



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Desarrollo de sensores electroquímicos
nanoestructurados para el análisis de leche**

Autor:

García Garrido, Elena

Tutores:

**Rodríguez Méndez, María Luz
Salvo Comino, Coral**

**Departamento de Química Física y
Química inorgánica**

Valladolid, Junio 2018.



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Agradecimientos

Quisiera aprovechar esta oportunidad para agradecer a todos aquellos que han colaborado directa e indirectamente para que este proyecto haya sido posible.

En primer lugar, a la profesora María Luz Rodríguez Méndez, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi TFG formando parte de su grupo de investigación, haciendo de este trabajo un atractivo proceso de aprendizaje.

También me gustaría dedicar unas palabras a la persona que ha supervisado y dirigido este trabajo, la doctoranda Coral Salvo, gracias por su paciencia, dedicación e ilusión, haciendo que cada día fuese mejor que el anterior.

De igual manera, agradecer a los compañeros del laboratorio, su acogida y trato como una más del equipo desde el primer día, prestándome su ayuda y atención siempre que fue necesaria.

A mis amigos de toda la vida, mis compañeros de clase y a todas aquellas personas que han ido aportando su granito de arena, complementándome en estos años de carrera, con los que he vivido momentos inolvidables, especialmente a Patri, Mariluz y Bea, con la que tantas horas de biblioteca he compartido.

A la JCyL–FEDER: VA–011416 y al MINECO–FEDER: AGL2015–67482–R por su colaboración.

Y, sobre todo, a mi familia y a Aslan, los que adoro, gracias por darme la oportunidad de formarme y estudiar esta carrera que concluye con este trabajo. Por ser un ejemplo de esfuerzo, superación y sacrificio para mí y por su apoyo incondicional.

A todos ellos, GRACIAS.



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores electroquímicos nanoestructurados para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Resumen

En este trabajo, se desarrollaron biosensores voltamétricos nanoestructurados siguiendo la técnica Layer by Layer mediante combinación electrostática de materiales sensibles con cargas opuestas, sobre sustrato de ITO, modificados con las enzimas glucosa-oxidasa (GOD) y galactosa-oxidasa (GAO).

Para evaluar el comportamiento de los biosensores enzimáticos y analizar los mecanismos redox de glucosa y galactosa en un medio complejo, se aplicaron técnicas electroquímicas en medios basados en dichos azúcares y sobre leche.

Estos sensores se caracterizaron mediante espectroscopía FTIR y UV-Vis, evaluando su respuesta y reproducibilidad en función del pH, así como la sensibilidad mediante cronoamperometría, consiguiéndose LODs de órdenes entre 10^{-9} y 10^{-11} M.

Finalmente se realizaron estudios estadísticos sobre los datos obtenidos con el sistema multisensor, destacando el análisis PCA para discriminar la leche en función de su contenido en lactosa y degradación temporal y el análisis PLS-1 para establecer correlaciones entre los resultados del análisis químico y los experimentales.

Palabras clave

Biosensor enzimático, Layer by Layer (LbL), glucosa-oxidasa (GOD), galactosa-oxidasa (GAO), electroquímica.



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Abstract

In this project, nanostructured voltammetric biosensors were developed following the Layer by Layer method by electrostatic combination of sensitive materials with opposite charges, on ITO substrate, modified with the enzymes glucose-oxidase (GOD) and galactose oxidase (GAO).

In order to evaluate the biosensor's enzymatic behavior and analyze the redox mechanisms of glucose and galactose in a complex medium, electrochemical techniques were applied in medium based on both sugars and on milk samples.

These sensors were characterized through FTIR and UV-Vis spectroscopy, evaluating their response and reproducibility as a function of pH and sensitivity by chronoamperometry, obtaining LODs orders in the range of 10^{-9} and 10^{-11} M.

Finally, statistical studies were conducted on the data obtained with the multisensor system, highlighting the PCA analysis to discriminate the milk according to its lactose content and temporal degradation and the PLS-1 analysis to get correlations between the results of the chemical analysis and the experimental ones.

Keywords

Enzymatic biosensor, Layer by Layer, glucose-oxidase (GOD), galactose-oxidase (GAO), electrochemistry.



Índice

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. DESARROLLO DEL TFG.....	7
2.1. Fundamento teórico	9
2.1.1. Industria láctea. Producto principal: leche	9
2.1.1.1. Nociones básicas: Definición y Características. Derivados	9
2.1.1.2. Propiedades físico-químicas y organolépticas de la leche.....	10
2.1.1.3. Composición bioquímica de la leche	13
2.1.1.4. Clasificación de la leche.....	22
2.1.2. Sensores utilizados en el análisis de leche.....	23
2.1.2.1. Desarrollo de sensores. Técnica Layer by Layer (LbL)	25
2.1.2.1.1. Biosensores enzimáticos.....	27
2.1.2.1.2. Sistema multisensor: lengua electrónica	32
2.1.2.2.1. Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	33
2.1.2.2.2. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Visible).....	34
2.1.2.3. Electroquímica	35
2.1.2.3.1. Voltamperometría	38
2.1.2.3.1.1. Voltametría Cíclica.....	39
2.1.2.3.1.2. Cronoamperometría	41
2.1.3. Tratamiento estadístico de datos multivariante.....	42
2.1.3.1. Análisis de Componentes Principales (PCA).....	42
2.1.3.2. Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1).....	43
2.2. Reactivos, materiales y equipos empleados.....	44
2.2.1. Reactivos y materiales.....	44
2.2.2. Equipos	45
2.3. Desarrollo experimental	46
2.3.1. Acondicionamiento del sensor electroquímico.....	46



2.3.1.1. Preparación de disoluciones.....	46
2.3.1.2. Preparación de las enzimas GOD y GAO.....	48
2.3.2. Caracterización del sensor.....	50
2.3.2.1. Espectroscopía FTIR.....	50
2.3.2.2. Espectroscopía UV-Visible.....	51
2.3.3. Estudio electroquímico.....	52
2.3.3.1. Detección de glucosa y galactosa. Voltametría Cíclica.....	52
2.3.3.1.1. En muestras patrón.....	53
2.3.3.1.2. En un medio complejo.....	53
2.3.3.2. Estudio de los límites de detección. Cronoamperometría.....	54
2.3.4. Tratamiento estadístico de datos multivariante.....	55
2.4. Resultados experimentales.....	57
2.4.1. Estudio del crecimiento de bicapas.....	57
2.4.1.1. Análisis por Espectroscopía FTIR.....	57
2.4.1.2. Análisis por Espectroscopía UV-Visible.....	58
2.4.2. Respuesta electroquímica frente a muestras patrón.....	59
2.4.2.1. Respuesta voltamétrica de los sensores (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GOD) frente a glucosa.....	60
2.4.2.2. Respuesta voltamétrica de los sensores (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GAO). frente a galactosa.....	62
2.4.2.3. Estudio de la sensibilidad y límites de detección de los sensores.....	64
2.4.3. Análisis electroquímico en muestras de leche.....	67
2.4.3.2. Leche modificada con un mediador electrónico.....	71
2.4.4. Red de sensores unido a un software de reconocimiento de patrones. Análisis de Componentes Principales (PCA).....	74
2.4.4.2 PCA de leche modificada.....	78
2.4.4.3 PCA comparativa de las dos sesiones de medida para leche fresca y modificada con ferrocianuro.....	79



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

3. CONCLUSIONES	85
4. BIBLIOGRAFÍA.....	89



Índice de figuras

Figura 1. Estructura química: Ácido ascórbico.....	15
Figura 2. Síntesis de la lactosa.....	16
Figura 3. Estructura química de la caseína.....	18
Figura 4. Estructura de un sensor.	24
Figura 5. Chitosán (CHI).....	26
Figura 6. 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborato (LI).....	26
Figura 7. Ftalocianina de cobre tetrasulfonada ($\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$).....	27
Figura 8. Mecanismo de reacción de la enzima glucosa-oxidasa (GOD).....	28
Figura 9. Estructura química del centro activo de la enzima galactosa-oxidasa (GAO). 29	
Figura 10. Mecanismo de reacción de la enzima galactosa-oxidasa (GAO).....	30
Figura 11. Célula electroquímica de tres electrodos.....	37
Figura 12. Voltamograma cíclico curva intensidad-voltaje de la especie de interés.....	39
Figura 13. ND-R Procedure y equipo ND-R 11/2 Rotary Dip Coater.	49
Figura 14. Reactivos y materiales empleados en LbL.....	50
Figura 15. Espectrofotómetro modelo FT/IR 6600.	51
Figura 16. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600.....	52
Figura 17. Celda electroquímica de trabajo.	52
Figura 18. (a) Espectros FTIR de la película LbL de CHI+IL/ $\text{CuPc}^{\text{SO}_3}$ con número creciente de bicapas (de 4 a 32), (b) Relación lineal de la intensidad del pico a 1027 cm^{-1} frente al número de bicapas.	58
Figura 19. (a) Espectro UV-Visible entre 200 y 800 cm^{-1} de la película LbL de CHI+IL/ $\text{CuPc}^{\text{SO}_3}$ con número creciente de bicapas (de 4 a 32), (b) Relación lineal de la intensidad de la banda a 620 cm^{-1} frente al número de bicapas.....	59



Figura 20. Respuesta voltamétrica de sensores CHI+IL/CuPc ^{SO3} (negro); GOD (rojo) y CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GOD (azul) inmersos en glucosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5,6 (a) y 7 (b) y concentración 10 ⁻⁴ M.	61
Figura 21. Reproducibilidad del sensor (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GOD) en glucosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5.6 (a) y pH 7 (b) y concentración 10 ⁻⁴ M.....	62
Figura 22. Respuesta voltamétrica de sensores CHI+IL/CuPc ^{SO3} (negro); GAO (rojo) y CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GAO (azul) inmersos en galactosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5,6 (a) y 7 (b) y concentración 10 ⁻⁴ M.	63
Figura 23. Reproducibilidad del sensor (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GAO) en galactosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5,6 (a) y 7 (b) y concentración 10 ⁻⁴ M.	64
Figura 24. Cronoamperometría catódica del sensor (CHI+IL/CuPc ^{SO3}) a potencial -0,8V con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución patrón de glucosa 10 ⁻⁴ M en tampón fosfato 0,01M pH 7.....	65
Figura 25. Cronoamperometría catódica del biosensor (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GOD) a potencial -0,8V en disolución patrón de glucosa 10 ⁻⁴ M en tampón fosfato 0,01M pH 7.	66
Figura 26. Cronoamperometría catódica del sensor (CHI+IL/CuPc ^{SO3}) a potencial -0,8V con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución patrón de galactosa 10 ⁻⁴ M en tampón fosfato 0,01M pH 7.....	66
Figura 27. Cronoamperometría catódica del biosensor (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GAO) a potencial -0,12V en disolución patrón de galactosa 10 ⁻⁴ M en tampón fosfato 0,01M pH 7.	67
Figura 28. Evolución temporal de la respuesta voltamétrica de las muestras de leche entera con lactosa CLU (1 ^{er} día (negro) 4 ^o día (azul)) y PEÑA (1 ^{er} día (verde) 4 ^o día (rojo)) brutas con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc ^{SO3}) (a), (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GOD) (b), (CHI+IL/CuPc ^{SO3} /GAO) (c).	69



Figura 29. Evolución temporal (1^{er} día y 4^o día) de la respuesta voltamétrica de las muestras de leche semidesnatada sin lactosa COVA (1^{er} día (negro) 4^o día (azul)) y PONFE (1^{er} día (verde) 4^o día (rojo)) brutas con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc^{SO3}) (a), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) (b), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) (c). 71

Figura 30. Evolución temporal (1^{er} día y 4^o día) de la respuesta voltamétrica de las muestras de leche entera con lactosa: CLU (1^{er} día (negro) 4^o día (azul)) y PEÑA (1^{er} día (verde) 4^o día (rojo)) con ferrocianuro con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc^{SO3}) (a), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) (b), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) (c). 73

Figura 31. Evolución temporal (1^{er} día y 4^o día) de la respuesta voltamétrica de las muestras semidesnatadas sin lactosa: COVA (1^{er} día (negro) 4^o día (azul)) y PONFE (1^{er} día (verde) 4^o día (rojo)) con ferrocianuro con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc^{SO3}) (a), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) (b), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) (c). 74

Figura 32. PCA en 3D de las muestras de leche fresca el primer día. **1.** CLU (entera y con lactosa), **2:** PEÑA (entera y con lactosa), **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa) y **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa)..... 76

Figura 33. PCA en 3D de las muestras de leche fresca tras cuatro días en reposo. **1:** CLU (entera y con lactosa), **2:** PEÑA (entera y con lactosa), **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa), **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa). 77

Figura 34. PCA en 2D de las muestras de leche fresca tras cuatro días en reposo. **1:** CLU (entera y con lactosa), **2:** PEÑA (entera y con lactosa), **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa) y **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa). 77

Figura 35. PCA en 3D de las muestras de leche modificadas con ferrocianuro el primer día. **1:** CLU (entera y con lactosa). **2:** PEÑA (entera y con lactosa). **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa). **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa). 78

Figura 36. PCA en 3D de las muestras de leche modificadas con ferrocianuro tras cuatro días en reposo. CLU (entera y con lactosa). **2:** PEÑA (entera y con lactosa). **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa). **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa). 79



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Figura 37. PCA comparativa de la evolución temporal de todas las muestras en 2D para leche bruta (a) y para leche modificada con ferrocianuro (b). **1 y 5:** CLU (entera+lactosa), **2 y 6:** PEÑA (entera+lactosa), **3 y 7:** COVA (semi+sin lactosa), **4 y 8:** PONFE (semi+sin lactosa) 80



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Fórmula de Richmond.....	11
Ecuación 2. Fórmula de Fleischman.....	11
Ecuación 3. Ecuación de Beer-Lamber.	34
Ecuación 4. Ecuación de Nerst.	36
Ecuación 5. Ecuación de Randles-Sevcik para procesos reversibles.....	40
Ecuación 6. Potencial de un proceso reversible.....	40
Ecuación 7. Ecuación de Randles-Sevcik para procesos irreversibles.....	40
Ecuación 8. Potencial de un proceso irreversible.	41
Ecuación 9. Ecuación Cottrell.	41
Ecuación 10. Recta de calibración de un instrumento.....	41
Ecuación 11. Límite de detección.....	42
Ecuación 12. Ecuación de Henderson-Hasselbalch.....	47



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

CAPÍTULO I:

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



1.1. Introducción

La industria alimentaria es el sector que engloba las actividades relacionadas con la elaboración, conservación, transformación o manipulación de productos agrarios destinados a la alimentación. Esta industria tiene un papel imprescindible en la sociedad porque aporta valor añadido a las materias primas del sector primario y genera empleo en las zonas rurales, mejorando su nivel de riqueza y bienestar [1].

En la **Unión Europea**, el sector agroalimentario factura en torno a 1.098.000 millones de euros y está representado por más de 4 millones de personas. Francia (16,4%), Alemania (15,4%), Italia (12%) y el Reino Unido (11,9%) son los líderes en producción, ocupando España el quinto puesto con un 9,5% [1].

La industria alimentaria desempeña un rol fundamental en el sector económico nacional y representa el 21,7% de las ventas de productos totales, con unas 28.400 empresas y facturando alrededor de 98.163 millones de euros [1].

Castilla y León, es el motor de la industria agroalimentaria nacional en cuanto a producción y está encabezada por el cereal, el azúcar, con la mitad de la producción nacional, la patata o el vino [2]. En términos de ventas, destacan las industrias cárnicas (2.604 millones), pan, pastas y pastelería (1.088 millones), industrias lácteas (1.442 millones) y vinícola (612 millones) [1].

En cuanto al sector lácteo, ocupa la segunda posición dentro de la industria alimentaria regional con una producción de 1.425 millones de litros y un valor de 1.100 millones de euros. Es la primera Comunidad Autónoma en producción de leche de oveja, la segunda en leche de vaca y la quinta en leche de cabra [2].

La industria agroalimentaria se está renovando y reinventando permanentemente para poder adaptarse a las nuevas tecnologías y exigencias de los consumidores, así como a la férrea legislación del sector [1]. Debido a estos obstáculos, surge la necesidad de llevar a cabo una gran labor científica y el estudio de posibles mejoras en este campo, surgiendo así equipos de investigación como el grupo UvaSens.

El grupo UvaSens, nacido en el año 1992 y afincado en la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid, es un equipo de investigación dirigido por la Prof. María Luz Rodríguez Méndez del Departamento de Química Física y Química



Inorgánica, surge con el objetivo de desarrollar nuevos métodos de análisis a partir de sensores fiables, precisos, reproducibles y selectivos que optimicen tiempo y costes, que permitan adaptarse a los nuevos cambios y con aplicaciones en la industria agroalimentaria. Este equipo trabaja principalmente en dos líneas de investigación [3]:

Una primera línea básica de investigación, en la que se desarrollan y caracterizan películas nanoestructuradas mediante diferentes técnicas como *Layer by Layer*, *Spin Coating* o *Langmuir-Blodgett*.

Y una segunda línea de investigación, centrada en el diseño de redes de sensores voltamperimétricos llamadas lenguas y narices electrónicas que simulan los receptores de los sistemas gustativo y olfativo respectivamente, con aplicación en el análisis de alimentos [3]. Este grupo de investigación es especialista en el estudio de vinos y mostos y se está abriendo paso en la investigación de leches y zumos.

En la actualidad, se están desarrollando sensores electroquímicos a partir de diferentes técnicas de preparación, mejorando así la funcionalidad de los sensores y obteniéndose buenos resultados en la detección de los analitos de interés.

En concreto, este trabajo se ha enfocado en el desarrollo de biosensores electroquímicos, basados en la formación de películas nanoestructuradas con distintos materiales sensibles mediante la técnica *Layer by Layer*, sobre los que se inmovilizaron diferentes enzimas que mejorasen la transferencia electrónica. Además, estos biosensores se agruparon formando una red que unido a un software de reconocimiento de patrones se conoce como *lengua electrónica*, y que se utilizó para analizar y discriminar muestras de leche con distinta composición y monitorizar la evolución temporal de esas muestras.

1.2. Objetivos

El objetivo fundamental del presente trabajo fue el diseño de biosensores nanoestructurados electroquímicos mediante la técnica de autoensamblado multicapa *Layer by Layer (LbL)* capaces de detectar la glucosa y galactosa en muestras basadas en dichos azúcares (muestras patrón) y en el principal producto lácteo: la leche, a partir de las enzimas oxidorreductasas, Glucosa-oxidasa (GOD) y Galactosa-oxidasa (GAO).



