, se observa claramente que la respuesta de la lengua electrónica en cada mosto es diferente y única, presentando una selectividad cruzada.

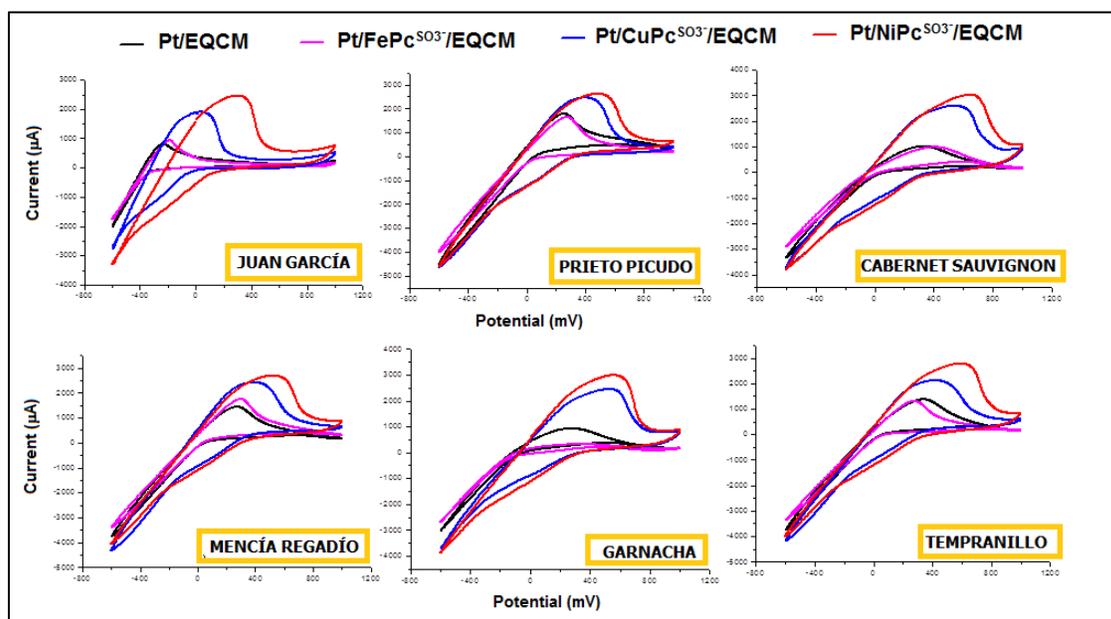


Figura 19. Respuesta voltamétrica de la lengua electrónica en los distintos mostos analizados (Juan García, Prieto Picudo, Cabernet Sauvignon, Mencía Regadío, Garnacha y Tempranillo).

Por otro lado, los masogramas mostraron un aumento de la masa que se relacionó con la polimerización de azúcares presentes en el mosto, dando lugar a la formación de films poliméricos adheridos sobre la superficie del cristal y, por tanto, a un aumento en la masa sobre la superficie del cristal. Además, existen otros procesos a tener en cuenta, como la difusión de iones a través de las películas LbL permeables, que siempre tienen lugar para mantener la electroneutralidad de las mismas. En una mezcla compleja como son los mostos, con una gran variedad de especies químicas, es muy difícil asignar el aumento de masa a una única causa. En la Figura 20 se muestran algunos ejemplos de voltamogramas y masogramas obtenidos en el análisis de los mostos. El mayor aumento de masa se produjo con el sensor de Pt/NiPc<sup>SO3-</sup>/EQCM, bien diferenciado del resto. Los sensores de Pt/FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM y Pt/CuPc<sup>SO3-</sup>/EQCM mostraron valores similares de aumento de masa (aunque ligeramente mayor con el electrodo Pt/CuPc<sup>SO3-</sup>/EQCM), mientras que sobre el electrodo de Pt/EQCM la masa depositada fue menor. Este comportamiento de la masa depositada se repitió en el resto de mostos analizados.

Al igual que en el caso de los voltamogramas, los masogramas fueron únicos y diferentes para cada sensor en cada mosto, lo que después va a permitir poder discriminar los mostos a partir de los datos másicos.

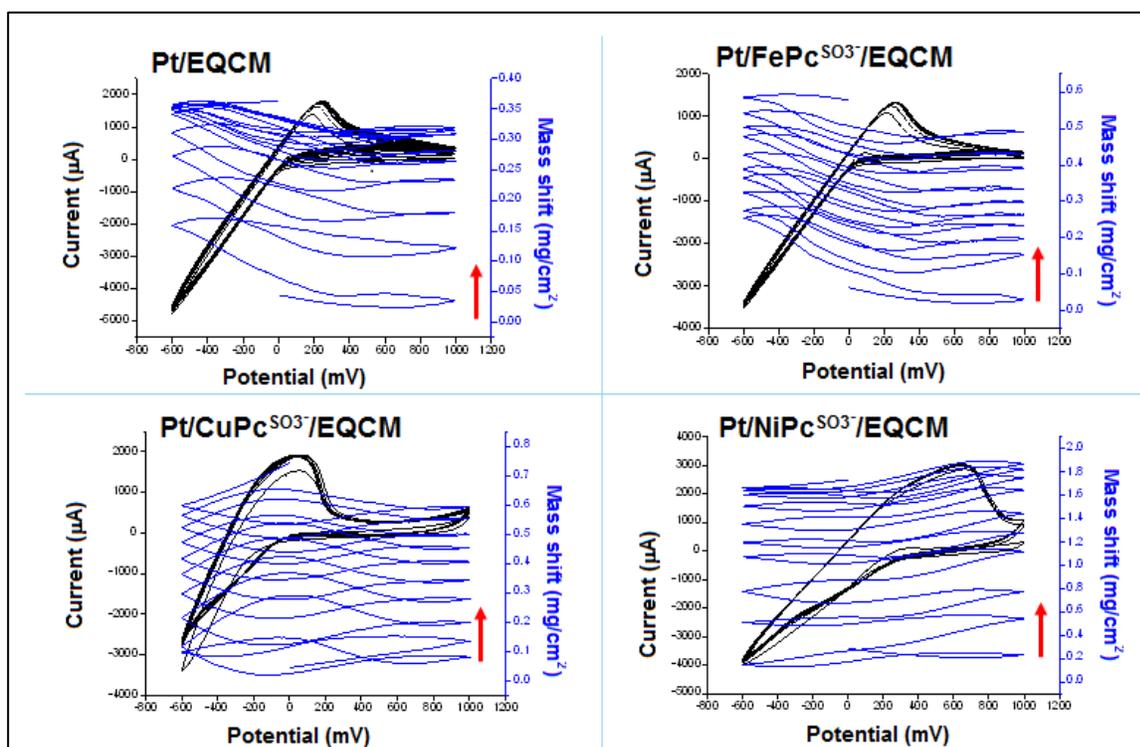


Figura 20. Ejemplo de respuestas voltamétricas y másicas en diferentes mostos. a) Prieto Picudo y sensor Pt/EQCM, b) Tempranillo y sensor Pt/FePcSO<sub>3</sub><sup>-</sup>/EQCM, c) Juan García y sensor Pt/CuPcSO<sub>3</sub><sup>-</sup>/EQCM, d) Cabernet y sensor Pt/NiPcSO<sub>3</sub><sup>-</sup>/EQCM.