Para alcanzar el objetivo principal, se plantearon una serie de objetivos complementarios, que se mencionan a continuación:

1. Desarrollo de películas nanoestructuradas mediante la técnica *Layer by Layer* con materiales que pueden actuar como mediadores electrónicos, alternando capas de materiales cargados positivamente: *chitosán (CHI)*, un poliaminosacárido natural biocompatible, y/o 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborato, un *líquido iónico (LI)* que favorece la conductividad, con materiales cargados negativamente: la ftalocianina de cobre tetrasulfonada ($\text{CuPc}^{\text{SO}_3}$).
2. Caracterización estructural de los sensores mediante distintas técnicas espectroscópicas tradicionales como la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (*FTIR*), la Espectroscopía Ultravioleta- Visible (*UV-Vis*).
3. Desarrollo de biosensores electroquímicos, depositando Glucosa-oxidasa (GOD) o Galactosa-oxidasa (GAO) sobre las películas LbL.
4. Estudio del comportamiento de los biosensores mediante técnicas electroquímicas representativas como la *voltametría cíclica* y la *cronoamperometría* en muestras patrón.
5. Desarrollo de un sistema multisensor para el análisis estadístico de la evolución temporal de las diferentes muestras de leche entera con lactosa y semidesnatada sin lactosa a temperatura ambiente en muestras con diferentes características.

-Discriminación de las muestras complejas en función de su contenido en lactosa y su estado de frescura mediante el Análisis de los Componentes Principales (PCA).

-Obtención de correlaciones para los parámetros analizados de las diferentes muestras a partir de la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1).



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

CAPÍTULO II: 2. DESARROLLO DEL TFG



2.1. Fundamento teórico

2.1.1. Industria láctea. Producto principal: leche

2.1.1.1. Nociones básicas: Definición y Características. Derivados

El término “leche” hace referencia al producto íntegro y fresco procedente de la secreción mamaria de animales lecheros en reposo y bien alimentados, exento de calostro (leche secretada por la mama los 7 primeros días) [4], obtenido tras el ordeño sin adiciones, dedicado al consumo [5] y que cumple con las características físicas y microbiológica legales [6].

La leche presenta una serie de características esenciales las cuales se comentan a continuación:

-Heterogénea y compleja:

La leche es un líquido blanco y opaco, de olor característico, de sabor dulce por su contenido en lactosa y pH ligeramente ácido. Se trata de una disolución de materia grasa globular, con proteínas en suspensión en el suero, que está formada por un 80% de agua y un 12% de sólidos o materia seca total (mayoritariamente lactosa y sales minerales) [6].

Se dice que es heterogénea porque está formada por proteínas (caseínas, albúminas y globulinas), grasas en forma de triglicéridos (palmítico, mirístico y esteárico), glúcidos (lactosa), vitaminas (B12 (riboflavina), B1 (tiamina), y las vitaminas A, D, E y K liposolubles), minerales (calcio y fósforo) y enzimas, en menor proporción, pero fundamentales por su actividad biológica.

Su complejidad se debe a la posible presencia de sustancias sin valor nutritivo y que, por tanto, deben ser eliminadas [4].

-Fácilmente alterable y de composición variable:

La leche es un producto alterable por cambios físicos (por la entrada de aire a la mama durante el ordeño y, por tanto, oxígeno y nitrógeno durante el ordeño), químicos



(originando la oxidación de algunos componentes como consecuencia del oxígeno presente, donde la luz actúa como catalizador provocando aromas indeseables), bioquímicos, microbiológicos, por tratamientos térmicos o la presencia de microorganismos que puedan sintetizar, por ejemplo, la lactosa a ácido [6].

En cuanto a su composición, se ve alterada a lo largo del ciclo de lactación, siendo el calostro más rico en contenido proteico y sales que la leche en su fase final. Otros factores que también influyen son el estado de salud del animal, la especie animal de origen o las condiciones ambientales, por lo que se hace necesario su defensa frente a la proliferación de microorganismos y la actividad enzimática para su consumo y transformaciones industriales [4].

El procesamiento y fermentación de la leche da lugar a una amplia variedad de productos derivados de ésta, conocidos como productos lácteos, los cuales se exponen a continuación [5]:

1. *Leches desecadas: (leche en polvo) y concentradas (evaporadas o condensadas)* como consecuencia del calentamiento.
2. *Leches de consumo:* no modificadas, salvo por tratamiento térmico y/o desnatado parcial.
3. *Leches modificadas:* esterilizadas, fermentadas (yogurt o kéfir) o aromatizadas.
4. *Queso:* producto de la coagulación de la leche, donde el coágulo se separa del suero. Contiene principalmente caseína y grasa.
5. *Nata:* fracción de leche con elevado contenido en materia grasa, la cual es separada de la leche desnatada por centrifugación.
6. *Mantequilla:* producto fruto de la agitación o batido de la nata tras la separación de la materia grasa y el suero.

2.1.1.2. Propiedades físico-químicas y organolépticas de la leche

En este apartado se exponen, considerando la leche en su conjunto, sus *propiedades físicas* (no alteran la composición o naturaleza química de la materia y se pueden medir u observar), *químicas* (varían la composición de la materia y están relacionadas



con la reactividad de las sustancias químicas) y *organolépticas* (si pueden ser percibidas por los sentidos, como, por ejemplo, el color, sabor, olor o textura), por ser parámetros importantes en el tratamiento estadístico multivariante de datos.

Entre las propiedades más interesantes destacan:

- **Densidad:** depende de la concentración de los sólidos grasos, la proporción de materia grasa, la cantidad de agua o la temperatura. Su valor medio a temperatura ambiente se encuentra entre 1,03-1,033 g/l, siendo elevada en el caso de leches enteras (1,035 g/l) desnatadas (1,029 g/l) y disminuyendo en el caso de leches con excesivo contenido en agua.
- **Viscosidad:** variable que hace referencia a la resistencia que poseen las moléculas del líquido a la deformación y fluidez. Este parámetro disminuye al aumentar la temperatura y aumenta si se trabaja a pH inferior a 6 o próximo a 12, siendo más viscosas las leches enteras, que las desnatadas y estas a su vez que el lactosuero [6].
- **Calor específico:** este parámetro indica las calorías necesarias para elevar en un grado centígrado la temperatura de un gramo de leche [6]. Su valor es ligeramente inferior al del agua y varía ligeramente de leches enteras a desnatadas, no viéndose afectado en gran medida por la temperatura [4].
- **Extracto seco:** hace referencia a la materia seca; al conjunto de sustancias que forman la leche a excepción del agua y tiene un valor de 12,5 g por cada 100 g en la leche bovina. Se obtiene de forma directa conociendo la materia grasa por kg de leche (G) y la densidad a 20°C (D) a partir de las fórmulas:

$$ES\% = 1,2 G + \left(\frac{1000(D-1)}{4}\right) + 1,4$$

Ecuación 1. Fórmula de Richmond.

$$ES\% = 1,2G + 2665 \frac{D-1}{D}$$

Ecuación 2. Fórmula de Fleischman.



- **Punto de congelación y de ebullición:** son características importantes porque permiten detectar la adición de agua en la leche y dependen del contenido en lactosa y sales [6]. Sus valores, en torno a $-0,55^{\circ}\text{C}$ y $100,15^{\circ}\text{C}$ respectivamente, permanecen constantes en la leche bovina [4].
- **Conductividad eléctrica:** la presencia de electrolitos minerales en la leche restringe el paso de la corriente. Su valor medio es $45 \cdot 10^{-4} \text{ Sm}^{-1}$ disminuyendo con el contenido de agua en la leche y aumentando con la acidez [4].
- **Acidez y pH:** el pH de la leche de vaca se sitúa entre 6,6-6,8 por la presencia de caseína, sustancias minerales y las reacciones secundarias de los grupos fosfato, siendo más bajo en el calostro por su elevada proporción en proteínas [6].
- **Potencial óxido-reducción (redox):** mide las propiedades oxidantes (valores positivos) o reductoras (valores negativos) de una disolución en la corriente eléctrica entre dos electrodos sumergidos.
El potencial en muestras de leche se debe en gran medida al contenido de: oxígeno disuelto, sustancias reductoras naturales (xantana-oxidasa, ácido ascórbico), tratamientos térmicos y tecnológicos [6], la presencia de cobre o el pH [4], adquiriendo normalmente un valor entre 0,2-0,3V [6].

Esta propiedad se ha descrito con mayor exactitud, en el estudio para cada componente de la leche en el siguiente apartado.

- **Propiedades organolépticas:** la leche presenta un olor característico y sabor ligeramente dulce debido a su contenido en lactosa. De aspecto blanco por la dispersión de la luz de las micelas de fosforo, caseína y calcio, está compuesta por sustancias orgánicas que originan bandas de absorción por debajo de la zona ultravioleta (300 nm) y por encima de la región infrarroja (750 nm), siendo su índice de refracción medio 1,35 [4].

Los dos componentes que originan su color característico son el caroteno que colorea con una tonalidad amarillenta la materia grasa y la riboflavina presente



en el lactosuero [6]. Si disminuye la proporción de caseína, como es el caso de la leche desnatada, adquiere una tonalidad azulada-grisácea [4].

2.1.1.3. Composición bioquímica de la leche

La leche es una mezcla acuosa compleja de materia grasa, glúcidos, proteínas y otros componentes minoritarios como minerales, enzimas y vitaminas presentes en el medio en forma de emulsión, dispersión o suspensión [5].

A continuación, se describen en profundidad cada uno de sus componentes:

- **Agua:**

Es el nutriente mayoritario y está presente en torno a un 80-90% en la leche bovina [6]. Su cantidad es regulada a partir del contenido en lactosa y sales disueltos en ella y ejerce como enlace de compuestos no solubles. Este componente, se encuentra como:

-*Agua libre*: el agua aparece principalmente de esta forma, se volatiliza con facilidad y es la responsable de la actividad del agua.

-*Agua ligada o de absorción*: es la proporción de agua que no se congela a -20°C , su densidad es mayor que la del agua libre y no está libre para actuar como solvente de azúcares y sales. Está asociada a las proteínas y su determinación se realiza mediante el análisis térmico-diferencial o por resonancia magnética nuclear, proporcionando diferentes valores en función del método empleado [4].

- **Lípidos y sustancias asociadas a la materia grasa**

Los ácidos grasos que forman los triglicéridos de la materia grasa se encuentran dispersos en forma globular en la sangre, se originan a partir de la extracción con disolventes liposolubles, tras la ruptura de la emulsión y se distinguen tres tipos [4]:

1. Lípidos Polares: son fosfolípidos que constituyen el 1 % de los lípidos que están en forma ligada. Se encuentran junto a la membrana de los glóbulos grasos.



2. Lípidos Neutros: hacen referencia a la materia grasa en estado sólido a 20°C, constituida por glicéridos que suponen el 80% de los lípidos totales.
3. Lípidos Insaponificables: son aquellos lípidos insolubles en agua, presentes en la leche en una proporción inferior a 1%.

La materia grasa es uno de los componentes más inestables de la leche tanto en propiedades como en composición. Se altera de manera más gradual que la lactosa, sin causar cambios en la estructura físico-química, pero provocando un sabor poco agradable [4].

Una de las propiedades más interesantes de los lípidos, es su capacidad para oxidarse (*lipólisis*) [7] en la interfase grasa-agua. La oxidación de la materia grasa es un proceso químico que se lleva a cabo en dos fases, la oxidación inicial de los ácidos grasos insaturados de las lecitinas seguida de la oxidación de los triglicéridos, en el que actúan enzimas como las lipooxidasas y que provocan la aparición de anomalías en la leche, alterando el color, textura o sabor [8].

Estas reacciones en cadena dan lugar a dos fenómenos característicos en la leche:

-El “sabor a cartón” en la leche desnatada, al incidir sobre ella la luz que provoca la oxidación de la materia grasa.

-El “sabor a pescado” característico de la mantequilla y las leches en polvo, como consecuencia de la alimentación de rumiantes a base de productos con exceso de remolacha [4].

La lipólisis se ve limitada por factores como el ciclo de lactación (siendo más sensible a la oxidación al inicio), las condiciones ambientales (siendo más susceptible a la oxidación en invierno por la baja proporción de ácidos grasos insaturados) y la alimentación bovina. Otros aspectos que favorecen la oxidación son la acidez, el efecto de la luz solar o la presencia de metales pesados como cobre y hierro [4].

Además, la leche contiene elementos reductores que se oxidan con un potencial redox bajo, por lo que estos agentes actúan como antioxidantes protectores de los alimentos y que previenen su deterioro [8]. El reductor característico de la leche es el ácido ascórbico, que protege a las grasas de la oxidación.

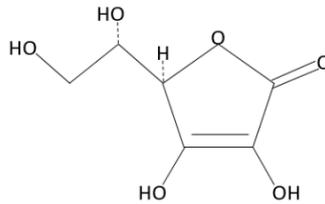


Figura 1. Estructura química: Ácido ascórbico.

Otro fenómeno importante en el tratamiento de la materia grasa de la leche es el *desnatado*, que consiste en la separación de los glóbulos grasos de menor densidad respecto del suero en el que están en forma de emulsión, formándose la nata que posteriormente se extrae tras el reposo durante cierto tiempo (desnatado espontáneo) o por aplicación de fuerza mecánica (desnatado centrífugo) [4].

La proporción de ácidos grasos se determina a partir de métodos analíticos convencionales como la *cromatografía en fase gaseosa* (método analítico más habitual), la *espectrofotometría ultravioleta* (permite determinar de forma cuantitativa los iones metálicos y compuestos orgánicos presentes en una solución), la *espectrofotometría infrarroja* (método empleado para la discriminación de los isómeros CIS y TRANS en ácidos insaturados) y la *espectrofotometría de masa* (para estudiar la estructura de los polienos) [4].

- **Glúcidos (lactosa)**

La leche está compuesta por azúcares o glúcidos libres dializables (hexosas) y glúcidos combinados (glicoproteínas) no dializables. Se distinguen tres clases de glúcidos [4]:

1. Neutros: lactosa y polisacáridos. Pueden aparecer de forma libre o combinados.
2. Nitrogenados: glucosamina y galactosamina, van adheridos a glúcidos neutros.
3. Ácidos: siempre ligados a glúcidos neutros o nitrogenados.

La presencia de glúcidos es relativamente baja en la leche, a excepción de la lactosa, cuya concentración está inversamente relacionada con la concentración de lípidos y caseína [9].

La lactosa es un disacárido formado por un enlace glucosídico 1-4 [9] que se sintetiza en las glándulas mamarias a partir de glucosa sanguínea y ácidos grasos volátiles, y se isomeriza en galactosa y glucosa, en una reacción catalizada por la enzima lactosa-sintetasa, más conocida como *lactasa* [4].

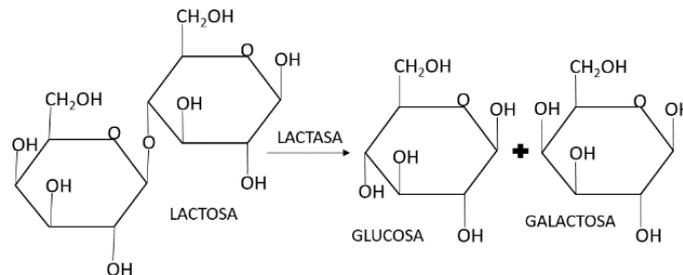


Figura 2. Síntesis de la lactosa.

Dicho glúcido es el principal carbohidrato en la leche [9], un azúcar energético, poco soluble y con un leve sabor dulce. Además, es la única fuente de galactosa, componente fundamental de los tejidos nerviosos. En la industria se obtiene por cristalización a temperaturas inferiores a 100°C [4].

Tiene un gran poder reductor, aunque menor que el de la glucosa. Este parámetro se determina por *métodos colorimétricos* (a partir de la degradación de azúcares por el método Folin), por *cromatografía en fase gaseosa* o *cromatografía HPLC* [4].

La lactosa también puede reaccionar con las caseínas y las proteínas del suero de la leche con amoníaco, aminos o aminoácidos a través de las reacciones complejas no enzimáticas conocidas como "*Pardeamiento Maillard*", que provoca el oscurecimiento de los alimentos o compuestos volátiles y, por tanto, su pérdida de funcionalidad y valor nutritivo [9].



- ***Proteínas (caseína, albúminas y globulinas) y sustancias nitrogenadas***

Las proteínas son el componente más importante de la leche desde el punto de vista nutricional [6] y se sintetizan en las glándulas mamarias a partir de los aminoácidos libres, representando la parte más compleja de la leche.

Una propiedad característica de las proteínas es la *desnaturalización*, que consiste en la modificación sin ruptura de los enlaces covalentes que forman sus estructuras secundaria y terciaria, seguida de un reagrupamiento que origina una nueva conformación [10].

Otro fenómeno característico de las proteínas es la *coagulación* [11]. Se produce en dos fases: una reacción primaria enzimática en la cual la quimosina (enzima proteasa contenida en el cuajo) ataca a la caseína y la solubiliza parcialmente, seguida de la precipitación completa de la caseína en presencia de calcio [4].

En función de su estructura, se distinguen tres grandes grupos de proteínas:

1. Caseína:

Es la proteína exclusiva de la leche y que contiene mayor fracción nitrogenada (en torno al 80% del total nitrogenado en la leche bovina). Está formada por proteínas fosforadas insolubles y precipita cuando se acidifica la leche por encima de pH 4,6 [4].

La caseína, proteína mayoritaria de la leche bovina, tiene mucha importancia en investigación principalmente por dos razones: por su facilidad de preparación y por su sencillez en la determinación de su proporción por medios analíticos [5].

Esta proteína se encuentra en forma micelar y se comporta como una sustancia homogénea en medio líquido durante la *electroforesis* [12] (método industrial para identificar y separar las proteínas que se basa en la movilidad bajo un campo eléctrico, de las proteínas a través de una matriz porosa en función de su tamaño y carga eléctrica), a partir de la cual, se separan las fosfoproteínas de la leche bovina con conformación α , β (constituyen el 70% del conjunto) y κ (constituye el 13%) que tienen una estructura peptídica donde se fijan el fosfato de calcio y otros iones [13].

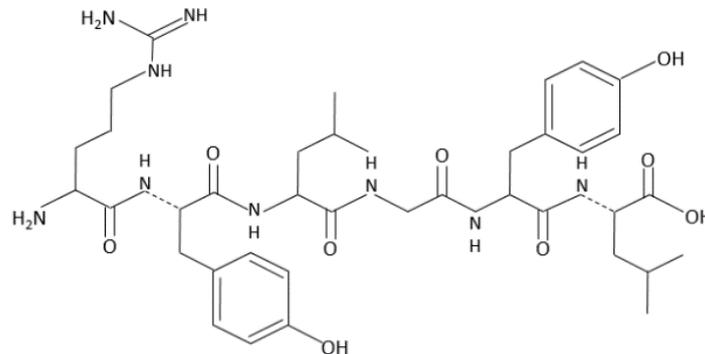


Figura 3. Estructura química de la caseína.

2. Proteínas del lactosuero [4]:

Son proteínas solubles, no dializables que se insolubilizan con el calor. La albúmina (de bajo peso molecular) y la globulina (de elevado peso molecular y abundante en el calostro) pertenecen a este grupo. Su gran valor nutritivo se debe al elevado contenido en ácidos sulfurados, lisina y triptófano.

Las proteínas del lactosuero (lactalbúmina y lactoglobulina), se desnaturalizan fácilmente con el calor, con el pH o con la polaridad del disolvente empleado provocando la pérdida de solubilidad y actividad de manera irreversible; esta característica no afecta a la caseína.

3. Proteosas-peptonas [4]:

Son poco abundantes en la leche bovina y están formadas por glicoproteínas y metaloproteínas encargadas del transporte de cobre y hierro presentes en el organismo.

- **Sales y minerales [4]:**

Son componentes esenciales de la leche a pesar de encontrarse en proporciones entre 3-12 g/l, por la actividad biológica de algunas sales como el calcio, el potasio, los ácidos fosfórico y cítrico y el magnesio.



Su composición depende en gran medida de la alimentación, la raza (el contenido de sales crece con el contenido proteico) o el ciclo de lactación (con mayor proporción en la fase final).

Entre los métodos industriales para determinar los minerales presentes en la leche, destacan los métodos *gravimétricos* (por pesada de un compuesto insoluble), *volumétricos* (valoraciones ácido-base), *fotométricos* (para la determinación de fósforo y yodo), *espectrométricos de emisión y absorción atómica* (para la determinación de metales alcalinos y calcio) o los *métodos electrométricos* (útiles en la detección de elementos minerales menos comunes).

El contenido de algunos minerales como el calcio, en mayor proporción en la sangre, o el fósforo, está relacionado con el contenido de proteína y materia grasa y tiene carácter hereditario.

Cabe señalar que los oligoelementos como (Fe, Pb, F, Zn, I, Cr, Cu, Se, Mn, Si, Br, As, Cd, Hg o Mo) son fundamentales para el organismo por su valor nutritivo, pero pueden volverse tóxicos o incluso mortales a determinadas concentraciones, [4] por lo que se hace necesario llevar a cabo un control rutinario en los laboratorios de los minerales presentes en los alimentos.

- **Enzimas y vitaminas**

La leche contiene enzimas relacionadas con el grupo de proteínas no dializables de las albúminas. Algunas de estas enzimas se encuentran junto a la membrana de los glóbulos grasos y otras en cambio, precipitan con la caseína [4].

Las enzimas tienen gran importancia en la leche bovina por su función bioquímica, pese a no ser componentes mayoritarios. Para muchas de ellas no se conocen sustratos ni medios sobre los que desarrollar su actividad, la cual está directamente relacionada con el pH y la temperatura [4].

En cuanto a su estabilidad térmica, las enzimas son sensibles a los cambios de temperatura, alterando sus propiedades y disminuyendo su actividad catalítica cuando



se emplean a temperaturas lejanas a su valor óptimo, por lo que su sensibilidad al calor permite un mejor control del calentamiento a temperaturas elevadas donde se producen la *pasteurización y esterilización* [14], procesos necesarios para garantizar la seguridad del producto y ampliar su vida útil.

En función de su actividad, las enzimas se clasifican en oxidorreductasas, transferasas e hidrolasas:

-Enzimas Oxidorreductasas

Son enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde una molécula donadora (agente reductor) a otra aceptora (agente oxidante) y tienen importancia por su influencia en el sabor.

Entre ellas destacan la *lactoperoxidasa* [15] [16], primera enzima descubierta en la leche bovina, que cataliza de forma indirecta la oxidación de tiocianato y nitritos a compuestos tóxicos y actúa como mecanismo de defensa frente a la invasión de algunas bacterias lácticas, la *xantina-oxidasa* [17], una flavoproteína que cataliza la oxidación de la xantina a ácido úrico originando como producto secundario agua oxigenada, e interviene provocando un sabor ligeramente oxidado, o la enzima *catalasa* [18], encargada de descomponer el agua oxigenada y que es capaz de oxidar los ácidos grasos insaturados gracias a su actividad no-enzimática.

Otras oxidorreductasas son la sulfhidroxidasa [19] (enriquece el sabor de la leche UHT) y la *superóxido de dismutasa* (reacciona con Zn o Cu catalizando la reacción del anión superóxido) [4].

Para la elaboración de este trabajo, se han desarrollado biosensores basados en las enzimas oxidorreductasas glucosa-oxidasa (GOD) y galactosa-oxidasa (GAO) de las cuales se habla con más detalle en el apartado 2.1.2.1.1. "Biosensores enzimáticos", para la determinación de sus azúcares correspondientes.



-Enzimas transferasas

Son enzimas que catalizan la transferencia de al menos un grupo funcional y destacan la *ribonucleasa* [4], que se encuentra en el lactosuero con una composición de 25 mg/L y es responsable de la hidrólisis de los ácidos ribonucleicos y la *lactosa-sintetasa* [7], una glicosiltransferasa que cataliza la biosíntesis de la lactosa.

-Enzimas hidrolasas

Son enzimas que aceleran la reacción de una sustancia con moléculas de agua provocando su ruptura y dando lugar a componentes más sencillos.

Las enzimas características son la lipoproteína *lipasa* [20], que hidroliza los glicéridos insolubles a glicerol y ácidos grasos, favorece el transporte de los ácidos grasos y su adhesión a los triglicéridos y es causante de la rancidez y la *proteasa* [21], que provoca la hidrólisis de la caseína. Está constituida por la proteasa alcalina (con un 80% de la actividad total) y la proteasa ácida.

Otras enzimas importantes en la leche bovina son la *amilasa*, que sacarifica el almidón dando lugar a azúcares más simples, y precipita con la caseína y la *lisozima*, que se encuentra en el lactosuero provocando la hidrólisis del polisacárido de algunas bacterias [4].

En cuanto a las vitaminas, son necesarias para el funcionamiento del organismo a pesar de no ser capaz de sintetizarlas. La mayoría actúan como coenzimas y se pueden distinguir dos tipos [4]:

- Vitaminas liposolubles: se encuentran únicamente en la materia grasa, por lo que en leches desnatadas y en el lactosuero no aparecen. Destacan el retinol (A), el factor de retención de calcio y fósforo (D) y los tocoferoles (E).
- Vitaminas hidrosolubles: están disueltas en la fase acuosa, manifestándose en la leche desnatada y en el lactosuero. Las vitaminas del grupo B, se encuentran exclusivamente en los rumiantes pues provienen de la alimentación a base de



forraje. Predominan la tiamina (B1), la riboflavina (B2), la piridoxina (B6), la cobalamina (B12), el ácido ascórbico (C) o la biotina (H).

2.1.1.4. Clasificación de la leche

Existen múltiples clasificaciones para los distintos tipos de leche, en función de su aspecto biológico, composición nutricional (contenido en grasas) y contenido en agua.

Atendiendo a su aspecto biológico y composición, se distinguen dos tipos de leche que dependen de la especie mamífera que la produce [4]:

-*Leches caseinosas*: característica de los rumiantes (vaca, cabra, oveja, búfala o reno) y con un contenido equilibrado de proteínas (mayor fracción de caseína que de albúmina y globulina), grasa y lactosa.

-*Leches albuminosas*: representativo de la mujer y los équidos (yegua o burra), con elevada proporción en lactosa y con un contenido similar en caseína, albúmina y globulina, pero con escaso valor nutritivo.

Atendiendo al contenido nutricional, se pueden distinguir [22]:

-*Leche Entera*: contiene todos los nutrientes presentes en la leche.

-*Leche Semidesnatada*: con menor proporción de grasas y sustancias solubles en grasas como vitaminas A, D y E.

-*Leche Desnatada*: no tiene grasas ni nutrientes solubles en ella.

-*Leche Modificada*: aquella a la que se le adicionan grasas y aceites vegetales para mejorar su perfil graso.

-*Leche Enriquecida*: con una adición rica en nutrientes. Destacan las leches desnatadas enriquecidas en vitaminas A, D y E, y las leches enriquecidas con calcio.

Otra clasificación hace referencia a su contenido en agua, pues el estado físico de la leche depende de ese parámetro, diferenciándose cuatro grupos [22]:

-*Leche en polvo o deshidratada*: se obtiene por evaporación total, eliminando el agua y la humedad.



-*Leche condensada*: adquirida tras la evaporación del agua y la posterior adición de sacarosa en alta proporción, para asegurar su conservación, reduciendo las pérdidas nutricionales.

-*Leche evaporada o concentrada*: obtenida al eliminar parte del agua de la leche esterilizada por evaporación al vacío.

Una última clasificación discrimina la leche en función del sistema de higienización, distinguiéndose [22]:

1. *Pasteurizada o leche fresca*: se obtiene calentando la leche a temperaturas en torno a 70°C, durante 15-20 segundos. Esta leche debe conservarse en frío.
2. *Esterilizada*: es obtenida al tratar la leche a 120°C durante 15– 20 segundos, tras el tratamiento previo de preesterilización a 140 – 150°C entre 2 –5 segundos.

Además, se somete a un proceso de homogeneización que provoca mayor pérdida de vitaminas que en la leche pasteurizada, pero que permite una conservación más duradera. Una vez abierta, debe conservarse en frío y consumirse antes de los tres días.

3. *Leche UHT*: se obtiene sometiendo la leche a una temperatura entre 140- 150°C durante 2-5 segundos. La principal ventaja de esta leche es la permanencia de vitaminas tras el tratamiento térmico, aunque durante menor tiempo que en la leche esterilizada. Una vez abierta, debe conservarse en frío y consumirse en un plazo máximo de tres días.

2.1.2. Sensores utilizados en el análisis de leche

Los sensores desempeñan un papel fundamental en la actualidad mejorando la calidad de vida, en la detección de enfermedades [23], en la monitorización ambiental, en el descubrimiento de fármacos, en el tratamiento de aguas y efluentes [24], en la industria textil [25] y en la industria alimentaria y bebidas para la detección y medida de ciertas sustancias o aditivos a partir de las cuales poder reconocer olores o sabores determinados llevando así un control exhaustivo de la calidad y seguridad de los productos.

Un sensor es un dispositivo cuya función es transformar información (señales) de carácter físico, químico o biológico en una señal medible, generalmente eléctrica. Consta de dos elementos básicos: un *receptor* [23] que interactúa con el analito (sustancia de interés a detectar) [26] y genera una señal primaria que es enviada a un *transductor* [23], dispositivo de medida que será el encargado de traducir la información que recibe de la señal primaria y convertirla en una señal secundaria (generalmente óptica, eléctrica [26], térmica o electrónica [23]) proporcional al número de interacciones analito-receptor, procesable y, por tanto, medible. Este proceso de conversión de energía se conoce como señalización [26].

La señal obtenida por el transductor, frecuentemente es amplificada por su baja intensidad y finalmente enviada a algún sistema de registro y monitorización de datos, que procese y/o presente la señal de salida [24] en forma numérica, gráfica, tabulada o como imagen [26].

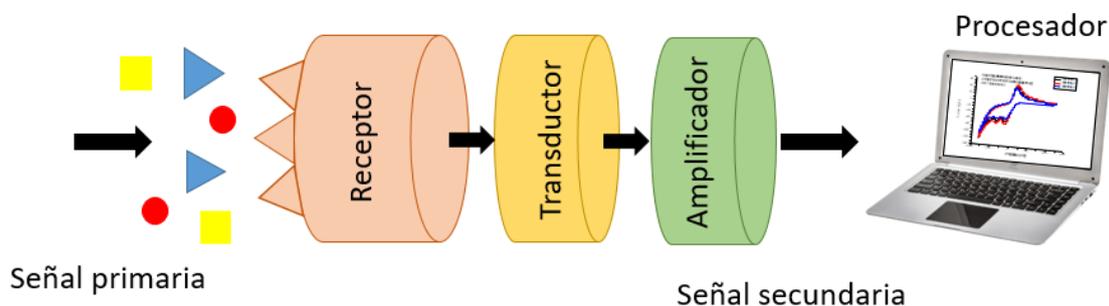


Figura 4. Estructura de un sensor.

En función de la naturaleza de la señal primaria, fruto de la interacción analito-receptor, los sensores pueden ser *ópticos* (si transforman una señal óptica en una señal eléctrica), *magnéticos* (si transforma señales magnéticas), *resistivos* (si transforman la variación de la conductividad en una señal eléctrica), *gravimétricos* (si transforman la variación de masa en una señal eléctrica), *térmicos* (si transforman la variación de temperatura en una señal eléctrica) o *electroquímicos* (si transforman una señal electroquímica en una señal eléctrica).



Los sensores electroquímicos, se clasifican en función de la variable de medida en *sensores potenciométricos* [27] cuyo parámetro medido es la diferencia de potencial entre dos electrodos, el de trabajo y el de referencia, *sensores amperométricos* [28] [29][30][31][32], que miden la intensidad de corriente que penetra en el electrodo a un potencial fijo y los *sensores voltamétricos* [33], que registran la intensidad de corriente a través del electrodo al aplicar un potencial variable en el tiempo. Esta intensidad se ve influenciada por la relación de concentraciones entre reactivo y producto al oxidarse/reducirse.

A lo largo de esta investigación, se han empleado diferentes sensores electroquímicos voltamperométricos por su versatilidad, estabilidad, simplicidad, selectividad, sensibilidad y reproducibilidad [23], y porque son una alternativa económica, rápida [34] y fiable [33] frente a las técnicas de análisis convencionales. Además, la introducción de nuevos nanomateriales funcionales, técnicas de microfabricación, y tecnologías analíticas con propiedades únicas ofrecen una gran posibilidad para aumentar sus capacidades electroanalíticas [35].

2.1.2.1. Desarrollo de sensores. Técnica Layer by Layer (LbL)

En la actualidad, la técnica Layer by Layer ha despertado atención porque permite formar películas delgadas nanoestructuradas, interesantes en biomedicina, medio ambiente o alimentación.

Este método utiliza diferentes materiales sensibles, como polímeros conductores, membranas, nanopartículas o enzimas para mejorar el rendimiento y las propiedades de los sensores electroquímicos, consiguiendo mejorar las capacidades electrocatalíticas de los sustratos y aumentando su reproducibilidad y estabilidad [36], siendo útil en el desarrollo de sensores, en modificación de superficies, en membranas de separación o diálisis, debido a su sencillez, versatilidad [37], robustez y por ser económico [29].

El autoensamblado LbL se basa en la adsorción alterna de iones de carga contraria, (aniones y cationes), de forma secuencial con el fin de construir las películas delgadas con múltiples capas sobre el sustrato conductor [37].



Este método presenta algunas ventajas frente a otras técnicas de preparación de biosensores como la pequeña cantidad de materiales usados [28] y su eficiencia, ya que la desnaturalización de proteínas se minimiza por la formación de las películas en condiciones suaves [38]. Además, su ilimitación de sustratos hace factible utilizarlos para revestir objetos y modificar las superficies de los sensores de cualquier forma y tamaño, a partir de sustratos sencillos para obtener geometrías 3D [38].

Durante esta investigación se ha trabajado con sensores basados en el sustrato conductor de ITO (óxido de indio y estaño), cuya superficie se ha recubierto con películas de diferentes materiales según una secuencia de bicapas, en las que las moléculas de signos contrarios se atraen entre sí. Se combinó una mezcla de chitosán, poliaminosacárido natural biocompatible, y líquido iónico mezcla de aniones orgánicos e inorgánicos, (con carga positiva) y ftalocianina de cobre tetrasulfonada, colorante semiconductor, fotoconductor y con actividad química, (con carga negativa) siguiendo la secuencia (CHI+LI/CuPc^{SO₃⁻}) por fuerzas de tipo electrostáticas para la detección de compuestos electroactivos que pueden ser catalizados por algunas enzimas oxidorreductasas, que combinadas con algunos mediadores electrónicos idóneos son capaces de mejorar la transferencia electrónica.

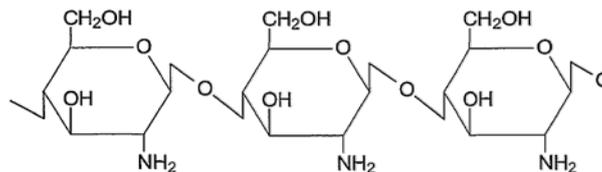


Figura 5. Chitosán (CHI).

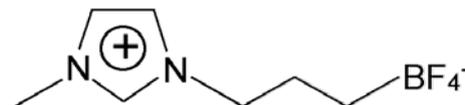


Figura 6. 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborato (LI).

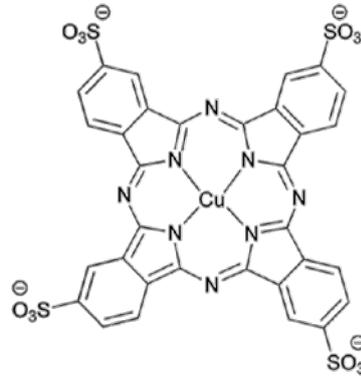


Figura 7. Ftalocianina de cobre tetrasulfonada (CuPC^{503-}).

2.1.2.1.1. Biosensores enzimáticos

Según la OMS algunas enfermedades como la diabetes se duplicará en el año 2030, por lo que es urgente realizar una fuerte inversión en la investigación para la detección y medida de glucosa [29] y otros azúcares en alimentos y medicamentos.

La galactosa está presente normalmente en una concentración máxima de 0,28 mM en el cuerpo humano. La ausencia de alguna de las enzimas involucradas en el mecanismo de la galactosa o su nivel elevado (> 1.1 mM) en neonatos, se puede convertir en galactosemia (enfermedad metabólica basada en la incapacidad para degradar la galactosa), por lo que se hace necesario desarrollar métodos eficientes y convenientes para medir y controlar el nivel de galactosa en el cuerpo humano [39] [40] con importancia en campos como la medicina, fermentación, nutrición humana [41] o en nuestro caso en particular, en la leche a ingestar.

Hasta ahora, estos azúcares se determinaban mediante técnicas convencionales como la cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía gaseosa combinadas con espectrometría de masas (HPLC-MS y GC-MS respectivamente), determinaciones colorimétricas, potenciométricas, quimiométricas [33], análisis gravimétrico y polarimetría [34] entre otras. Sin embargo, estos métodos requieren tiempo [34], grandes inversiones y operarios cualificados, por lo que los biosensores son una alternativa económica, rápida [34], fiable [33] y la herramienta de trabajo en este proyecto.

Los biosensores son sensores químicos que contienen agentes biológicos, en este caso enzimas, con los que se consigue una buena especificidad funcional enzima-sustrato, con elevada sensibilidad de la reacción biológica, estabilidad de la enzima atrapada [36] y selectividad [33]. El material biológico que lo compone interactúa con el analito, asociado a un transductor que procesa esa señal bioquímica y la convierte en una señal eléctrica y medible [36].

Estos biosensores enzimáticos pueden ser de *primera generación* si se basan en la detección del producto H_2O_2 o en la disminución de la concentración de O_2 , de *segunda generación* si utilizan mediadores artificiales redox para reemplazar el O_2 y de *tercera generación* donde la enzima está inmovilizada en un polímero redox con una vía conductora para los electrones oxidados/reducidos en la reacción enzimática, sistema que se conoce como “wired” [24].