### 3.4 Análisis estadístico

La lengua electrónica mostró una respuesta única para cada mosto (selectividad cruzada) que permitió la discriminación de las muestras con el análisis PCA. Es decir, cada sensor mostró una respuesta voltamétrica y másica diferente en cada mosto.

En la Figura 21.a) se muestra el gráfico de puntuaciones o “scores” derivado del PCA de la matriz de datos voltamétricos, en el cual se han seleccionado las tres primeras componentes principales (PC1, PC2 y PC3) para una mejor visualización. Se observa que las muestras se diferencian entre sí, con clusters bien definidos. Además, la discriminación obtenida es acorde con el índice de polifenoles totales (IPT) obtenido mediante análisis tradicional. Así, los mostos con valores de IPT por encima de 20 (Mencía Regadío, Cabernet Sauvignon, Tempranillo y Juan García) aparecen en la región positiva de la PC3. Mientras que, los mostos con valores de IPT por debajo de 20 (Prieto Picudo y Garnacha) están localizados en la región negativa de la PC3. La primera componente principal (PC1) representa el 74,60% de la

variación de la señal electroquímica, la segunda componente (PC2) aporta el 14,82% de la variación y por último la PC3 el 6,16%; de tal modo que entre la primera, segunda y tercera componente principal, es (PC1 + PC2 + PC3), se explica el 95,58% de la variación total entre las muestras.

El gráfico de Loading o de cargas (con sus eclipses de correlación) (Fig. 21.b) da una idea cualitativa de la contribución (o peso) de cada variable en la discriminación de las muestras o de la capacidad del sensor (X) de predecir cada clase (Y). Cada sensor aporta un total de diez valores que provienen de cada kernel.

Se observa que los sensores han proporcionado información complementaria, ya que cada uno se sitúa en un cuadrante diferente del espacio creado por las dos primeras PCs y se encuentran localizados en el círculo de correlaciones. El sensor de Pt/ FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM está más próximo al sensor de Pt/EQCM que los demás sensores. Este hecho indica que la información de ambos sensores se diferencia menos entre sí y tiene su razón de ser, ya que, como se ha visto en la caracterización UV-vis de los sensores, los sensores de Pt/ FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM parecen tener las películas depositadas menos empaquetadas puesto que la absorbancia que se obtiene con 20 bilayers es mucho más baja que para los sensores de Pt/ CuPc<sup>SO3-</sup>/EQCM y Pt/ NiPc<sup>SO3-</sup>/EQCM y, por tanto, el platino está más expuesto y su comportamiento será más parecido al sensor de Pt/EQCM.

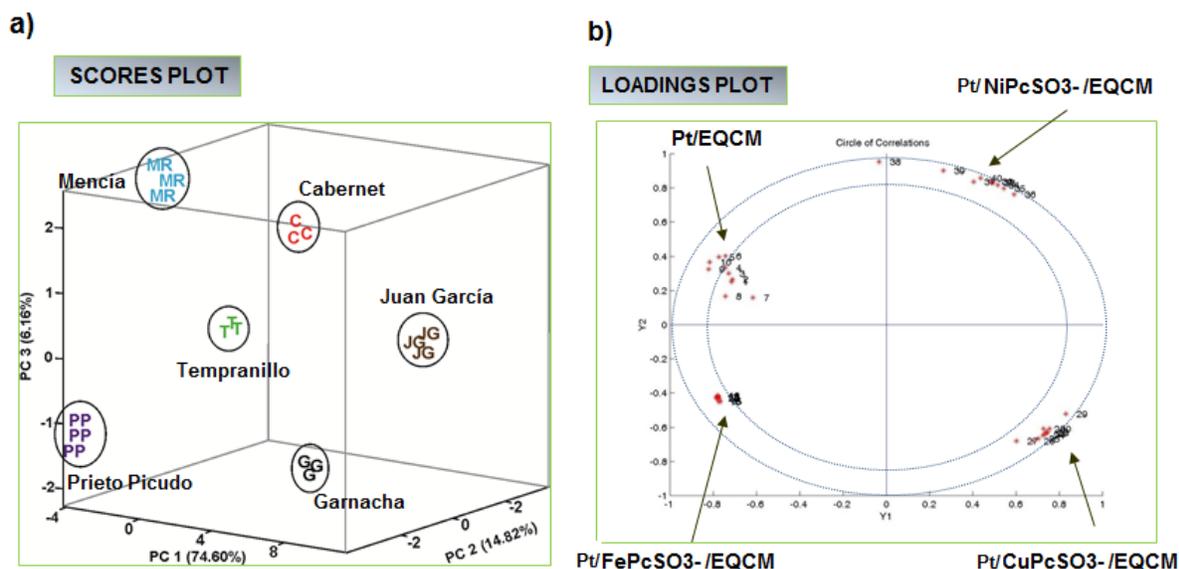


Figure 21. Gráficos de Score (a) y de Loading (b) obtenidos a partir del análisis PCA de los datos voltamétricos. En el gráfico de Loading la eclipse interior indica el 50% de la varianza explicada, mientras que la exterior, el 100%.

De la misma forma, el análisis PCA de la matriz de datos másicos también ha permitido discriminar las muestras entre sí (Fig. 22). En este caso, las muestras se pueden discriminar según su grado Brix, que está relacionado con los azúcares en los mostos. Los mostos con valores más altos de grado Brix (Cabernet Sauvignon y Prieto Picudo) aparecen en la parte negativa de la PC3, mientras que, los que tienen valores más bajos de grado Brix (Tempranillo, Mencia Regadío, Juan García y Garnacha) aparecen en la parte positiva de la PC3. La primera componente principal (PC1) representa el 55,67% de la variación de la señal electroquímica, la segunda componente (PC2) aporta el 26,09% de la variación y por último la PC3 el 17,05%; de tal modo que entre la primera, segunda y tercera componente principal, es (PC1 + PC2 + PC3), se explica el 98,81% de la variación total entre las muestras.

En este caso el gráfico de Loading (Fig. 22.b) es muy similar al que se ha obtenido con los datos voltamétricos. Los sensores de Pt/EQCM y Pt/ FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM se localizan próximos entre sí, lo que confirma, de nuevo, que tienen un comportamiento más similar entre sí y que se puede atribuir a que en los sensores de Pt/ FePc<sup>SO3-</sup>/EQCM las películas de FePc<sup>SO3-</sup>/PAH están menos empaquetadas. Aun así, se ve claramente que los sensores

proporcionan información complementaria y que se localizan formando un círculo de correlación.

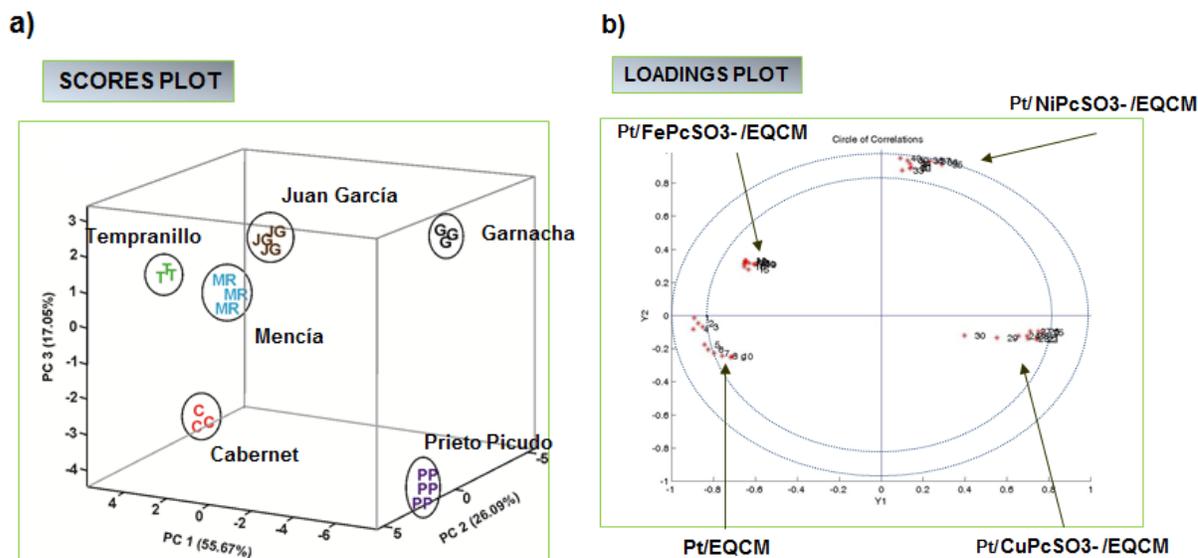


Figure 22. Gráficos de Score (a) y de Loading (b) obtenidos a partir del análisis PCA de los datos másicos. En el gráfico de Loading la eclipse interior indica el 50% de la varianza explicada, mientras que la exterior, el 100%.

El modelo de regresión PLS se ha desarrollado en modo PLS-1. Para seleccionar el número de factores se ha utilizado una validación cruzada, dejando fuera una muestra en la calibración (“one leave out”). Su aplicación está bastante generalizada en narices y lenguas electrónicas. El conjunto de muestras de validación estará formado por las mismas utilizadas en la generación de los modelos de clasificación o predicción, de manera que se crearán tantos sub-modelos como muestras hay disponibles. Se denomina validación cruzada porque se generan los sub-modelos con la totalidad de las muestras a excepción de una, que sirve de muestra externa de validación.

En la Tabla 4 se recogen los parámetros estadísticos obtenidos con el modelo de regresión PLS-1 a partir de los datos voltamétricos (variable X) y los parámetros químicos (variable Y). La raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración (RMESC) y la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción (RMESP) son estimaciones del error absoluto de calibración y predicción, respectivamente. También se representan los coeficientes de correlación de calibración ( $R^2_C$ ) y predicción ( $R^2_P$ ) y el número de variables latentes.

Del mismo modo, en la Tabla 5 se presentan los parámetros estadísticos obtenidos con el modelo de regresión PLS-1 a partir de los datos másicos (variable X) y los parámetros químicos (variable Y).

Los resultados evidencian que los datos voltamétricos obtenidos con la lengua electrónica se correlacionan mejor con el IPT que con el resto de parámetros químicos, obteniendo coeficientes de correlación más altos en el modelo PLS-1 con 3 variables. Mientras que, las correlaciones con el resto de parámetros presentan coeficientes de correlación más bajos y modelos de PLS-1 con 4 variables. Este resultado era el esperado, ya que los picos de oxidación de los voltamogramas se asocian con la oxidación de los polifenoles.

Por otro lado, a partir de los datos másicos se han obtenido modelos de correlación PLS-1 con coeficientes de correlación más bajos y con un número mayor de variables. Si bien, es cierto que los datos másicos se correlacionan mejor con los parámetros de densidad, azúcar, grado Brix, grado (16,8) y grado (17,5), todos ellos relacionados con el contenido de azúcares en los mostos, mientras que, con el IPT la correlación fue más baja. Este resultado también es coherente con el hecho de que en los masogramas se observa un aumento de masa que se relaciona con la polimerización y adhesión de los azúcares sobre el electrodo.

La lengua electrónica desarrollada permitirá evaluar los parámetros químicos en los mostos con un solo ensayo, en vez de un gran número de análisis químicos tradicionales.

Tabla 4. Parámetros estadísticos obtenidos con el modelo de regresión PLS-1 establecido entre los parámetros químicos y los datos voltamétricos obtenidos con la lengua electrónica en los mostos.