La enzima GOD (β -D-glucosa: oxígeno 1-oxidoreductasa [4]), es una flavoproteína [42], que se obtiene a partir de hongos, en especial de *Aspergillus niger* [24] y *Penicillium notatum* [42], cataliza la oxidación de β -D- glucosa a ácido glucónico, usando oxígeno molecular como un aceptor de electrones y produciendo a su vez peróxido de hidrógeno que se descompone por la catalasa (CAT) produciendo agua y oxígeno [25] siguiendo el siguiente esquema de reacción:

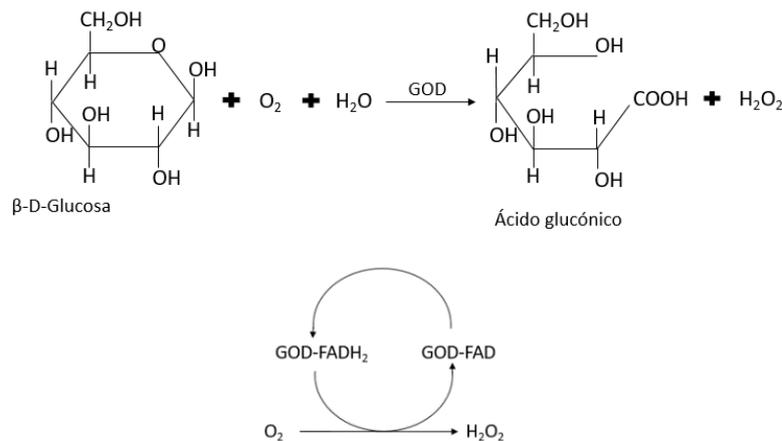


Figura 8. Mecanismo de reacción de la enzima glucosa-oxidasa (GOD).

Su masa molecular se encuentra entre 130-175 kDa [29]. La enzima GOD se caracteriza por su elevada especificidad para el anómero β -D-glucosa, frente al anómero α que no es un sustrato adecuado [25] porque la glucosa-oxidasa cataliza la oxidación de D-glucosa a ácido glucónico, pero no oxida L-glucosa y la velocidad de oxidación del anómero D-glucosa es 157 mayor que la de oxidación de α -L-glucosa [43].

La actividad de la enzima depende del estado de ionización de los aminoácidos en el sitio activo, por lo que el pH tiene un papel vital en el mantenimiento de la conformación adecuada de una enzima [25], tiene su punto isoeléctrico a pH entre 4,2-4,5 y su actividad óptima se da a pH entre 3,5-6,5. Algunos compuestos como p-cloromecuribenzoato, hidroxilamina, Ag^+ , hidrazina, fenilhidrazina, Hg^{2+} , dimedona, Cu^{2+} , y bisulfato de sodio actúan como inhibidores de esta enzima.

La enzima GAO por otro lado, es otra enzima oxidorreductasa [4], de gran interés en los lácteos; una metaloenzima que tiene un átomo de cobre [39] y que proviene de los hongos *Polyporus circinatus* [44] y del *Dactylium dendroides* [39]. La presencia de cobre le proporciona algunas funciones fisiológicas como el transporte de oxígeno, el almacenamiento de cobre, la liberación de electrones o actuando como agente oxidante en algunos alimentos [39][45].

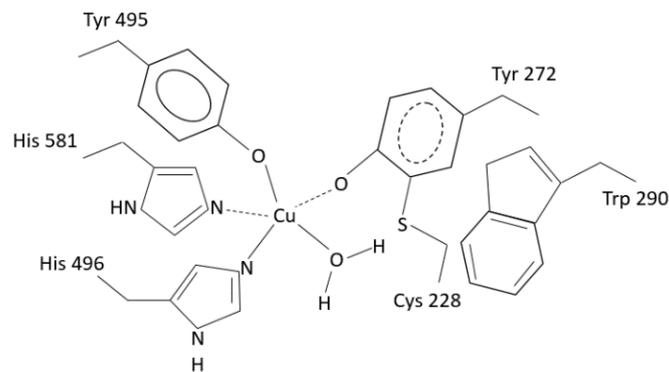


Figura 9. Estructura química del centro activo de la enzima galactosa-oxidasa (GAO).

GAO es capaz de oxidar la galactosa a dihidroxiacetona de forma eficiente [39]. Es responsable de la oxidación de la D-galactosa dando el aldehído correspondiente (D-galactoheptodialdosa) acompañado de la reducción de O_2 a H_2O_2 [44] como se muestra a continuación:

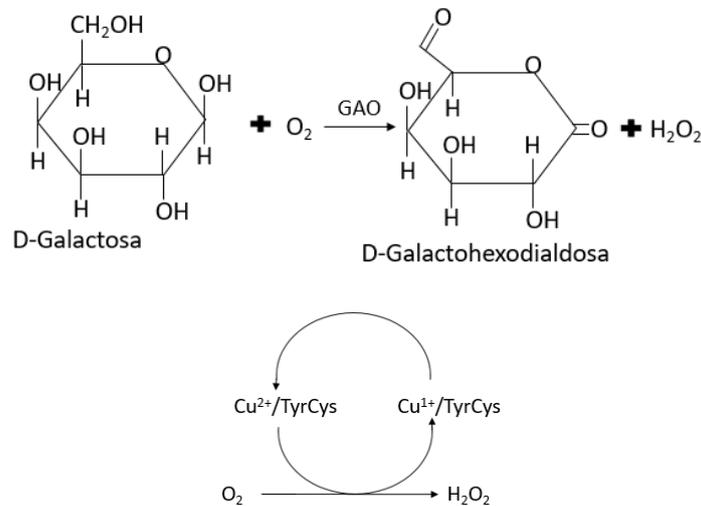


Figura 10. Mecanismo de reacción de la enzima galactosa-oxidasa (GAO).

GAO consiste en un polipéptido con masa molecular de 68,5 kDa (639 aminoácidos) que se emplea en la preparación de biosensores por su buena estabilidad, reproducibilidad y capacidad anti-interferencia [39]. Su pH óptimo tiene valor 7. Su actividad enzimática es inhibida de manera instantánea con dietilditiocarbamato y de forma más lenta por el anión cianuro, con aminas o con algunos carboxilatos [44].

2.1.2.1.1.1. Inmovilización de enzimas

El empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales porque no son reutilizables ni estables en las condiciones de trabajo, pero con su inmovilización se pueden solventar estos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable y los sensores sean estables [29].

Las enzimas se unen covalentemente al soporte a través de los grupos funcionales enzimáticos [25], sin embargo, la inmovilización de enzimas conduce a una pérdida de actividad y a la heterogeneidad del sistema soporte-enzima [29] debido al bloqueo del sitio activo o por cambios en la geometría de la enzima al final del procedimiento de acoplamiento [25].



Con la adición de un sustrato o un inhibidor competitivo a la mezcla de acoplamiento, que protege el sitio activo de la enzima contra la pérdida de actividad [25], se consigue una correcta inmovilización de la enzima y la conservación de la actividad biocatalítica en el reconocimiento específico de los elementos durante la transferencia de electrones del proceso redox que envuelve al analito [29].

Una combinación de la enzima inmovilizada tratada con métodos electroquímicos proporciona una técnica rápida y fiable para estudiar la cinética de reacción catalizada por las enzimas y determinar la concentración de sustrato [39].

Entre los métodos de inmovilización de enzimas se distinguen dos grandes grupos [46]:

- **Retención física o atrapamiento:**

Se trata de un método sencillo basado en la localización de la enzima dentro de una matriz polimérica o membrana evitando la liberación de proteína y permitiendo la penetración de sustrato. Requiere poca cantidad de enzima y la estructura no se ve alterada.

Se emplean para atrapamientos en matrices (geles o polímeros y micelas) y en membranas (fibras), siendo estas últimas las más resistentes.

- **Retención química:**

1. *Unión a soportes:*

Es el método de inmovilización más utilizado para unir una enzima a un soporte.

Pueden ser soportes orgánicos (polímeros naturales como polisacáridos y proteínas fibrosas o polímeros sintéticos como los polímeros acrílicos y poliamidas) o inorgánicos (naturales o materiales manufacturados).

Esta unión puede llevarse a cabo mediante:

-*Unión covalente:* basada en la activación de grupos iónicos, metálicos o covalentes del soporte que reaccionan con los grupos nucleófilos de las proteínas.



Su manipulación es sencilla, y su resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura o el pH es elevada, aunque requiere la presencia de un inhibidor para bloquear el centro activo.

-*Adsorción*: para enlaces no covalentes si la enzima se une por interacciones débiles como fuerzas de van der Waals o por puentes de hidrógeno.

Su preparación es sencilla y de bajo coste, pero presenta una unión débil con el soporte. Se deben controlar el pH del medio, la fuerza iónica y el diámetro del poro.

-*Reticulado, entrecruzamiento o cross-linking*: emplea reactivos multifuncionales que originan uniones intermoleculares irreversibles entre los grupos funcionales moleculares presentes en la enzima, provocando entrecruzamientos tridimensionales.

Es un método sencillo con elevada reproducibilidad, estabilidad y resistencia a condiciones extremas de pH y temperatura.

En este proyecto se inmovilizaron las enzimas GOD y GAO a partir de la retención química mediante *cross-linking* con vapores de glutaraldeído, por su elevada reproducibilidad y estabilidad a pesar de la disminución de la actividad catalítica como consecuencia de su inmovilización [25].

2.1.2.1.2. Sistema multisensor: *lengua electrónica*

El aumento de exigencias en algunos parámetros como la calidad e inocuidad de los alimentos, así como la necesidad de mantener la uniformidad, garantizar la frescura y evitar alteraciones en los productos lácteos, ha dado como resultado la aparición de nuevas técnicas para su control más exhaustivo. Sin embargo, estas técnicas requieren equipos sofisticados y personal cualificado. Debido a estas limitaciones, se han desarrollado métodos alternativos basados en sistemas multisensoriales, como las *lenguas electrónicas*, que imitan el funcionamiento del sistema gustativo humano [47].

Las lenguas electrónicas, sistemas de detección artificial, son capaces de determinar la composición cuantitativa y reconocer (identificar, clasificar y discriminar) los



diferentes matices en los sabores de los alimentos, a través del análisis electroquímico de las muestras de interés, ofreciendo información característica que se utiliza para obtener una percepción global de las propiedades gustativas del producto [47].

Estas medidas electroquímicas realizadas con lenguas electrónicas generan un amplio volumen de datos; que se tratan mediante técnicas quimiométricas (transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información mediante métodos matemáticos y estadísticos) como el Análisis de Componentes Principales (PCA) y la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) [47] y se emplean para discriminar muestras y establecer correlaciones entre las medidas experimentales y los análisis químicos.

En este proyecto se construyó una lengua electrónica a partir de la red de sensores formados por las secuencias $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}$, $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}/\text{GOD}$ y $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}/\text{GAO}$ para discriminar entre diferentes variedades de leche enteras con lactosa (CLU y PEÑA) y semidesnatadas sin lactosa (COVA y PONFE).

2.1.2.2. Caracterización de sensores

La caracterización de sensores es una herramienta fundamental para estudiar la influencia de las capas nanoestructuradas sobre las que se depositó la enzima en el electrodo, así como su funcionalidad [20]. Las técnicas más habituales en nuestro laboratorio son la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) o la Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

2.1.2.2.1. Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

La región del infrarrojo comprende la radiación con longitudes de onda entre 0,78 y 1000 μm [48] distinguiéndose tres regiones características, infrarrojo *lejano* (entre 50 y 1000 μm), *medio* (de 2,5 a 50 μm) y *cercano* (entre 0,78 y 2,5 μm). Este parámetro depende de la identidad de los átomos de la molécula, la estructura molecular y el enlace entre átomos [49] y, por tanto, condiciona el espectro final obtenido.



Esta técnica se basa en el estudio de las vibraciones características de los enlaces moleculares [49] y genera señales (espectros) que representan la “huella” molecular de la muestra en función de la relación de radiación absorbida/atrayada del haz de luz que incide sobre la muestra de interés. Se puede medir sobre un cristal de diamante, ZnS o ZnSe entre otros.

Este método tiene las ventajas de no ser destructivo, ser selectivo, la sencilla preparación de muestras para analizar y la rapidez del procedimiento, su accesibilidad, pero también presenta las desventajas de que sus mediciones se ven influenciadas por la presencia de agua, incrementando su sensibilidad.

Sus aplicaciones difieren en función de la región espectral de trabajo, permitiendo en nuestro caso, caracterizar las películas sensibles.

2.1.2.2.2. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Visible)

La espectroscopía de absorción de la radiación electromagnética que comprende una región de longitudes de onda entre 160 y 780 nm recibe el nombre de espectroscopía UV-Vis [48].

Este método se basa en la absorción de un haz de radiación monocromática ultravioleta y visible cuando atraviesa el analito presente en una disolución, originando la absorción de fotones por parte de los electrones de la molécula, que provocan su paso a niveles excitados de mayor energía que elimina su exceso de energía en forma de calor [48].

Sus parámetros característicos son la *transmitancia* (fracción de radiación incidente que atraviesa la muestra) y la *absorbancia* (fracción de radiación incidente absorbida por el analito) y la concentración de analito absorbente de interés está relacionada linealmente con la absorbancia según la **Ley de Beer-Lambert** [48]:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Ecuación 3. Ecuación de Beer-Lambert.



Donde:

A: Absorbancia.

T: Transmitancia.

P_0 : Potencia del haz incidente.

P: Potencia del haz en la salida.

ϵ : Absortividad molar.

b: Camino óptico

Es una de las técnicas de análisis cuantitativo más comunes empleada para la identificación y determinación de múltiples especies inorgánicas y orgánicas por su gran aplicabilidad, sensibilidad y selectividad características, así como buena precisión, pero sus aplicaciones están limitadas porque no proporciona información totalmente fiable para un único compuesto orgánico pese a su capacidad para detectar ciertos grupos funcionales cromóforos [48].

Para llevar a cabo la espectroscopía UV-visible se suelen utilizar celdas o cubetas que colocan la muestra en el haz del espectrómetro. Estos recipientes utilizados para depositar las muestras deben ser de un material que permita el paso de radiación de la región espectral de interés, empleándose cuarzo o sílice fundida en la región ultravioleta y plástico o vidrio para longitudes de onda visibles [49].

2.1.2.3. Electroquímica

La química electroanalítica engloba el conjunto de métodos analíticos cuantitativos basados en las propiedades eléctricas del analito en una disolución [48], según la **ecuación de Nerst** [49], cuando forma parte de una celda electroquímica:



$$E = E^0 - \frac{R' T}{n' F} \ln K$$

Ecuación 4. Ecuación de Nerst.

Donde:

E: Potencial electroquímico.

E^0 : Potencial estándar. Potencial electroquímico cuando tanto productos como reactivos se encuentran en condiciones estándar.

R: Constante de los gases ideales.

T: Temperatura.

n: Número de electrones transferidos por cada mol en la reacción.

F: Constante de Faraday.

K: Constante de equilibrio termodinámica.

Los métodos electroquímicos son útiles para el control continuo de un proceso, proporcionando medidas específicas para un determinado estado de oxidación y aportando además información sobre la concentración de las especies. Requiere instrumentación sencilla y económica [48] aunque presentan el gran inconveniente de poseer muchas interferencias que afectan a la medida.

Las reacciones electroquímicas de oxidación y reducción que sufre el analito bajo la acción de una fuente eléctrica, se conocen como reacciones redox y tienen lugar en una celda electroquímica donde se aplica un potencial o corriente eléctrica cuya variación es lineal con el tiempo, entre un electrodo de trabajo y otro de referencia.

Una celda electroquímica está formada por dos electrodos (electrodo de trabajo y otro de referencia) o de tres electrodos (si además incluye un electrodo auxiliar), que se encuentran inmersos en la disolución electrolítica, conectados externamente a un potencióstato, en la que tiene lugar la reacción de transferencia de electrones entre los electrodos [48], siendo más habituales los sistemas de tres electrodos por su capacidad de corrección de la caída de resistencia eléctrica derivada del montaje de la célula. Los instrumentos necesarios para la obtención de medidas potenciométricas que componen una celda electroquímica son:

Electrodo indicador o de trabajo (ET): sobre el cual se aplica un potencial o intensidad de corriente variable.

Electrodo auxiliar o contraelectrodo (EA): hace referencia al electrodo por el que circula toda la corriente eléctrica necesaria para equilibrar el flujo de corriente presente en el electrodo de trabajo, es decir, su cometido consiste en cerrar el circuito de la celda electroquímica y suele ser un electrodo de platino [48].

Electrodo de referencia (ER): mide el potencial del electrodo de trabajo, siendo el valor que se le aplica constante durante la medida. El electrodo de referencia por excelencia es el *de hidrógeno (SHE)*, pero su preparación y control de la actividad de los reactivos son complicadas por lo que no son muy utilizados en la práctica [48]. En cambio, los más habituales por su fácil uso, preparación y robustez [48] son *electrodos de calomelanos (ECS)* o *electrodos de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl)*.

El más común, el electrodo de plata-cloruro de plata, está formado por un hilo de plata sumergido en una disolución de cloruro de potasio y saturada con cloruro de plata [48], y aunque es estable a los cambios de temperatura, presenta el inconveniente de que es muy sensible a la luz [49].

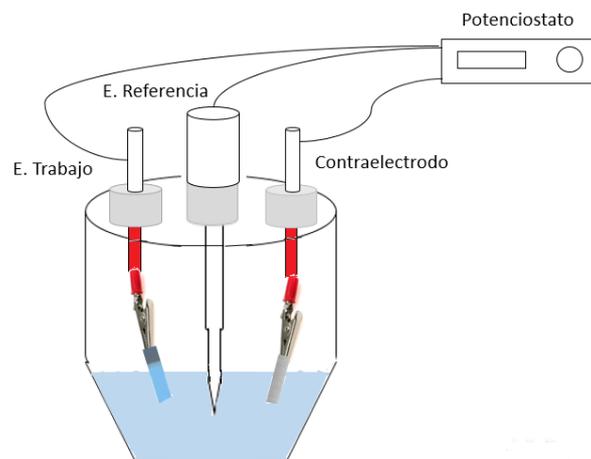


Figura 11. Célula electroquímica de tres electrodos.

En función de la variable de medida en el proceso electroquímico (potencial, intensidad de corriente, carga y tiempo), se distinguen los *métodos potenciométricos*, que miden



el potencial, los *métodos conductimétricos*, que determinan la conductancia (inversa de la resistencia) siguiendo la ley de Ohm, los métodos *culombimétricos*, que relacionan los moles oxidados/reducidos del analito con su carga, los métodos *electrogravimétricos*, responsables de la cuantificación en la variación de masa y los métodos *voltamperimétricos*, que combinan la medida de intensidad y potencial de manera simultánea en el tiempo. Con estos métodos se observan los cambios de intensidad en el tiempo con función del potencial aplicado en la célula electroquímica [49].