Parámetro	RMSEC	RMESP	$R^2_C$	$R^2_P$	LV
Densidad	0,0006	0,0021	0,9968	0,9668	4
Azúcar	1,5886	5,3305	0,9962	0,9660	4
Grado Brix	0,1304	0,4167	0,9966	0,9662	4
IPT	0,2352	0,3438	0,9990	0,9979	3
Grado (16,8)	0,0931	0,3165	0,9963	0,9662	4
Grado (17,5)	0,0960	0,3078	0,9958	0,9656	4

Tabla 5. Parámetros estadísticos obtenidos con el modelo de regresión PLS-1 establecido entre los parámetros químicos y los datos másicos obtenidos con la lengua electrónica en los mostos.

Parámetro	RMSEC	RMESP	$R^2_C$	$R^2_P$	LV
Densidad	0,0018	0,0029	0,9673	0,9155	4
Azúcar	4,5979	7,3318	0,9678	0,9171	4
Grado Brix	0,3963	0,6313	0,9678	0,9177	4
IPT	1,1785	1,9710	0,9742	0,9278	5
Grado (16,8)	0,2731	0,4356	0,9678	0,9173	4
Grado (17,5)	0,2659	0,4240	0,9676	0,9167	4

## 4. CONCLUSIONES

---

La lengua electrónica formada por los sensores EQCM modificados con ftalocianinas tetrasulfónicas se han utilizado con éxito para analizar los mostos. Los voltamogramas mostraron picos anódicos en un amplio rango de potenciales que se relacionan principalmente con el contenido fenólico en los mostos. Por otro lado, los masogramas evidenciaron un aumento de la masa que se relaciona con procesos de polimerización y adsorción de azúcares sobre el electrodo EQCM.

La capacidad de la matriz de sensores para discriminar uvas de acuerdo con sus parámetros químicos se ha evidenciado mediante el análisis PCA. El análisis de componentes principales de los datos voltamétricos obtenidos con la lengua electrónica ayudó a discriminar las muestras de mosto según su índice de polifenoles total (IPT); mientras que, el mismo análisis con los datos másicos hace que las muestras se puedan discriminar según el grado Brix. Además, el modelo de regresión realizado con PLS ha mostrado que existe una alta correlación entre los datos voltamétricos y el IPT, mientras que los datos másicos se correlacionan mejor con la densidad, el contenido en azúcar, el grado Brix y los grados 16,8 y 17,5, todos ellos relacionados con el contenido en azúcares en los mostos.

Esta es la primera vez que una lengua electrónica basada en sensores EQCM modificados químicamente con ftalocianinas sulfónicas se utiliza para discriminar variedades de uva usando ambas respuestas (voltamogramas y masogramas) de acuerdo a su composición global. Por otra parte, el uso de sensores EQCM presenta la ventaja de que en el mismo experimento se puede obtener una "doble respuesta" que incrementa la información y mejora la discriminación de las muestras.

## 5. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

---

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se han presentado en diferentes congresos y escuelas mediante comunicaciones orales o pósteres:

Autores: Celia García-Hernández, C. Medina-Plaza, S. Rodríguez-Sánchez, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Méndez.

Título: *Electrochemical Quartz Crystal Microbalance (EQCM) Sensors modified with Phthalocyanines. Analysis of Grapes.*

Tipo de contribución: Póster.

Congreso/Evento: IX International Workshop on Sensors and Molecular Recognition.

Entidad/grupo organizador: Centre of Molecular Recognition and Technological Development (IDM).

Lugar de celebración: Valencia.

Fecha: 6 Julio – 7 Julio 2015.

Autores: Celia García-Hernández, C. Medina-Plaza, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Méndez.

Título: *Discrimination of grape juices by an electrochemical quartz crystal microbalance multisensor system.*

Tipo de contribución: Comunicación oral.

Congreso/Evento: ISOEN 2015, 16th International Symposium on Olfaction and Electronic Noses

Entidad/grupo organizador: INRA, Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia.

Lugar de celebración: Dijon, Borgoña (Francia)

Fecha: 28 Junio – 1 Julio 2015.

Autores: Celia García-Hernández, C. Medina-Plaza, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Méndez.

Título: *Discrimination of grape juices by an electrochemical quartz crystal microbalance multisensor system based on phthalocyanine nanostructured films.*

Revista: Beilstein Journal of Nanotechnology

Índice de impacto: 2,670

Cuartil: 1

Año: Enviado Julio 2015

Autores (p.o. de firma): Celia García-Hernández

Título: *Electrodos nanoestructurados Electroquímico-Másicos.*

Tipo de contribución: Comunicación Oral.

Congreso /Evento: Investigadoras de la UVa en la aventura de la Nanociencia.

Entidad/grupo organizador: Universidad de Valladolid.

Lugar de celebración: Universidad de Valladolid (Valladolid)

Fecha: 10 Marzo 2015

Autores: C. Garcia-Hernandez, M.L. Rodriguez-Mendez, J.A. De Saja.

Título: *Electrochemical quartz crystal microbalance analysis of different varieties of must using sensors based on phthalocyanines.*

Tipo de contribución: Comunicación oral.

Congreso /Evento: VII European School on Molecular Nanoscience.

Entidad/grupo organizador: Instituto Ciencia Molecular (ICMol). Universidad de Valencia.

Lugar de celebración: Gandía (Valencia)

Fecha: 26-31 Octubre 2014

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., Di Natale, C., D'Amico, A. (2005). Nonspecific sensor arrays (“electronic tongue”) for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 77 (11), 1965-1983.
- [2] Consejería de Agricultura y Ganadería. El Salón de la Alimentación 2011 de Castilla y León, la muestra más importante de vinos y carnes de España. Fecha de publicación: 16 de marzo de 2011. Disponible en:  
<http://www.jcyl.es/web/jcyl/AgriculturaGanaderia/es/Plantilla100DetalleFeed/1246464862173/Noticia/1284163277462/Comunicacion>
- [3] Sancho Valls, J., Bota Prieto, E., Castro Martín, J.J (1999). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- [4] Tahara, Y., Toko, K. (2013). Electronic Tongues – A Review. *IEEE Sensors Journal*, 13 (8), 3001-3011.
- [5] Del Valle, M. (2011). Review Article – Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems. *International Journal of Electrochemistry*, 2012, 1-11.
- [6] Riul Jr., A., Dantas, C.A.R., Miyazaki, C.M., Oliveira Jr., O.N. (2010). Recent advances in electronic tongues. *Analyst*, 135 (10), 2481-2495.
- [7] Anand, V., Kataria, M., Kukkar, V., Saharan, V., Choudhury, P.K. (2007). The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, 12 (5-6), 257-265.
- [8] Kobayashi, Y., Habara, M., Ikezaki, H., Chen, R., Naito, Y., Toko, K. (2010). Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores. *Sensors*, 10 (4), 3411-3443.