A continuación, se describen las técnicas de interés empleadas en este trabajo de investigación [48]:

2.1.2.3.1. Voltamperometría

La voltamperometría se basa en la medida de la intensidad de corriente que tiene lugar en una célula electroquímica en función del potencial aplicado, en condiciones que favorecen la polarización del electrodo de trabajo [48].

Esta técnica es muy utilizada en el estudio básico de procesos de oxidación y reducción en diferentes medios, procesos de absorción sobre superficies y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados [48].

En función de la relación voltaje-tiempo (señal de excitación), que provoca una respuesta de intensidad de corriente y origina un voltamograma característico, se distinguen la *voltamperometría de barrido lineal* (cuando el potencial cambia linealmente en el electrodo de trabajo), la *voltamperometría de impulso diferencial* (en la cual la señal de barrido varía en forma de escalones y la amplitud se conserva constante), la *voltamperometría de onda cuadrada* (si sobre el electrodo de trabajo se aplica un potencial constante en el tiempo) y la voltametría cíclica, la cual se detalla a continuación [48].

2.1.2.3.1.1. Voltametría Cíclica

Es un método electroquímico donde la variación de corriente en el electrodo de trabajo está provocada por una señal de potencial de forma triangular [48].

Esta técnica ha sido empleada en este trabajo de investigación, por su rapidez en el estudio del comportamiento redox de los analitos de interés, con los límites fijados por la electrólisis del disolvente y la descomposición del electrodo [49].

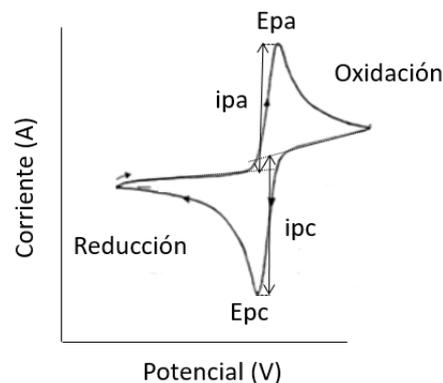


Figura 12. Voltamograma cíclico curva intensidad-voltaje de la especie de interés.

Los parámetros de interés en un voltamograma son el potencial de pico catódico E_{pc} , el potencial de pico anódico E_{pa} , la intensidad de corriente del pico catódico i_{pc} y la intensidad de corriente del pico anódico i_{pa} como se muestran en la *figura 12*.

El barrido cíclico de un voltamograma comienza a un cierto potencial (normalmente cero) y se dirige a potenciales más positivos (barrido positivo) provocando la oxidación del analito y alcanzando el pico anódico E_{pa} , después, el barrido se invierte (barrido negativo) produciéndose un pico catódico E_{pc} que se origina por la reducción de la especie oxidada. La magnitud de la intensidad de los picos está directamente relacionada con la concentración de las especies electroactivas presentes [49]. La existencia de más de un pico en alguna de las zonas es indicativa de la presencia de compuestos intermedios capaces de oxidarse y reducirse [48].



Para una reacción reversible, las corrientes de pico catódica y anódica tienen el mismo valor con sentidos contrarios (las concentraciones de las distintas especies en la superficie del electrodo cumplen la ley de Nernst) y la diferencia entre los potenciales de pico es $0,0592/n$ siendo n el número de electrones en juego en la reacción, [48] mientras que si la reacción es irreversible, el potencial de pico es función de la velocidad de barrido y los picos se encuentran más separados [49]. A partir de la ecuación de **Randles-Sevcik** se obtiene información cuantitativa sobre la concentración y el coeficiente de difusión del analito:

Sistema reversible (a 25°C):

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{D \cdot v}$$

Ecuación 5. Ecuación de Randles-Sevcik para procesos reversibles.

Donde:

i_p : Intensidad de corriente del pico.

n : Número de electrones transferidos entre los electrodos.

A : Área superficial del electrodo.

C : Concentración del analito.

D : Coeficiente de difusión.

v : Velocidad de barrido.

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Ecuación 6. Potencial de un proceso reversible.

Sistema irreversible (a 25°C):

$$i_p = (2,99 \cdot 10^5) \cdot n \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{\alpha \cdot D \cdot v}$$

Ecuación 7. Ecuación de Randles-Sevcik para procesos irreversibles.

Donde α es el coeficiente de transferencia.



$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n F} \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n F v}{RT} \right)^{1/2} \right]$$

Ecuación 8. Potencial de un proceso irreversible.

La principal aplicación de la voltametría cíclica es su uso en estudios para obtener información cualitativa de las velocidades y mecanismos de reacción de los procesos redox y para sistemas orgánicos y organometálicos [48].

2.1.2.3.1.2. Cronoamperometría

La cronoamperometría se basa en la aplicación de pulsos de potencial sobre el electrodo de trabajo, suficiente para que tenga lugar la reacción electroquímica, desde un valor en donde no ocurre ninguna interacción hasta un potencial en donde la concentración superficial de los analitos electroactivos es nulo [50] y así evaluar la corriente que circula por el electrodo frente al tiempo [49].

Si se representa la intensidad de corriente frente al tiempo para una solución sin agitación y un electrodo de trabajo plano y estacionario, [49] en la zona de potenciales dominados por el término difusivo, la representación de la curva corriente frente al tiempo evidencia la variación del gradiente de concentración en la superficie, y por tanto, la caída de corriente con el tiempo dada por la **ecuación de Cottrell** [51]:

$$i(t) = \frac{nFACD}{(\pi Dt)^{1/2}}$$

Ecuación 9. Ecuación Cottrell.

Esta técnica se emplea con frecuencia en la determinación de coeficientes de difusión, parámetros cinéticos, límites de detección y mecanismos [51] a partir de la pendiente de la curva corriente-tiempo, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$y = m \cdot x + n$$

Ecuación 10. Recta de calibración de un instrumento.



Dónde m es la pendiente de la recta, que corresponde a la sensibilidad analítica y representa la concentración del analito presente en la disolución.

El límite de detección, según la *Sociedad Química Americana* se define como “la concentración más baja de analito que el proceso analítico puede detectar de forma fiable” y es una aproximación estadística que depende de los efectos de fondo, la sensibilidad del instrumento al analito y la relación señal-ruido (S/R), y tiene la forma:

$$LD = \frac{3 \cdot \sigma}{m}$$

Ecuación 11. Límite de detección.

Dónde σ es la desviación estándar de las medidas del blanco [49].

2.1.3. Tratamiento estadístico de datos multivariante

2.1.3.1. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El Análisis de Componentes Principales (PCA), que fue desarrollado a finales del siglo XIX, es una técnica estadística descriptiva de síntesis de la información, o reducción del número de variables, evitando en la medida de lo posible la pérdida de información, donde los componentes principales o factores resultantes son una combinación lineal de las variables iniciales e independientes entre sí.

Este proceso se realiza en cinco etapas, una fase inicial, que consiste en el *análisis de la matriz de correlaciones* entre las variables, una segunda fase, en la que se *seleccionan los factores*, de tal forma que las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y se van creando en orden decreciente de variabilidad de la muestra, un tercer paso, basado en el *análisis de la matriz factorial*, donde se representan los componentes principales en forma de matriz, una posterior *interpretación de los factores*, que deben estar en torno a la unidad y un *cálculo final de las puntuaciones factoriales*, que permitirán la representación gráfica [52].



2.1.3.2. Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1)

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se usa para extraer los factores, recogiendo la variación de los factores reales de forma que se cree un modelo predictivo que se utilice para modelar las variables respuesta de la mejor manera posible. Se denomina regresión (PLS-1) cuando se estudia una sola variable con X variables explicativas.

El modelo predictivo creado es el encargado de correlacionar las rectas de calibración, que sirve para ajustar el modelo a los datos medidos y la recta de validación, que ajusta el modelo para los nuevos datos (variables respuesta).



2.2. Reactivos, materiales y equipos empleados

2.2.1. Reactivos y materiales

- Ácido acético (CH_3COOH , pureza >99,7%, Panreac).
- Agua desionizada Milli-Q de conductividad 18,2 M Ω cm.
- Alpha-D (+)-Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, pureza >99%, Sigma-Aldrich).
- Celda electroquímica (50 mL, Princeton Applied Research).
- Chitosán, CHI ($\text{C}_5\text{H}_{103}\text{N}_9\text{O}_{39}$, Sigma-Aldrich).
- Contraelectrodo: placa de Platino.
- D (+) Galactosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, pureza >99%, Amresco).
- Dihidrogenofosfato sódico (NaH_2PO_4 , pureza >99%, Sigma-Aldrich).
- Enzima glucosa-oxidasa GOD (obtenida de *Aspergillus niger*, 168400 u/g sólido, Sigma-Aldrich).
- Enzima galactosa-oxidasa GAO (obtenida de *Dactylium dendroides*, 3685 u/g sólido, Sigma-Aldrich).
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl, Nesslab).
- Ferricianuro de potasio (III) ($\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$, pureza 99%, Sigma-Aldrich).
- Ferrocianuro de potasio (II) ($\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pureza 99,99%, Sigma-Aldrich).
- Ftalocianina de cobre tetrasulfonada ($\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$, Sigma-Aldrich).
- Glutaraldehído ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$, 50% en disolución acuosa, Alta Aesar).
- Hidrogenofosfato sódico (Na_2HPO_4 , pureza >99%, Sigma-Aldrich).
- Líquido iónico, LI (1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, pureza 98%, Sigma-Aldrich).



-Muestras de leche:

- 2 variedades de leche entera con lactosa (CLU y PEÑA).
- 2 variedades de leche semidesnatada sin lactosa (COVA y PONFE).

-Sustrato de ITO (Óxido de estaño e indio).

-Sustrato de cuarzo.

-Sustrato de sulfuro de zinc (Cleartran ZnS, Disc. 32 x 2mm, Spectra-Tech Inc).

2.2.2. Equipos

-Espectrofotómetro modelo FT/IR 6600 (Jasco Corporation, Japón).

-Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japón).

-ND-R 11/2 Rotary Dip Coater (Nadetech Innovations, España).

-pHmetro (Crison, España).

-Potenciostato/Galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research).

-Ultrasonidos Vortex 3 (IKA, USA).



2.3. Desarrollo experimental

2.3.1. Acondicionamiento del sensor electroquímico

2.3.1.1. Preparación de disoluciones

Se han empleado las siguientes disoluciones para la formación de bicapas depositadas electrostáticamente sobre el electrodo de vidrio que contiene una cara conductora compuesta por un sustrato de ITO:

- Chitosán (CHI):

Se disolvieron 0,05 mg de CHI en un matraz aforado de 25 mL con CH_3COOH 0,03 %v/v, resultando una disolución con una concentración 2 mM.

- Ácido acético 0,03 %v/v (CH_3COOH):

Se preparó una disolución madre de CH_3COOH 3 %v/v a partir de 1,5 mL de CH_3COOH puro en un matraz aforado de 50 mL utilizando agua desionizada Milli-Q.

A continuación, se extrajeron 5 mL de esta disolución y se diluyeron en un matraz de 50 mL con agua desionizada Milli-Q obteniéndose una disolución de CH_3COOH de concentración 0,03 %v/v.

- Líquido iónico (LI):

Se obtuvo una disolución de LI 2 mM a partir de 40 μL de LI enrasados con agua desionizada Milli-Q en un matraz aforado de 100 mL.

- Ftalocianina de cobre tetrasulfonada ($\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$):

Inicialmente se preparó una disolución madre de concentración $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ disolviendo 6,25 mg de $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ en un matraz de 25 mL con agua desionizada Milli-Q.



Se tomaron 5 mL de la disolución madre y se enrasaron en un matraz de 25 mL con agua desionizada Milli-Q, resultando una disolución de concentración $5 \cdot 10^{-5}$ M.

- Glutaraldehído 2,5% w/w ($C_5H_8O_2$):

Los vapores de glutaraldehído se emplearon para inmovilizar las enzimas mediante “cross-linking” a través de la exposición de los sensores a dichos vapores tras la deposición electrostática de bicapas.

Esta disolución se preparó adicionando 9 mL de glutaraldehído comercial diluido al 50% en un matraz de 200 mL de $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ a pH 7 y alicuotando esta disolución final en frascos de pequeñas cantidades.

A continuación, se comentan las disoluciones que se emplearon en el análisis electroquímico mediante voltametría cíclica y cronoamperometría para detectar los polisacáridos de interés:

- Disoluciones tampón fosfato ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$):

La disolución amortiguadora de concentración 0,01M y pH 7, se obtuvo disolviendo 0,7318 g de NaH_2PO_4 y 0,5393 g de Na_2HPO_4 en un matraz de 1000 mL con agua desionizada Mili-Q, mientras que la disolución tampón de concentración 0,01M a pH 5,6 se preparó a partir de 1,18 g de NaH_2PO_4 y 0,028 g de Na_2HPO_4 disueltos en un matraz aforado de 1000 mL con agua desionizada Mili-Q.

Estas disoluciones se prepararon utilizando la siguiente ecuación, conocido su pKa:

$$pH = pKa + \frac{[Na_2HPO_4]}{[NaH_2PO_4]}$$

Ecuación 12. Ecuación de Henderson-Hasselbalch.



- Disoluciones de glucosa y galactosa (disoluciones patrón):

Se prepararon dos disoluciones de glucosa de concentración 10^{-4} M para pH 5,6 y pH 7 de la disolución tampón fosfato, empleando como electrodo de trabajo el sensor basado en la enzima GOD para la detección de glucosa.

Se siguió el mismo procedimiento para la preparación de la disolución de galactosa, empleando el sensor basado en la enzima GAO para la detección de dicho monosacárido.

- Disolución de ferrocianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-13}$):

La disolución empleada se obtuvo a partir de una mezcla de $\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mM y $(\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6])$ 5 mM como soluto con KCl 0,1 M como disolvente.

2.3.1.2. Preparación de las enzimas GOD y GAO

Para la preparación de ambas enzimas se siguió el mismo protocolo. Se emplearon 0,005 g de la enzima correspondiente sobre un eppendorf sobre la que se adicionó 1 mL de la disolución tampón al pH de interés, obteniéndose una concentración de 5 mg/mL. Una vez disuelta la enzima en la disolución amortiguadora, se prepararon alícuotas que se almacenaron en el congelador para conservar sus propiedades y actividad hasta su utilización.

2.3.1.3. Procedimiento experimental. Autoensamblado multicapa e inmovilización de enzimas

El montaje del equipo consistió en la colocación de cuatro vasos de precipitados de 5 mL que contenían las disoluciones preparadas, según la secuencia programada mediante el software *ND-R Coater*, como se muestra en la siguiente figura:

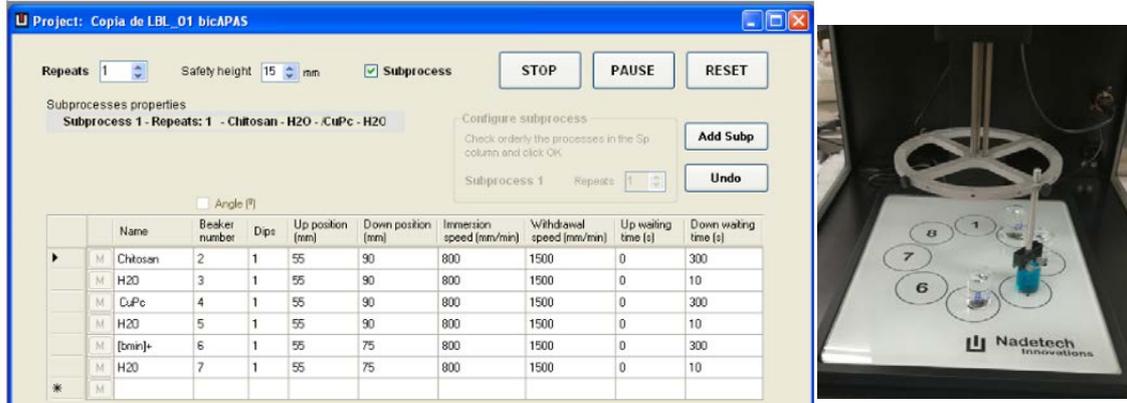


Figura 13. ND-R Procedure y equipo ND-R 11/2 Rotary Dip Coater.

El funcionamiento del equipo empleado para el crecimiento de las capas por adsorción electrostática, consistió en la inmersión de un soporte que portaba dos ITOs con las caras conductoras contrapuestas un cierto tiempo y de forma secuencial en las disoluciones con cargas opuestas.

En primer lugar, se sumergió el sustrato 300 segundos en un vaso de precipitados formado por una disolución con carga positiva de una mezcla de CHI y LI en proporción 1:1, a continuación, se introdujo el ITO durante 10 segundos en el vaso de agua desionizada Milli-Q para su lavado y evitar así el arrastre de impurezas, posteriormente, se procedió con la inmersión del sustrato en el vaso de $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ cargado negativamente y finalmente se lavó de nuevo con agua. Este proceso se repite tantas veces como número de bicapas se deseen hacer crecer, en nuestro caso, fueron dos veces, siguiendo la secuencia (CHI+IL/ $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$).

Después del crecimiento de las bicapas, el sensor fue sumergido para su lavado y acondicionamiento durante 2 minutos en la disolución tampón fosfato, a pH de interés y una vez seco, se depositaron 5 μL de enzima, de concentración 5 mg/mL, extendiéndola con ayuda de una micropipeta sobre la cara conductora del sensor dejándolo en reposo hasta su secado al aire y posteriormente se procedió con la etapa de inmovilización exponiendo el sensor a vapores de glutaraldehído durante 20 minutos.



Tras la inmovilización de la enzima y su secado al aire, se lavó de nuevo durante 30 segundos en la disolución tampón fosfato a su pH correspondiente para eliminar las impurezas adheridas y acondicionar el medio.

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo sobre los biosensores CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD y CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO, así como sobre el sensor formado exclusivamente por las bicapas (CHI+IL/CuPc^{SO3}), para estudiar el comportamiento electroquímico tras cada modificación.

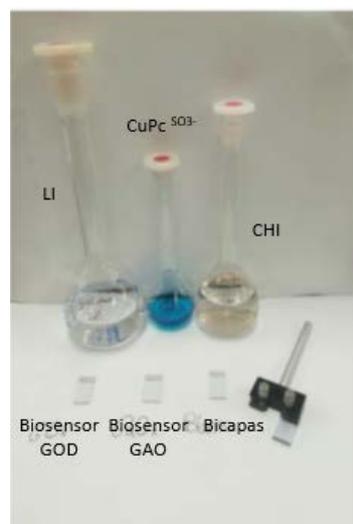


Figura 14. Reactivos y materiales empleados en LbL.

2.3.2. Caracterización del sensor

Para controlar la calidad y la adhesión de las películas nanoestructuradas sobre el sensor, se emplearon técnicas como la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Visible).

2.3.2.1. Espectroscopía FTIR



El control del crecimiento de las bicapas mediante espectroscopía FTIR se llevó a cabo con la herramienta software *Spectragryph 1.1* empleando sustratos de ZnS por ser transparente a la radiación de infrarrojo, sobre el que se hicieron crecer linealmente 32 bicapas y cuyo espectro fue analizado cada 4 bicapas.