- [9] Zeravik, J., Hlavacek, A., Lacina, K., Skládal, P. (2009). State of the art in the field of electronic and bioelectronic tongues - Towards the analysis of wines. *Electroanalysis*, 21 (23), 2509-2520.
- [10] Baldwin, E.A., Bai, J., Plotto, A., Dea, S. (2011). Electronic noses and tongues: Applications for the food and pharmaceutical industries. *Sensors*, 11 (5), 4744-4766.
- [11] Lvova, L., Kirsanov, D., Di Natale, C., Legin, A. (Eds.). (2014). *Multisensor Systems for Chemical Analysis: Materials and Sensors*. Florida: Pan Stanford.
- [12] Sliwinska, M., Winiewska, P., Dymerski, T., Namiesnik, J., Wardenci, W. (2014). Food analysis using artificial senses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (7), 1423-1448.
- [13] Ciosek, P., Wróblewski, W. (2011). Potentiometric electronic tongues for foodstuff and biosample recognition-An overview. *Sensors*, 11 (5), 4688-701.
- [14] Nuñez, L., Ceto, X., Pividori, M.I., Zanoni, M.V.B., Del Valle, M. (2013). Development and application of an electronic tongue for detection and monitoring of nitrate, nitrite and ammonium levels in waters. *Microchemical Journal*, 110, 273-279.
- [15] Legin, A., Makarychev-Mikhailov, S., Goryacheva, O., Kirsanov, D., Vlasov, Y. (2002). Cross-sensitive chemical sensors based on tetraphenylporphyrin and phthalocyanine. *Analytica Chimica Acta*, 457 (2), 297-303.
- [16] Lvova, L., Paolesse, R., Di Natale, C., D'Amico, A. (2006). Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based Electronic tongue. *Sensors and Actuators-B*, 118 (1-2), 439-447.
- [17] Cortina-Puig, M., Muñoz-Berbel, X., Del Valle, M., Muñoz, F.J., Alonso-Lomillo, M.A. (2007). Characterization of an ion-selective polypyrrole coating and application to the joint determination of potassium, sodium and ammonium by electrochemical impedance spectroscopy and partial least squares method. *Analytica Chimica Acta*, 597 (2), 231-237.

- [18] Rodriguez-Mendez, M.L., Apetrei, C., Gay, M., De Saja, J.A. (2009). Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensorsystem based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and Screen Printed Electrodes. *Electrochimica Acta*, 54 (27), 7033-7041.
- [19] Ceto, X., Apetrei, C., Del Valle, M., Rodriguez-Mendez, M.L. (2014). Evaluation of red wines antioxidant capacity by means of a voltammetric e-tongue with an optimized sensor array. *Electrochimica Acta*, 120, 180-186.
- [20] Rodriguez-Mendez, M.L., Parra, V., Apetrei, C., Gay, M., Prieto, N., de Saja, J.A. (2008). Electronic tongue based on voltammetric electrodes modified with electroactive materials. Applications. *Microchimica Acta*, 163 (1-2), 23-31.
- [21] Winqvist, F. (2008). Voltammetric electronic tongues - basic principles and applications. *Microchimica Acta*, 163 (1-2), 3-10.
- [22] Kutyla-Olesiuk, A., Nowacka, M., Wesoly, M., Ciosek, P. (2013). Evaluation of organoleptic and texture properties of dried apples by hybrid electronic tongue. *Sensors and Actuators-B*, 187, 234-240.
- [23] Otto, M., Thomas, J.D.R. (1985). Model studies on multiple channel analysis of free magnesium, calcium, sodium, and potassium at physiological concentration levels with ion-selective electrodes. *Analytical Chemistry*, 57 (13), 2647-2651.
- [24] Hayashi, K., Yamanaka, M., Toko, K., Yamafuji, K. (1990). Multichannel taste sensor using lipid-membranes. *Sensors and Actuators-B*, 2 (3), 205-213.
- [25] Winqvist, F., Wide, P., Lundstrom, I. (1997). An electronic tongue based on voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 357 (1-2), 21-31.
- [26] Winqvist, F., Holmin, S., Krantz-Rulcker, C, Wide, P., Lundstrom, I. (2000). A hybrid electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 406 (2), 147-157.

- [27] Winqvist, F., Rydberg, E., Holmin, S., Krantz-Rulcker, C, Lundstrom, I. (2002). Flow injection analysis applied to a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 471 (2), 159-172.
- [28] Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A. (1997). Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions. *Sensors and Actuators-B*, 44 (1-3), 532-537.
- [29] Legin, A., Rudnitskaya, A., Vlasov, Y., Di Natale, C., Davide, F., D'Amico, A. (1997). Tasting of beverages using an electronic tongue. *Sensors and Actuators-B*, 44 (1-3), 291-296.
- [30] Di Natale C., Macagnano, A., Davide, F., D'Amico, A., Legin, A., Vlasov, Y., Rudnitskaya, A., Seleznev, B. (1997). Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue. *Sensors and Actuators-B*, 44 (1-3), 423-428.
- [31] Legin, A., Rudnitskaya, A., Lvova, L., Vlasov, Y., Di Natale, D'Amico, A. (2003). Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception. *Analytica Chimica Acta*, 484 (1), 33-34.
- [32] Legin, A., Rudnitskaya, A., Seleznev, B., Vlasov, Y. (2005). Electronic tongue for quality assessment of ethanol, vodka and eau-de-vie. *Analytica Chimica Acta*, 534 (1), 129-135.
- [33] Rodriguez-Mendez, M.L., Medina-Plaza, C., García-Hernández, C., De Saja, J.A., Fernández-Escudero, J.A., Barajas-Tola, E., Medrano, G. (2015). Analysis of grapes and wines using a voltammetric bioelectronic tongue: Correlation with the phenolic and sugar content. *IEEE Sensors 2014 Proceedings*, 2139-2142.
- [34] Parra, V., Hernando, T., Rodriguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A. (2004). Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified carbon paste electrodes for discrimination of red wines. *Electrochimica Acta*, 49 (28), 5177-5185.
- [35] Arrieta, A., Rodriguez-Mendez, M.L., De Saja, J.A. (2003). Langmuir-Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste. *Sensors and Actuators-B*, 95 (1-3), 357-365.