Se realizaron 1000 escaneos tanto para la medición del blanco (ZnS sin bicapas adheridas), como para el sustrato con el número creciente de bicapas, analizando un rango de longitud de onda entre 2000 y 800 nm, con resolución de 4 cm^{-1} .



Figura 15. Espectrofotómetro modelo FT/IR 6600.

2.3.2.2. Espectroscopía UV-Visible

La caracterización de las capas formadas mediante espectroscopía UV-Visible, se llevó a cabo con el software *UV-Probe* utilizando sustratos de cuarzo por ser transparente a la radiación ultravioleta y estableciendo la línea base en la región de longitudes de onda entre 200 y 800 nm.

Se siguió el mismo procedimiento que el realizado con la espectroscopía FTIR, con el fin de evaluar la influencia lineal del número de capas formadas sobre el sensor en términos de absorbancia formándose 32 bicapas y analizando cada 4 bicapas el espectro obtenido.



Figura 16. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600.

2.3.3. Estudio electroquímico

2.3.3.1. Detección de glucosa y galactosa. Voltametría Cíclica

Para llevar a cabo las mediciones electroquímicas se utilizó una celda electroquímica de 50 mL de capacidad, con tres electrodos: uno de trabajo, formado por las bicapas y/o la enzima sobre el ITO, uno de referencia (Ag/AgCl), y una placa de platino como contraelectrodo, con la que se cerró el circuito.

Las propiedades de transferencia de electrones de los sistemas redox en diferentes disoluciones glucosa o galactosa tampón fosfato con (muestras patrón) y en leche bovina entera y semidesnatada se estudiaron mediante voltametría cíclica [53].



Figura 17. Celda electroquímica de trabajo.



2.3.3.1.1. En muestras patrón

Tras la preparación de las disoluciones de interés de glucosa y galactosa y los sensores, (apartados 2.3.1.1 *Preparación de disoluciones* y 2.3.1.3 *Procedimiento experimental respectivamente*), se inició al análisis electroquímico empleando la voltametría cíclica como técnica de trabajo.

La detección de los monosacáridos glucosa y galactosa se llevó a cabo en una celda electroquímica sobre la que se vertieron inicialmente 40 mL de la disolución patrón correspondiente a pH 5,6 o pH 7 y en la que se sumergieron para su medida, los sensores formado exclusivamente por bicapas y posteriormente los biosensores CHI+IL/CuPc^{SO3} /GOD y CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO, aplicando los parámetros de trabajo detallados a continuación:

- tcond (s): tiempo de acondicionamiento. 5 s.
- Start potential (V): potencial inicial. 0 V.
- Upper vertex potential (V): Potencial máximo en el pico de oxidación. 1,2 V.
- Lower vertex potential (V): Potencial mínimo en el pico de reducción. -0,8 V.
- Number of stop crossings: Número de ciclos. 10.
- Step potential (V): Paso de potencial. 0,0244.
- Scan Rate (V/s): Velocidad de barrido. 0,1.

2.3.3.1.2. En un medio complejo

Tras el análisis electroquímico de los biosensores enzimáticos CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD y CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO en las muestras patrón, se estudió el comportamiento de dichos biosensores en un medio complejo, la leche, sobre dos variedades de leche entera con lactosa (CLU y PEÑA) y dos variedades de leche semidesnatada sin lactosa (COVA Y PONFE).



Estas medidas electroquímicas se llevaron a cabo para muestras tomadas directamente del Tetra-Brick, a temperatura ambiente, o modificadas con ferrocianuro, por ser un buen mediador electrónico, para mejorar la transferencia electrónica e intensificar las señales de los picos de oxidación y reducción de las reacciones redox que tienen lugar en la celda electroquímica, la cual contenía 40 mL de leche.

Para la detección de glucosa, se utilizó el electrodo que contenía la enzima GOD y la detección de galactosa se realizó con el electrodo basado en la enzima GAO.

Se evaluaron los sensores para dos sesiones diferentes (el día que se abrió el Tetra-Brick y tras cuatro días conservada a temperatura ambiente) con el objetivo de estudiar la degradación y las alteraciones producidas en la leche con el paso del tiempo. Se siguieron los parámetros mencionados a continuación:

- tcond (s): tiempo de acondicionamiento. 5 s.
- Start potential (V): potencial inicial. 0 V.
- Upper vertex potential (V): Potencial máximo en el pico de oxidación. 1,2 V.
- Lower vertex potential (V): Potencial mínimo en el pico de reducción. -0,8 V.
- Number of stop crossings: Número de ciclos. 10.
- Step potential (V): Paso de potencial. 0,0244.
- Scan Rate (V/s): Velocidad de barrido. 0,1.

2.3.3.2. Estudio de los límites de detección. Cronoamperometría

Se recurrió a la cronoamperometría para evaluar los límites de detección de los sensores preparados, es decir, para conocer la menor concentración de analito que el sensor era capaz de detectar, determinando así, su sensibilidad.



El método seguido, se basó en la imposición continua de un valor de potencial, dependiente de la posición donde tenían lugar las reacciones de reducción y oxidación, donde, tras fijar dicho parámetro, se estudió la intensidad de corriente que atraviesa el electrodo frente al tiempo, con adiciones sucesivas y constantes en el tiempo (cada 100 segundos) de 1 mL de la disolución patrón de interés (glucosa o galactosa) sobre la celda de trabajo que contenía previamente 40 mL de disolución tampón fosfato 0,01M.

Este proceso se llevó a cabo para el análisis del pico de reducción, como se muestra en la siguiente tabla, tanto para los sensores CHI+IL/CuPc^{SO3}, como para los biosensores CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD y CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO.

Los valores obtenidos tras cada adición, sirvieron para elaborar la recta de calibrado, a través de la cual se obtuvo la sensibilidad analítica (*Ec.10.*), que, junto con la desviación estándar de cinco valores para las medidas del blanco, se determinó el límite de

Concentración/ Potencial	Blanco en glucosa (bicapas)	Blanco en galactosa (bicapas)	Biosensor en Glucosa 10 ⁻⁴ M	Biosensor en Galactosa 10 ⁻⁴ M
Reducción (V)	-0.8	-0.8	-0.8	-0.12

detección (LOD), según la *Ec.11.*

Tabla 1. Potenciales aplicados sobre la celda electroquímica.

2.3.4. Tratamiento estadístico de datos multivariante

Los resultados obtenidos de las mediciones llevadas a cabo mediante espectroscopía FTIR, espectroscopía UV-Vis, voltametría cíclica y cronoamperometría se trataron y representaron gráficamente mediante el software *Origin Pro v8* y a su vez, la corrección de la línea base para las técnicas espectroscópicas se realizó con ayuda del programa *Spectragryph versión 1.1.1.2.*

Nuestro sistema multisensor se construyó utilizando una red de tres sensores (CHI+IL/CuPc^{SO3}, CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD y CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO). Los sensores se



introdujeron en las cuatro muestras de leche (CLU, PEÑA enteras con lactosa y COVA y PONFE semidesnatadas sin lactosa) y se realizó el análisis electroquímico. Esas respuestas voltamétricas obtenidas se trataron estadísticamente, destacando el Análisis de Componentes Principales (PCA) y la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1).

El análisis PCA consistió en el preprocesamiento de los resultados obtenidos del análisis electroquímico y la posterior normalización de esos datos. A través de ese procedimiento, se consiguió reducir el número de datos hasta 10 variables denominadas “*kernels*” para cada sensor con el software *Matlab v2014 b* para discriminar muestras de leche en función de su contenido en lactosa y monitorizar la evolución temporal de las muestras. El análisis PCA se realizó para las dos sesiones de medida (el día que se abrieron los Tetra-Brick y tras cuatro días expuestos a temperatura ambiente).

La herramienta PLS-1, se realizó a partir de los kernels seleccionados para el análisis PCA y se destinó para establecer correlaciones con el software *The Unscrambler* entre los datos resultantes del análisis químico con los resultados obtenidos experimentalmente a través de la PCA en el laboratorio para la primera sesión de medida.



2.4. Resultados experimentales

2.4.1. Estudio del crecimiento de bicapas

El trabajo comenzó con la preparación de películas LbL alternando capas de materiales cargados positivamente y materiales cargados negativamente. Así se depositaron multicapas de CHI+IL/CuPc^{SO3} sobre ITO, mediante la técnica LbL. La calidad del crecimiento se monitorizó mediante espectroscopía Infrarroja y Ultravioleta-Visible.

2.4.1.1. Análisis por Espectroscopía FTIR

La espectroscopía FTIR se utilizó para evaluar la adsorción apropiada de las películas nanoestructuradas depositadas sobre un sustrato de ZnS. Se evaluó la región infrarroja correspondiente al intervalo de longitudes de onda entre 2000 y 800 cm^{-1} , identificando los grupos funcionales de las moléculas que se emplearon en la formación de las películas en función de las bandas de absorción.

La *figura 18 a* mostró el pico característico de CHI entre 1000 y 1200 cm^{-1} fruto de la vibración del esqueleto de los anillos del polisacárido, apareciendo bandas en torno a 1480 cm^{-1} correspondientes a los enlaces C-H-OH, el pico de la amina apareció en 1550 cm^{-1} debido a la vibración de los enlaces N-H de la amida y crecieron bandas alrededor de 1580 y 1650 cm^{-1} como consecuencia del estiramiento del enlace C=O [38].

El espectro reveló por un lado, los picos característicos de LI en la banda 750 cm^{-1} correspondientes al alargamiento del enlace C-N [54] y los picos en torno a 1150 y 1200 cm^{-1} se debieron a las vibraciones de los grupos metilo (CH_3 -). Por otro lado, los picos correspondientes al estiramiento de los enlaces C=C y C=N aparecieron en un rango entre 1500 y 1650 cm^{-1} [55].

En cuanto al reactivo aniónico CuPc^{SO3-}, presentó un pico característico intenso en 1030 cm^{-1} asociado a la vibración del enlace C-N del pirrol [56], los picos originados por la presencia de grupos sulfónicos aparecieron en torno a 1027 cm^{-1} , mientras que la deformación del enlace C-C del grupo isoindol [57] se originó alrededor de 1330 cm^{-1} .

Es decir, los espectros demostraron la presencia de todos los compuestos usados en la preparación del sensor, confirmando así la correcta adsorción de los compuestos CHI, IL y $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ sobre el sustrato de ZnS.

Tal y como se observó en la *figura 18 b*, la intensidad de las señales de transmitancia, aumentó linealmente con el número de capas depositadas sobre el sustrato (de 4 a 32 bicapas), obteniéndose un coeficiente de regresión $R^2=0,99437$, lo que evidenció que el crecimiento de las capas se produjo de manera eficiente.

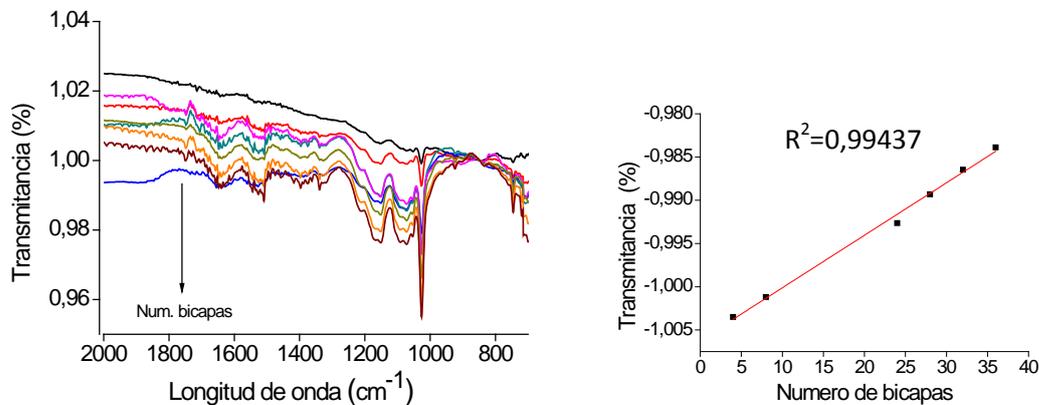


Figura 18. (a) Espectros FTIR de la película LbL de CHI+IL/ $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ con número creciente de bicapas (de 4 a 32), (b) Relación lineal de la intensidad del pico a 1027 cm^{-1} frente al número de bicapas.

2.4.1.2. Análisis por Espectroscopía UV-Visible

Se recurrió a la espectroscopía UV-Vis para obtener información acerca del crecimiento de las películas LbL de CHI+IL/ $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ depositadas sobre la superficie de un sustrato de cristal de cuarzo.

El espectro de absorción representado en la *figura 19 a* mostró una importante banda a 620 cm^{-1} , denominada banda Q correspondiente a la transición $\pi-\pi^*$ desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO), hasta el orbital molecular libre de menor

energía (LUMO) del anillo de la ftalocianina [58][59]. Por otro lado, se observó un hombro a 680 cm^{-1} debido a la formación de agregados. Además, en 335 cm^{-1} apareció un pico intenso, correspondiente a la *banda de Soret* característica de $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ [60]. También en este caso, al aumentar el número de bicapas depositadas sobre el sustrato, la absorbancia de los picos se incrementó de forma lineal (*figura 19 b*), con un coeficiente de regresión $R^2=0,98514$. Este resultado confirmó la buena calidad de las capas depositadas sobre el sustrato.

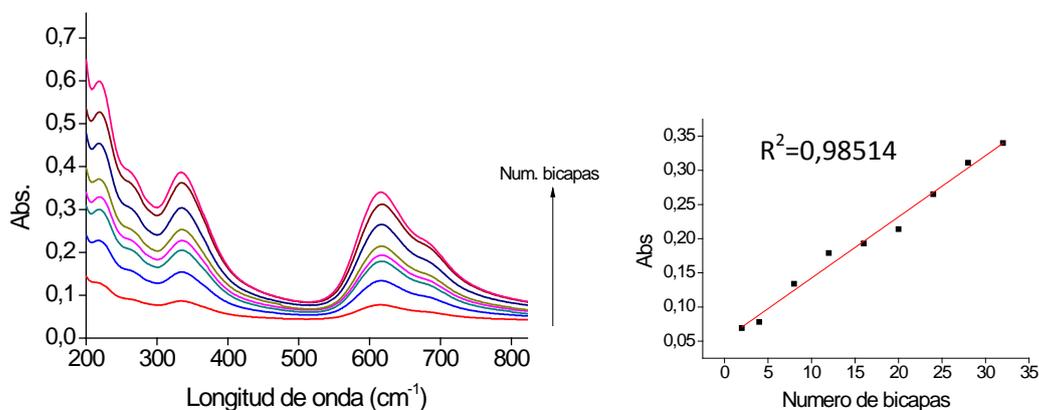


Figura 19. (a) Espectro UV-Visible entre 200 y 800 cm^{-1} de la película LbL de $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ con número creciente de bicapas (de 4 a 32), (b) Relación lineal de la intensidad de la banda a 620 cm^{-1} frente al número de bicapas.

2.4.2. Respuesta electroquímica frente a muestras patrón

Los biosensores se prepararon inmovilizando las enzimas sobre las películas nanoestructuradas de $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ depositadas sobre ITO, mediante la técnica LbL.

En este trabajo, se prepararon dos biosensores: uno dedicado a la detección de glucosa para el cual se depositó la enzima glucosa-oxidasa (GOD) sobre las películas LbL descrita anteriormente, y otro dedicado a la detección de galactosa, constituido por la enzima galactosa-oxidasa (GAO).



En ambos casos, se esperó que la presencia de la capa LbL favoreciese el funcionamiento del sensor, facilitando la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato.

2.4.2.1. Respuesta voltamétrica de los sensores (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) frente a glucosa

Con el fin de evaluar el funcionamiento de los biosensores enzimáticos modificados con GOD (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD), se analizaron muestras patrón de glucosa, evaluando además el efecto del pH.

Para ello, se realizaron análisis voltamétricos en dos disoluciones de glucosa de concentración 10^{-4} M en tampón fosfato 0,01M, a pH 5,6 y pH 7 en un rango de potencial entre 1200 mV y -800 mV con una velocidad de barrido de 100 mV/s. Los resultados se mostraron en la *figura 20*, donde se pudieron comparar las respuestas obtenidas a diferentes pHs. Todos estos ensayos se llevaron a cabo por duplicado (*sensor 1 y sensor 2*) con el objetivo de estudiar la reproducibilidad de los biosensores de GOD (*figura 21*).

La presencia de los picos a potenciales -800 mV y 1200 mV , evidenció que estaban teniendo lugar los procesos de oxidación de O_2 a H_2O_2 y reducción de H_2O_2 a O_2 respectivamente, presentes en el mecanismo de reacción de glucosa a ácido glucónico [4].

Se realizaron experimentos a diferentes pHs, para analizar la influencia de este parámetro en el funcionamiento de la enzima. Sin embargo, en los experimentos realizados, no se evidenciaron diferencias relevantes en los voltamogramas de los biosensores. Este resultado pudo tener dos posibles explicaciones. La primera, pudo deberse a que no se encontró el pH óptimo en el que la enzima funcionase eficientemente y una segunda explicación relacionada con la mala eficiencia de las películas LbL como mediador para la enzima.

Para analizar con más profundidad el papel de la película LbL como mediador electrónico, se compararon las señales obtenidas utilizando un sensor formado por la GOD depositada directamente sobre el ITO, un sensor de ITO modificado con la

secuencia de bicapas ($\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}$) y finalmente la respuesta de la estructura completa, formada por la enzima depositada sobre las películas ($\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}/\text{GOD}$). De nuevo, los experimentos se realizaron a dos pHs diferentes (*figura 20*).

Sorprendentemente, se observó que en ausencia de enzima ($\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}$), las respuestas eran más intensas que en presencia de GOD ($\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}/\text{GOD}$), independientemente del pH de trabajo, lo que sugiere que, en las condiciones experimentales establecidas, la enzima GOD, no funciona adecuadamente.

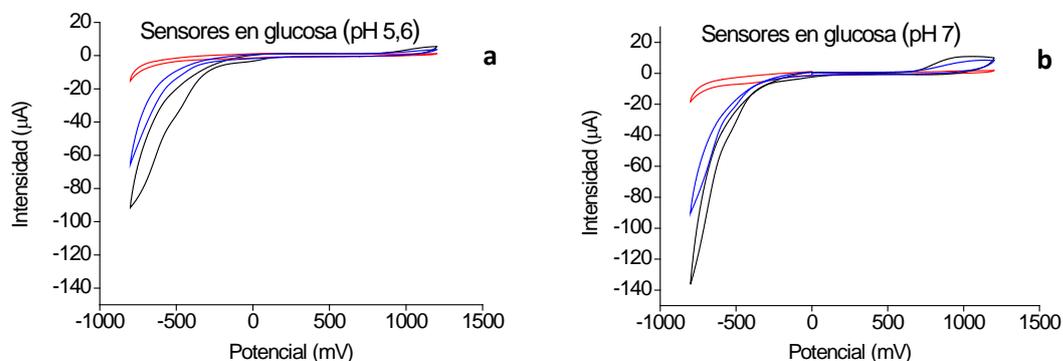


Figura 20. Respuesta voltamétrica de sensores $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}$ (negro); GOD (rojo) y $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}/\text{GOD}$ (azul) inmersos en glucosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5,6 (a) y 7 (b) y concentración 10^{-4}M .