- [36] Gay, M., Apetrei, C., Nevares, I., del Alamo, M., Zurro, J., de Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. (2010). Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine. *Electrochimica Acta*, 55 (22), 6782-6788.
- [37] Medrano, G., de Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. (2014). Electronic tongue formed by sensors and biosensors containing phthalocyanines as electron mediators. Application to the analysis of red grapes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 18 (1-2), 76-86.
- [38] Medina-Plaza, C., de Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. (2014). Bioelectronic tongue based on lipidic nanostructured layers containing phenol oxidases and lutetium bisphthalocyanine for the analysis of grapes. *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 276-286.
- [39] Gay, M., Diez-Arevalo, E., De Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. (2013). Electrochemical quartz crystal microbalance analysis of the oxidation reaction of phenols found in wines at lutetium bisphthalocyanine electrodes. *Sensors and Actuators-B*, 185, 24-31.
- [40] Parra, V., Arrieta, A., Fernandez-Escudero, J.A., García, H., Apetrei, C., Rodriguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A. (2006). E-tongue based on a hybrid array of voltammetric sensors based on phthalocyanines, perylene derivatives and conducting polymers: Discrimination capability towards red wines elaborated with different variety of grapes. *Sensors and Actuators-B*, 115 (1), 54-61.
- [41] Medina-Plaza, C., Revilla, G., Munoz, R., Fernandez-Escudero, J.A., Barajas, E., Medrano, G., de Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. (2014). Electronic tongue formed by sensors and biosensors containing phthalocyanines as electron mediators. Application to the analysis of red grapes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 18 (1-2), 76-86.
- [42] M.L. Rodríguez Méndez. C. Medina, J.A. de Saja, C. Apetrei, R. Muñoz. Sensor Arrays Based On Phthalocyanines: New Developments On Nanostructured And Biomimetic Electrochemical Sensors. In: *Multisensor systems for chemical analysis: materials and sensors*. L. Lvova, D. Kirsanov, C. Di Natale, and A. Legin (Eds.). Singapore: Pan Stanford Publishing, 2012.

- [43] Medina-Plaza, C., García-Cabezón, C., García-Hernández, C., Bramorski, C., Blanco-Val, Y., Martín-Pedrosa, F., Kawai, T., De Saja, J.A., Rodríguez-Méndez, M.L. (2015). Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir–Blodgett films based on functionalized nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 853, 572-578.
- [44] Rodríguez-Mendez, M. L., Apetrei, C., Gay, M., Medina-Plaza, C., De Saja, J.A., Vidal, S., Aagaard, O., Ugliano, M., Wirth, J., Cheynier, V. (2014). Evaluation of oxygen exposure levels and polyphenolic content of red wines using an electronic panel formed by an electronic nose and an electronic tongue. *Food Chemistry*, 155, 91-97.
- [45] Prieto, N., Gay, M., Vidal, S., Aagaards, O., de Saja, J.A., Rodríguez-Mendez, M.L. (2011). Analysis of the influence of the type of closure in the organoleptic characteristics of a red wine by using an electronic panel. *Food Chemistry*, 129 (2), 589-594.
- [46] Parra, V., Arrieta, A., Fernández-Escudero, J.A., Iñiguez, M., Rodríguez-Méndez, M.L., de Saja, J.A. (2006). Monitoring of the ageing of red wines in oak barrels by means of a hybrid electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2), 229-237.
- [47] Apetrei, C., Apetrei, I., Nevares, I., del Alamo, M., Parra, V., Rodríguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A. (2007). Using an e-tongue based on voltammetric electrodes to discriminate among red wines aged in oak barrels or aged using alternative methods. Correlation between electrochemical signals and analytical parameters. *Electrochimica Acta*, 52 (7), 2588-2594.
- [48] Rodríguez-Méndez, M.L., Arrieta, A., Parra, V., Vegas, A., Villanueva, S., Gutierrez-Osuna, R., de Saja, J. A. (2004). Fusion of three sensory modalities for the multimodal characterization of red wines. *IEEE Sensors Journal*, 4 (3), 348-354.
- [49] Parra, V., Arrieta, A., Fernandez-Escudero, J.A., Rodríguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A. (2006). Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines. *Sensors and Actuators-B*, 118 (1-2), 448-453.
- [50] Volpati, D., Alessio, P., Zanolini, A.A., Storti, F.C., Job, A.E., Ferreira, M., Riul, A., Oliveira, O.N., Constantino, C.J.L. (2008). Exploiting Distinct Molecular Architectures of

Ultrathin Films Made with Iron Phthalocyanine for Sensing. *Journal of Physical Chemistry B*, 112 (48), 15275-1582.

[51] Campbell, F.W., Compton, R.G. (2010). The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (1), 241-259.

[52] Alencar, W.S., Crespilho, F.N., Martins, M.V.A., Zucolotto, V., Oliveira, O.N., Silva, W.C. (2009). Synergistic interaction between gold nanoparticles and nickel phthalocyanine in layer-by-layer (LbL) films: evidence of constitutional dynamic chemistry (CDC). *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11 (25), 5086-5091.

[53] Pal, M., Ganesan, V. (2009). Zinc Phthalocyanine and Silver/Gold Nanoparticles Incorporated MCM-41 Type Materials as Electrode Modifiers. *Langmuir*, 25 (22), 13264-13272.

[54] March, C., Manclus, J.J., Jimenez, Y., Arnau, A., Montoya, A. (2009). A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, 78 (3), 827-833.

[55] Paolesse, R., Tortora, L., Monti, D., Nardis, S., Stefanelli, M., D'Amico, A., Di Natale, C. (2009). Dip and wait: a facile route to nanostructured porphyrin films for QCM functionalization. *Proceedings of the Eurosensors XXIII Conference. Procedia Chemistry*, 1, 180-183.

[56] Toniolo, R., Pizzariello, A., Dossi, N., Lorenzon, S., Abollino, O., Bontempelli, G. (2013). Room temperature ionic liquids as useful overlayers for estimating food quality from their odor analysis by Quartz Crystal Microbalance measurements. *Analytical Chemistry*, 85, 7241-7247.