En cuanto a reproducibilidad se refiere, se consiguieron mejores resultados para pH 5,6, (*figura 21 a*) debido que, a pesar de no observarse picos anódicos y catódicos significativos, las señales ofrecidas por dos biosensores idénticos a pH 5,6, fueron más semejantes que los obtenidos a pH 7 (*figura 21 b*). Esto pudo estar relacionado con la proximidad de dicho valor al pH óptimo de la enzima GOD, produciéndose la desnaturalización irreversible de la enzima para valores lejanos a su pH óptimo [43].

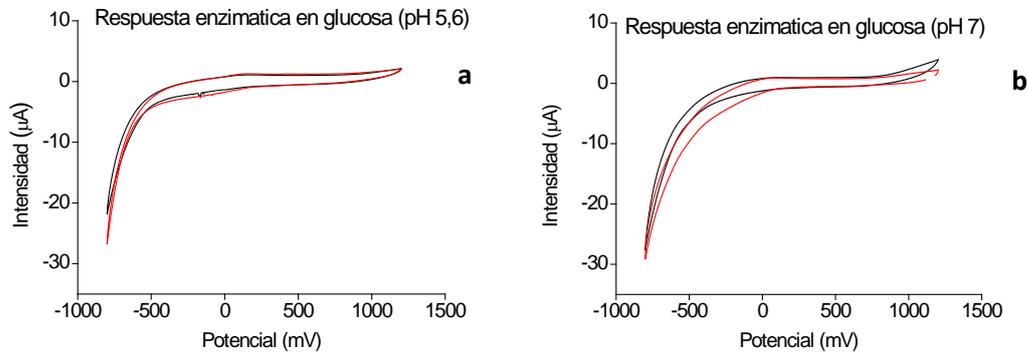


Figura 21. Reproducibilidad del sensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) en glucosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5.6 (a) y pH 7 (b) y concentración 10^{-4} M.

2.4.2.2. Respuesta voltamétrica de los sensores (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO). frente a galactosa

Se realizó un estudio similar para evaluar la funcionalidad de los biosensores enzimáticos modificados con GAO, utilizando muestras patrón de galactosa en tampón fosfato.

Para ello, se llevó a cabo el estudio voltamétrico de una disolución de galactosa de concentración 10^{-4} en tampón fosfato 0,01M sobre la que se analizó además el efecto del pH en la respuesta de los sensores a pH 5.6 y pH 7 en un rango de potencial entre 1200 mV y -800 mV con una velocidad de barrido de 100 mV/s. Los resultados se mostraron en la *figura 22*. Todos estos ensayos se llevaron a cabo por duplicado (*sensor 1* y *sensor 2*) con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de los biosensores de GAO (*figura 23*).

Se realizaron experimentos a diferentes pHs para analizar la influencia de este parámetro en el funcionamiento de la enzima. Se encontró que el aumento de pH, provocaba una fuerte disminución en la intensidad de todo el voltamograma provocando el desdoblamiento del pico catódico que aparecía a un rango de potencial entre -100 y -300 mV [39]. Esto sugiere que el pH de funcionamiento óptimo de la enzima es cercano a 7.

Para evaluar el papel como mediador electrónico de las películas LbL, se compararon las señales obtenidas utilizando un sensor formado por la GAO depositada directamente sobre el ITO, un sensor de ITO modificado con la secuencia de bicapas (CHI+IL/CuPc^{SO3}) y finalmente la respuesta de la estructura completa, formada por la enzima depositada sobre las películas (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO). La experimentación se realizó también a dos pHs diferentes.

Los resultados (*figura 22*) demostraron que la presencia de capas LbL como mediadores electrónicos aumentó la intensidad de las señales, confirmando que la GAO depositada sobre CHI+IL/CuPc^{SO3} aumentaba su funcionalidad. Este es uno de los resultados más importantes de este trabajo, ya que confirma que el esfuerzo de depositar las capas LbL se compensa por el efecto potenciador de la funcionalidad de la enzima.

Los resultados se mostraron en la *figura 22*, donde se observaron picos correspondientes al par redox Cu⁺²/Cu⁺¹ que forma la metaloenzima GAO. Estos picos aparecieron a 100 mV en la región anódica indicativo de la conversión de la coenzima desde Cu (I) a Cu(II) y a -170 mV en la región catódica fruto de la conversión de Cu (II) a Cu(I) [39]. Estos procesos corresponden a la oxidación/reducción de la glucosa relacionados en el mecanismo de reacción de galactosa a galactohexodialdosa [44].

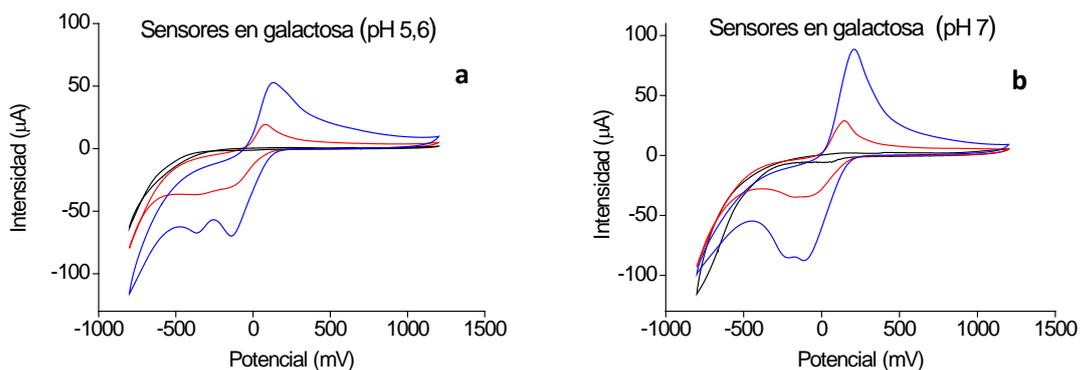


Figura 22. Respuesta voltamétrica de sensores CHI+IL/CuPc^{SO3} (negro); GAO (rojo) y CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO (azul) inmersos en galactosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5,6 (a) y 7 (b) y concentración 10⁻⁴M.

Como se pudo apreciar en la *figura 23*, el aumento de pH, provocó diferencias relevantes entre los biosensores, aumentando significativamente la intensidad de

todos los picos del voltamograma a pH 7 y ofreciendo en ambos casos una reproducibilidad semejante. Esto se atribuyó a que el pH de trabajo se acercaba en gran medida a la actividad óptima de la enzima GAO (pH 7):

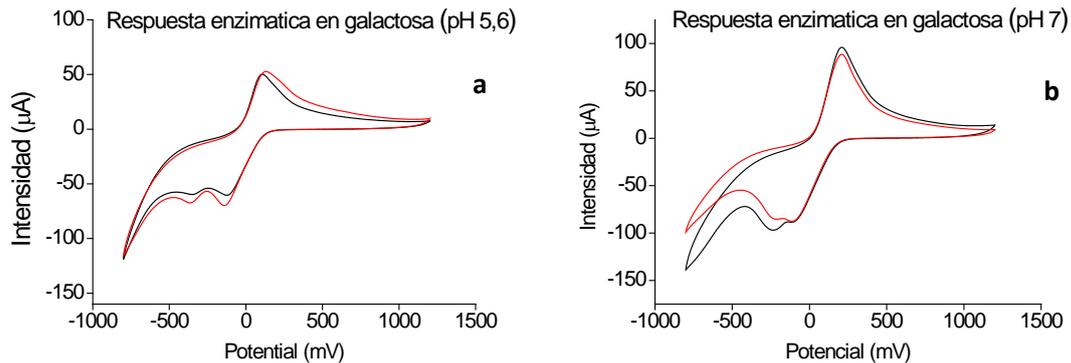


Figura 23. Reproducibilidad del sensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) en galactosa/tampón fosfato 0,01M a pH 5,6 (a) y 7 (b) y concentración 10⁻⁴M.

2.4.2.3. Estudio de la sensibilidad y límites de detección de los sensores

Una vez evaluada la funcionalidad de los biosensores en muestras patrón de glucosa y galactosa, se estudió la sensibilidad y se determinaron los límites de detección (LOD) de los sensores obtenidos con la secuencia de bicapas (CHI+IL/CuPc^{SO3}) y los biosensores modificados con enzimas (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) y (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO). La evaluación de los LODs y la sensibilidad de los sensores se llevó a cabo mediante cronoamperometría, analizando la intensidad de corriente tras adiciones sucesivas de las disoluciones patrón de interés (glucosa o galactosa).

Tras aplicar los potenciales de reducción característicos (-0,8 V para GOD y -0,12 V para GAO) y la realización de las sucesivas adiciones de 1ml cada 100 segundos, se representó la recta de calibrado (tomando el último valor de cada adición antes de la siguiente) a través de la cual se halló el valor de la pendiente (*Ec.10.*) (sensibilidad), y con este último y tomando la desviación estándar de 5 medidas del blanco, se aplicó la *Ec.11* para determinar la concentración mínima de analito que el sensor era capaz de detectar.

➤ **Sensibilidad y LOD del sensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}) y el biosensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) frente a disoluciones patrón de glucosa**

Los cronoamperogramas obtenidos para los sensores sin modificación enzimática (CHI+IL/CuPc^{SO3}) (figura 24) y los biosensores modificados con glucosa oxidasa inmovilizada (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) (figura 25), ofrecían sensibilidades similares, y, por tanto, LODs parecidos: ($-3,8 \cdot 10^{-10} \text{M}$) para los sensores nanoestructurados y ($-1,4 \cdot 10^{-10} \text{M}$) en el caso de biosensores enzimáticos.

La mínima cantidad de glucosa capaz de ser detectada por los sensores, fue en ambos casos similar, demostrando que la presencia de la enzima no interfería en términos de sensibilidad frente al sensor formado por las bicapas, obteniendo en ambos casos el mismo orden de magnitud.

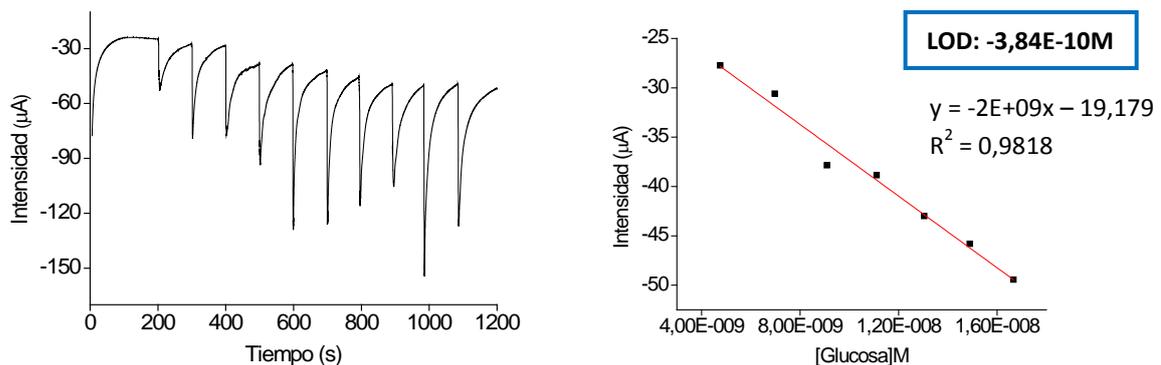


Figura 24. Cronoamperometría catódica del sensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}) a potencial $-0,8 \text{V}$ con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución patrón de glucosa 10^{-4}M en tampón fosfato $0,01 \text{M}$ pH 7.

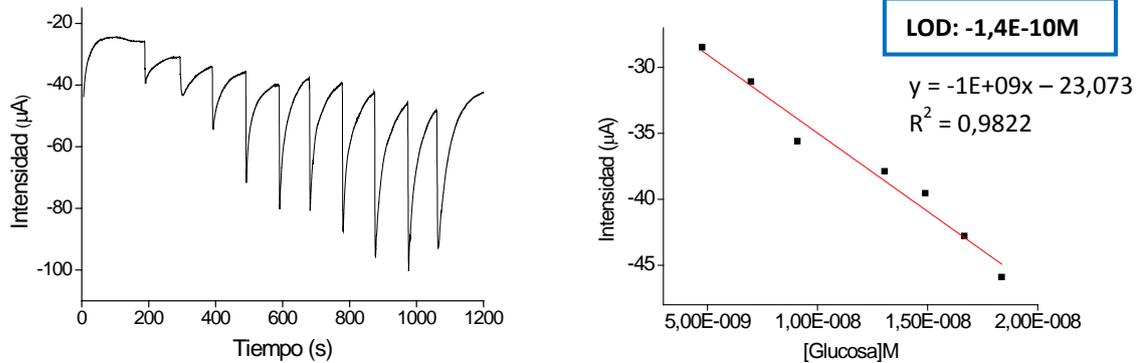


Figura 25. Cronoamperometría catódica del biosensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) a potencial -0,8V en disolución patrón de glucosa 10⁻⁴M en tampón fosfato 0,01M pH 7.

➤ **Sensibilidad y LOD del sensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}) y el biosensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) frente a disoluciones patrón de galactosa**

Los cronoamperogramas obtenidos para los sensores sin modificación enzimática (*figura 26*) y con la enzima GAO inmovilizada (*figura 27*) mostraron que los sensores no enzimáticos (CHI+IL/CuPc^{SO3}) ofrecían menor sensibilidad, y, por tanto, LODs peores ($-3,5 \cdot 10^{-9}$ M) que los biosensores enzimáticos CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO ($9,4 \cdot 10^{-11}$ M).

Los resultados obtenidos demostraron que la presencia de la enzima GAO inmovilizada sobre el electrodo nanoestructurado mejoraba en dos órdenes de magnitud la sensibilidad del sensor sobre la disolución patrón de galactosa.

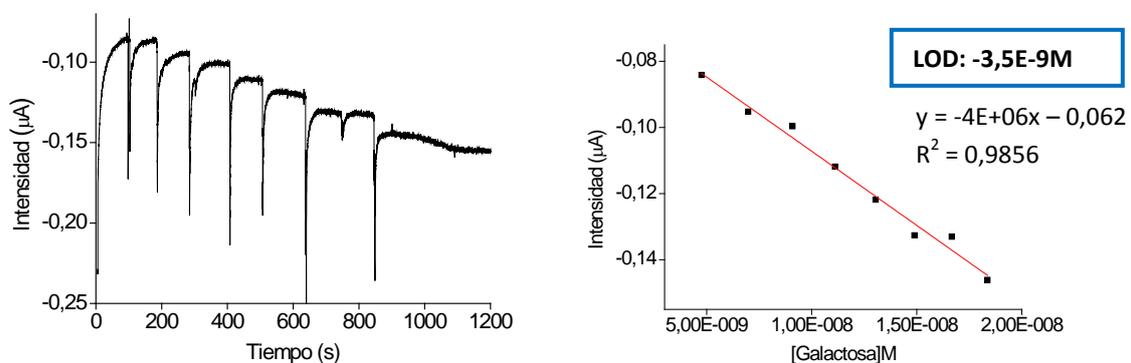


Figura 26. Cronoamperometría catódica del sensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}) a potencial -0,8V con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución patrón de galactosa 10⁻⁴M en tampón fosfato 0,01M pH 7.

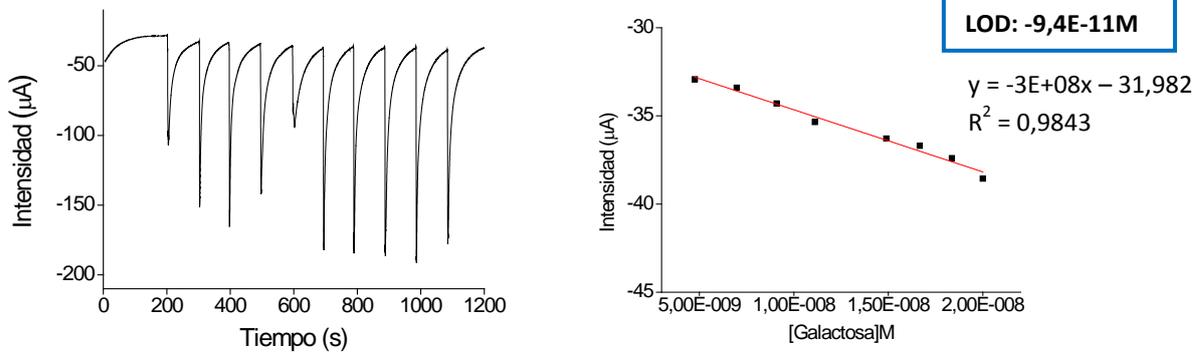


Figura 27. Cronoamperometría catódica del biosensor (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) a potencial -0,12V en disolución patrón de galactosa 10⁻⁴M en tampón fosfato 0,01M pH 7.

2.4.3. Análisis electroquímico en muestras de leche

Una vez analizado el comportamiento de los sensores y biosensores frente a muestras patrón de glucosa y galactosa, se evaluó el comportamiento de los sensores formados por películas nanoestructuradas de CHI+IL/CuPc^{SO3} depositadas sobre ITO, así como el de los biosensores enzimáticos de GOD y GAO frente a muestras de leche de interés industrial.

Para ello se analizaron muestras de leche entera y con lactosa de dos vaquerías diferentes, pero con similar calidad (CLU y PEÑA) y muestras de leches semidesnatadas sin lactosa de dos vaquerías diferentes, pero con similar calidad (COVA y PONFE).

Los primeros análisis voltamétricos se llevaron a cabo sobre leche bruta y en una segunda aproximación se intentó mejorar el resultado añadiendo a la leche un conocido mediador electrónico (ferrocianuro), esperando que la presencia de este aditivo mejorase las respuestas voltamétricas obtenidas [53].

2.4.3.1. Leche sin modificar

Se analizaron dos muestras de leche fresca entera con lactosa (CLU y PEÑA), procedentes de diferentes vaquerías y dos muestras de leche semidesnatada sin



lactosa (COVA Y PONFE). Todas las muestras se analizaron con el sensor no enzimático (CHI+IL/CuPc^{SO3}) y los dos biosensores (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) y (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO).

En la *figura 28* se representaron los voltamogramas cíclicos obtenidos para las dos muestras de leche entera con lactosa, mientras que las muestras de leche semidesnatada sin lactosa se representaron en la *figura 29*.

La principal diferencia entre los voltamogramas obtenidos sobre muestras de leche frente a las medidas realizadas bajo las mismas condiciones en disoluciones patrón, fue que en las muestras reales, los voltamogramas se acercaron más a la irreversibilidad [24].