[57] Panigrahi, S.; Sankaran, S.; Mallik, S.; Gaddam, B., Hanson, A.A. (2012). Olfactory receptor-based polypeptide sensor for acetic acid VOC detection. *Materials Science & Engineering C*, 32 (6), 1307-1313.

- [58] Khot, L.R., Panigrahi, S., Lin, DQ. (2011). Development and evaluation of piezoelectric-polymer thin film sensors for low concentration detection of volatile organic compounds related to food safety applications. *Sensors and Actuators-B*, 153, 1-10.
- [59] Guo, X., Lin, C.S., Chen, S.H., Ye, R., Wu, V.C.H. (2012). A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viable pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 38 (1), 177-183.
- [60] Ermolaeva, T. N., Kalmykova, E. N., Shashkanova, O.Yu. (2008). Piezoquartz biosensors for the analysis of environmental objects, foodstuff and for clinical diagnostic. *Russian Journal of General Chemistry*, 78 (12), 2430-2444.
- [61] Salam, F., Uludag, Y., Tothill, I.E. (2012). Real-time and sensitive detection of Salmonella Typhimurium using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification. *Talanta*, 115, 761-767.
- [62] Buttry, D.A., Ward, M.D. (1992). Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Chemical Reviews*, 92 (6), 1355-1379.
- [63] Grimshaw, S. (2003). Quartz Crystal Thin-Film Monitoring Forges Ahead. *Photonics Spectra*, 37 (4), 82.
- [64] Eickes, C., Rosenmund, J., Wasle, S., Doblhofer, K., Wang, K., Weil, K.G. (2000). The electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) in the studies of complex electrochemical reactions. *Electrochimica Acta*, 45, 3623-3628.
- [65] Brown, R.J.C., Brett, D.J.L., Kucernak, A.R.J. (2009). An electrochemical quartz crystal microbalance study of platinum phthalocyanine thin films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 663, 339-346.
- [66] Kutner, W., Noworyta, K., Marczak, R., D'Souza, F. (2002). Electrochemical quartz crystal microbalance studies of thin-solid films of higher fullerenes: C76, C78 and C84. *Electrochimica Acta*, 47, 2371-2380.

- [67] Wang, J., Mian, J., Lu, F. (1998). Electrochemical quartz crystal microbalance investigation of surface fouling due to phenol oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 444, 127-132.
- [68] Andreescu, S., Andreescu, D., Sadik, O.A. (2003). A new electrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes. *Electrochemistry Communications*, 5, 681-688.
- [69] Subbaiyan, N.K., Obraztsov, L., Wijesinghe, C.A., Tran, K., Kutner, W., D'Souza, F. (2009). Supramolecular Donor-Acceptor Hybrid of Electropolymerized Zinc Porphyrin with Axially Coordinated Fullerene: Formation, Characterization, and Photoelectrochemical Properties. *Journal of Physical Chemistry C*, 113 (20), 8982-8989.
- [70] Sigalov, S., Levi, M.D., Salitra, G., Aurbach, D., Maier. (2010). EQCM as a unique tool for determination of ionic fluxes in microporous carbons as a function of surface charge distribution. *Electrochemistry Communications*, 12 (12), 1718-1721.
- [71] Su, YH., Xie, QJ., Chen, C., Zhang, QF., Ma, M., Yao, SZ. (2008). Electrochemical quartz crystal microbalance studies on enzymatic specific activity and direct electrochemistry of immobilized glucose oxidase in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate and multiwalled carbon nanotubes. *Biotechnology Progress*, 24 (1), 262-272.
- [72] Yu, RM., Ma, M., Wang, LL., Xie, QJ., Cao, ZJ., Jiang, XQ., Yao, SZ. (2009). Highly sensitive and surface-renewable electrochemical quartz crystal microbalance assays of heparin and chondroitin sulfate based on their effects on the electrodeposition of neutral red. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (6), 1771-17.
- [73] Apetrei, C., Apetrei, I.M., Villanueva, S., de Saja, J.A., Gutierrez-Rosales, F., Rodriguez-Mendez, M.L. (2010). Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness. *Analytica Chimica Acta*, 663 (1), 91-97.

- [74] Ghosh, A., Tudu, B., Tamuly, P., Bhattacharyya, N., Bandyopadhyay, R. (2012). Prediction of theaflavin and thearubigin content in black tea using a voltammetric electronic tongue. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 116, 57–66.
- [75] Buratti, S., Giovanelli, G. (2011). Application of non-destructive techniques for the monitoring of red wine fermentation. *NewFood*, 14, 59-64.
- [76] Ciosek, P., Brudzewski, K., Wróblewski, W. (2006). Milk classification by means of an electronic tongue and Support Vector Machine neural network. *Measurement Science and Technology*, 17 (6), 1379-1384.
- [77] Cetó, X., Céspedes, F., del Valle, M., (2012). BioElectronic Tongue for the quantification of total polyphenol content in wine. *Talanta*, 99, 544-551.
- [78] Gil, L., Barat, J.M., Baigts, D., Martínez-Máñez, R., Soto, J., Garcia-Breijo, E., Aristoy, M.C., Toldrá, F., Llobet, E. (2011). Monitoring of physical–chemical and microbiological changes in fresh pork meat under cold storage by means of a potentiometric electronic tongue. *Food Chemistry*, 126 (3), 1261-1268.
- [79] Gil, L., Barat, J.M., Escriche, I., Garcia-Breijo, E., Martínez-Máñez, R., Soto, J., (2008). An electronic tongue for fish freshness analysis using a thick-film array of electrodes. *Microchimica Acta*, 163 (1-2), 121–129.
- [80] Gutierrez-Capitan, M., Santiago, J.L., Vila-Planas, J., Llobera, A., Boso, S., Gago, P., Martinez, M.C., Jimenez-Jorquera, C. (2013). Classification and Characterization of Different White Grape Juices by Using a Hybrid Electronic Tongue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (39), 9325-9332.
- [81] Tortora, L., Stefanelli, M. Mastroianni, M., Lvova, L., Di Natale, C., D’Amico, A., Filippini, D., Lundström, I., Paolesse, R. (2009). The hyphenated CSPT-potentiometric analytical system: An application for vegetable oil quality control, *Sensors and Actuators-B*, 142 (2), 457–463

- [82] Lvova, L., Denis, S., Barra, A., Mielle, P., Salles, C., Vergoignan, C. DiNatale, C., Paolesse, R., Temple-Boyer, P., Feron, G. (2012). Salt release monitoring with specific sensors in “in vitro” oral and digestive environments from soft cheeses. *Talanta*, 97, 171-180.
- [83] Ferreira, E.J., Pereira, R.C.T., Delbem, A.C.B., Oliveira, O.N., Mattoso, L.H.C. (2007). Random subspace method for analysing coffee with electronic tongue. *Electronics Letters*, 43 (21), 1138-1140.
- [84] Peres, A.M., Dias, L.G., Veloso, A.C.A., Meirinho, S.G., Sá Morais, J., Machado, A.A.S.C. (2011). An electronic tongue for gliadins semi-quantitative detection in foodstuffs. *Talanta*, 83 (3), 857–864.
- [85] Legin, A., Kirsanov, D., Rudnitskaya, A., Iversen, J.J.L., Seleznev, B., Esbensen, K.H., Mortensen, J., Houmøller, L.P., Vlasov, Y. (2004). Multicomponent analysis of fermentation growth media using the electronic tongue (ET). *Talanta*, 64 (3), 766-772.
- [86] Blanco, C.A., De la Fuente, R., Caballero, I., Rodriguez-Mendez, M.L. (2015). Beer discrimination using a portable electronic tongue based on screen-printed electrodes. *Journal of Food Engineering*, 157, 57-62.
- [87] Winquist, F., Olsson, J., Eriksson, M., (2011). Multicomponent analysis of drinking water by a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 683 (2), 192-197.
- [88] Del Valle, M. (2010). Electronic tongues employing electrochemical sensors. *Electroanalysis*, 22 (14), 1539-1555.
- [89] Kimmel, D.W., LeBlanc, G., Meschievitz, M.E., Cliffel, D.E. (2012). Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*, 84 (2), 685–707.
- [90] Scampicchio, M., Ballabio, D., Arecchi, A., Cosio, S.M., Mannino, S. (2008). Amperometric electronic tongue for food analysis. *Microchimica Acta*, 163 (1-2), 11-21.
- [91] QCM200 Quartz Crystal Microbalance (2004). Stanford Research Systems, Inc. Sunnyvale, California.

- [92] Toko, K., (2013). Biochemical sensors: Mimicking gustatory and olfactory senses. Pan Stanford Publishing, Singapore.
- [93] Raleigh, L. (1985). Quartz piezoelectric. In: Pacy, D.J. (1960). Vacuum, 9, 261-270.
- [94] Curie, J., Curie, P. (1880). An oscillating quartz crystal mass detector. Rendu, 91, 294-297.
- [95] O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G. (1999). Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. Biosensors and Bioelectronics, 14 (8), 663-670.
- [96] Ebersole, R., Miller, J., Moran, J., Ward, M. (1990). PZ quartz sensors for use in clinical analysis. Journal of the American Chemical Society, 112, 3239.
- [97] Wolfbeis O. S., Steinem C., Janshoff A. (2007). Piezoelectric sensors. Berlin: Springer-Verlag.
- [98] Sauerbrey, G.Z. (1959). Use of quartz vibration for weighing thin films on a microbalance. Journal Physik, 155, 206–212.
- [99] Ceto, X., Capdevilla, J., Minguez, S., del Valle, M. (2014). Voltammetric bioelectronic tongue for the analysis of phenolic compounds in rosé cava wines. Food Research International, 55, 455–461.
- [100] Orozco, J., Fernandez-Sanchez, C., and Jimenez-Jorquera, C. (2009). Gold nanoparticle-modified ultramicroelectrode arrays: A suitable transducer platform for the development of biosensors. Procedia Chemistry, 1 (1), 666-669.
- [101] Ponce, I., Silva, J.F., Oñate, R., Rezende, M.C., Paez, M.A., Pavez, J., Zagal, J.H. (2011). Enhanced catalytic activity of Fe phthalocyanines linked to Au(111) via conjugated self-assembled monolayers of aromatic thiols for O<sub>2</sub> reduction, Electrochemistry Communications, 13, 1182-1186.
- [102] Han, J.B., Xu, X.Y., Rao, X.Y., Wei, M., Evans, D.G., Duan, X.J. (2011). Layer-by-layer assembly of layered double hydroxide/cobalt phthalocyanine ultrathin film and its application for sensors, Materials Chemistry, 21, 2126-2130.

- [103] Apetrei, C., Alessio, P., Constantino, J.C., De Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L., Pavinatto, F., Giuliani, E., Zucolotto, V., Oliveira, O.N. (2011). Biomimetic biosensor based on lipidic layers containing tyrosinase and lutetium bisphthalocyanine for the detection of antioxidants. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (5), 2513-2519.
- [104] Wang, K., Dai, L.N., Liu, Q., Li, H.N., Ju, C., Wu, J., Li, H.M. (2011). Electrodeposition of unsubstituted iron phthalocyanine nano-structure film in a functionalized ionic liquid and its electrocatalytic and electroanalysis applications, *Analyst*, 136, 4344-4349.
- [105] Aoki, P.H.B., Volpati, D., Riul, A.Jr., Caetano, W., Constantino, C.J.L. (2009). Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids as Transducers in Sensing Applications. *Langmuir*, 25 (4), 2331-2338.
- [106] Gonzalez, S.; Fernandez, M.; Cuervo, A., Lasheras, C. (2014). Dietary intake of polyphenols and major food sources in an institutionalised elderly population. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 27 (2), 176-183.
- [107] Del Río, D., Costa, L.G., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20 (1), 1-6.
- [108] Kartsova, L.A., Alekseeva, A.V. (2008). Chromatographic and Electrophoretic Methods for Determining Polyphenol Compounds. *Journal of Analytical Chemistry*, 63, 1024-1033.
- [109] Matemadombo, F., Apetrei, C., Nyokong, T., Rodriguez-Mendez, M.L., De Saja, J.A. (2012). Comparison of carbon screen-printed and disk electrodes in the detection of antioxidants using CoPc derivatives. *Sensors and Actuators-B*, 166, 457-466.
- [110] OIV. (2013). Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos (Vol. 2). Paris, France: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.
- [111] Gutiérrez-Osuna, R., Nagle, H.T. (1999). A method for evaluating data-preprocessing techniques for odor classification with an array of gas sensors. *IEEE Transactions on Systems Man and Cybernetics B*, 29, 626-632.