Otro aspecto importante a analizar en las leches, es su degradación con el tiempo. Por esta razón, con el fin de evaluar su envejecimiento, las muestras se analizaron no sólo el día en que se abrieron los Tetra-brick, sino que también se midieron tras cuatro días de exposición a temperatura ambiente. Además de numerosos cambios en la composición, el cambio más notable es un marcado aumento de la acidez, observándose un descenso en los valores de pH desde 6,80 y 6,67 para las muestras de CLU y PEÑA el primer día y pH 6,33 y 6,52 para la segunda sesión respectivamente.

La *figura 28* mostró que con el paso del tiempo se atenuaban las señales de intensidad catódicas y anódicas para los sensores enzimáticos, mientras que en el caso del sensor formado únicamente por la secuencia CHI+LI/CuPc^{SO3}, no se apreció apenas descenso.

Por otro lado, se observó que los sensores mostraban diferencias notables para todas las muestras bajo las mismas condiciones, lo que conllevó a pensar, que dichos sensores podrían ser capaces de discriminar muestras de leche de distintas variedades.

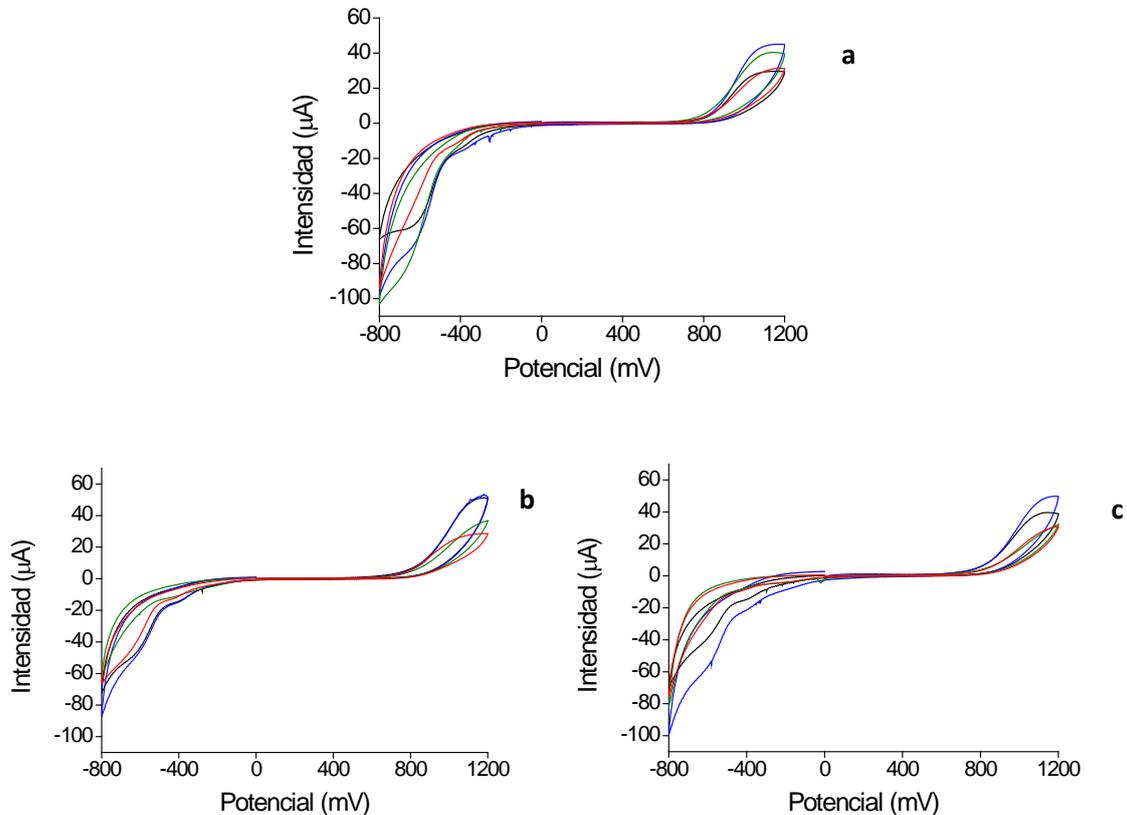


Figura 28. Evolución temporal de la respuesta voltamétrica de las muestras de leche entera con lactosa CLU (1^{er} día (negro) 4^o día (azul)) y PEÑA (1^{er} día (verde) 4^o día (rojo)) brutas con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc^{SO3}) (a), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) (b), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) (c).

Se pudo intuir que la disminución del pH con el transcurso de los días en las muestras enteras, provocó la acidificación de la leche produciendo la coagulación parcial de las muestras, y tomando éstas, una tonalidad amarillenta oscura como consecuencia de la reacción de lactosa con las proteínas del suero de la leche [4].

En el caso de las muestras de leche semidesnatada sin lactosa (*figura 29*), con menor contenido en materia grasa, se obtuvieron resultados muy similares al caso anterior, debilitando las intensidades catódicas y anódicas, por su ausencia en lactosa y el fuerte poder reductor del ácido ascórbico que actuaba como protector frente a la oxidación de las grasas.



Por otro lado, los sensores manifestaron diferencias relevantes entre las medidas de todas las muestras bajo las mismas condiciones, lo que pudo favorecer su capacidad para diferenciar entre las distintas variedades de esas muestras.

Cabe destacar que la leche fresca de los Tetra-brick semidesnatados y sin lactosa se coaguló tras cuatro días abiertos, en mayor medida que las muestras enteras. Esto se debió a su mayor contenido en proteínas (las muestras de leche entera con lactosa contenían 3 g/100 mL de materia grasa frente al 3,3 g/100 mL en las muestras semidesnatada sin lactosa), como consecuencia de su acidificación, donde el pH medido en la primera sesión, 6,79 y 6,88 para las muestras semidesnatadas COVA y PONFE disminuyó hasta 6,68 y 6,38 respectivamente. Este fenómeno provocó que la intensidad de los picos en las muestras sin lactosa, disminuyese en mayor medida frente a las muestras de leche con lactosa, en las medidas realizadas el cuarto día.

Debido a su bajo contenido en grasas, la oxidación de las mismas provocó alteraciones equivalentes en el color y textura, de menor intensidad que en el caso de las muestras de leche entera.

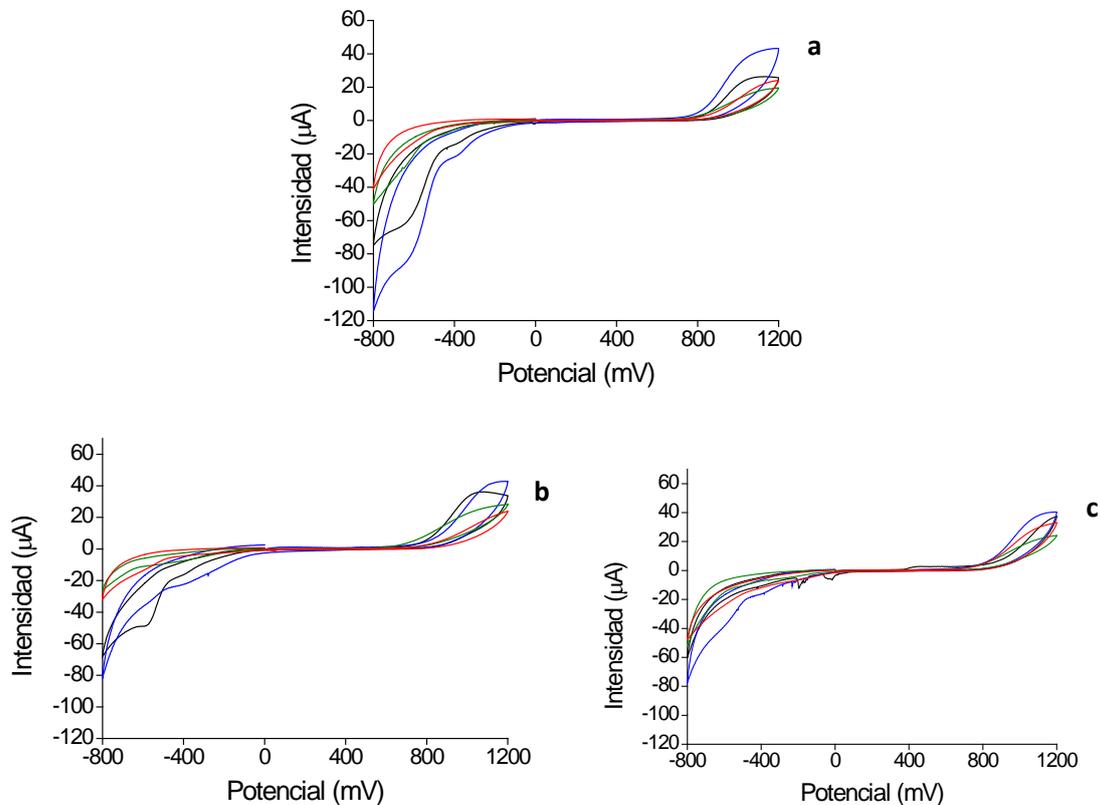


Figura 29. Evolución temporal (1^{er} día y 4^o día) de la respuesta voltamétrica de las muestras de leche semidesnatada sin lactosa COVA (1^{er} día (negro) 4^o día (azul)) y PONFE (1^{er} día (verde) 4^o día (rojo)) brutas con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc^{SO3}) (a), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) (b), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) (c).

2.4.3.2. Leche modificada con un mediador electrónico

Tal y como se vio en el apartado anterior, los voltamogramas mostraron algunas diferencias entre las dos variedades de leche.

Como se verá más adelante, estas pequeñas diferencias pueden ser magnificadas gracias al uso de técnicas estadísticas multivariantes como el análisis PCA. Sin embargo, en este punto del trabajo, se decidió utilizar una nueva estrategia para intentar aumentar la intensidad de las señales y, por tanto, las diferencias entre muestras de leche.



La nueva estrategia consistió en añadir un conocido mediador electrónico (ferrocianuro potásico) a la propia muestra de leche. De este modo, se pudo favorecer la eficiencia en la transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo, intensificando las señales de los picos catódico y anódico de las medidas electroquímicas realizadas por voltametría cíclica [53].

Para realizar estas medidas electroquímicas, se añadió una disolución de ferrocianuro potásico 5 mM, a las muestras de leche tanto entera con lactosa (CLU y PEÑA), como a las leches semidesnatadas sin lactosa (COVA Y PONFE).

Estos ensayos se repitieron para dos sesiones diferentes (el día que se abrieron los Tetra-brick y tras cuatro días de exposición a temperatura ambiente) en un rango de potencial entre 1200 mV y -800 mV con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Tal y como se vio en las *figuras 30 y 31*, la forma de los voltamogramas cambió radicalmente frente a los obtenidos sobre muestras brutas (*figura 28 y 29*), ya que en ellos se observó un intenso par redox, debido a la oxidación/reducción del ferrocianuro/ferricianuro. La intensidad de este par redox, estaba directamente relacionada con la actividad enzimática y, por tanto, con la concentración de los analitos.

La *figura 30* mostró los voltamogramas cíclicos de una mezcla de leche entera con lactosa (CLU y PEÑA) y ferrocianuro y la *figura 31* correspondió a la disolución de leche semidesnatadas sin lactosa (COVA y PONFE) con ferrocianuro, comparando en ambos casos, las respuestas obtenidas en muestras recién abiertas, con las mismas muestras de leche cuatro días más tarde.

En primer lugar, se pudo apreciar una atenuación en la intensidad de los picos de oxidación y reducción con el paso del tiempo para las dos variedades de leche, produciéndose un cambio más significativo con el empleo de los biosensores enzimáticos CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD y CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO. Esto pudo atribuirse al empeoramiento de la capacidad catalítica de las enzimas en las muestras de leche y/o a la desnaturalización de las proteínas presentes en el lactosuero.

Además, se observó que, las medidas electroquímicas obtenidas con los sensores mostraban grandes diferencias para todas las muestras bajo las mismas condiciones, lo

que puso de manifiesto la capacidad de dichos sensores para discriminar entre las muestras de leche de distintas variedades.

La principal diferencia detectada entre las muestras con lactosa (*figura 30*) y sin lactosa (*figura 31*) fue la intensidad de los picos de oxidación y reducción, siendo mayor la corriente en las muestras semidesnatadas por su mayor contenido en lactosuero (donde se encuentran la mayoría de sustancias electroactivas).

En cuanto al envejecimiento de la leche, se pudo observar, que el sensor no enzimático no fue capaz de detectar los cambios ocurridos en la leche. Sin embargo, los biosensores enzimáticos detectaron claramente el cambio, dando lugar a una drástica disminución de las señales.

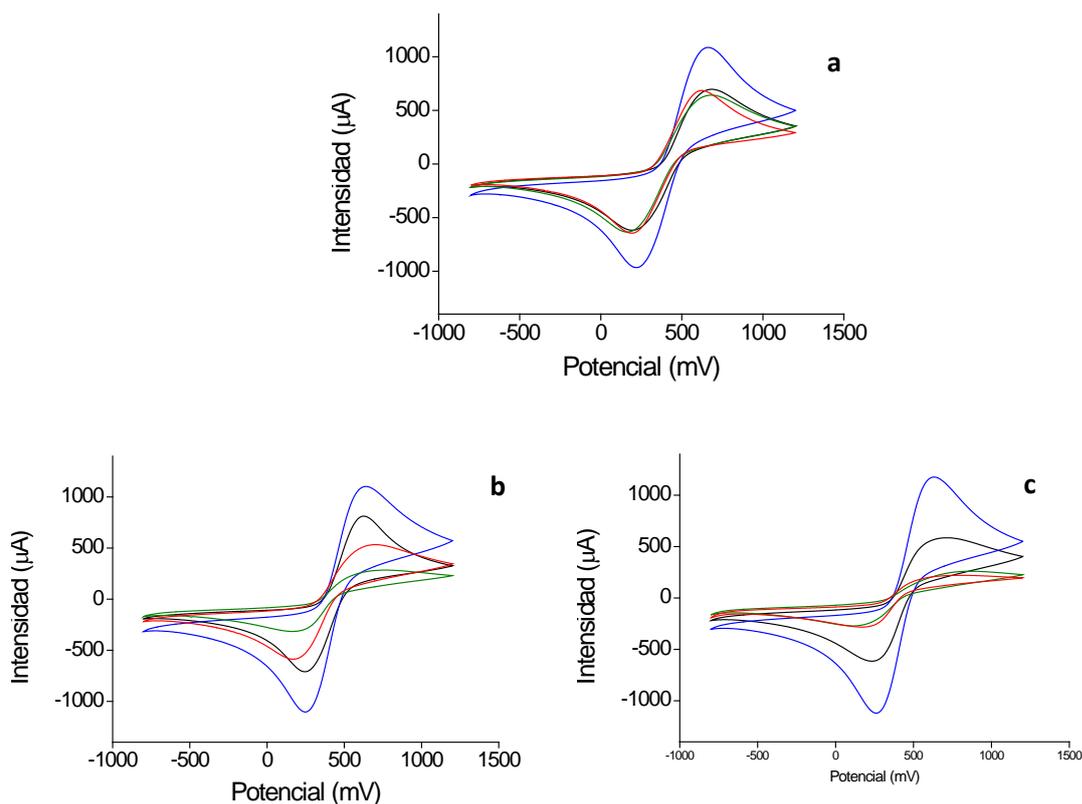


Figura 30. Evolución temporal (1^{er} día y 4^o día) de la respuesta voltamétrica de las muestras de leche entera con lactosa: CLU (1^{er} día (negro) 4^o día (azul)) y PEÑA (1^{er} día (verde) 4^o día (rojo)) con ferrocianuro con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc^{SO3}) (a), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GOD) (b), (CHI+IL/CuPc^{SO3}/GAO) (c).

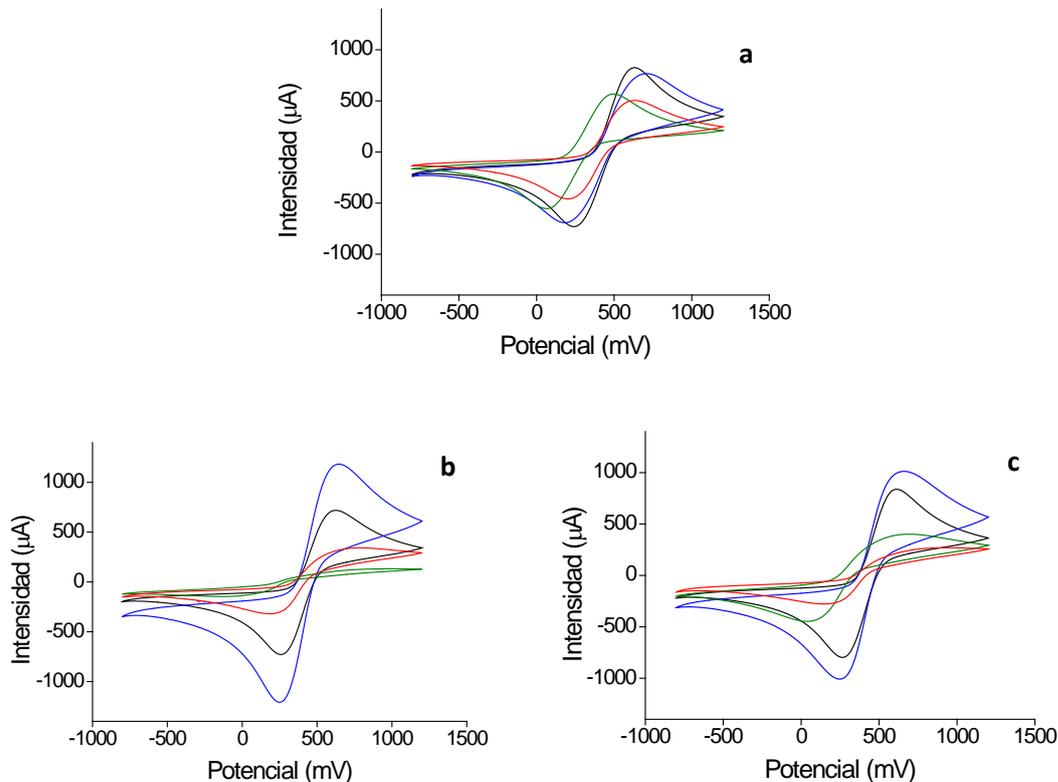


Figura 31. Evolución temporal (1^{er} día y 4^o día) de la respuesta voltamétrica de las muestras semidesnatadas sin lactosa: COVA (1^{er} día (negro) 4^o día (azul)) y PONFE (1^{er} día (verde) 4^o día (rojo)) con ferrocianuro con distintos sensores, (CHI+IL/CuPc^{SO₃}) (a), (CHI+IL/CuPc^{SO₃}/GOD) (b), (CHI+IL/CuPc^{SO₃}/GAO) (c).

2.4.4. Red de sensores unido a un software de reconocimiento de patrones. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Con los resultados anteriores, se puede concluir que se obtuvieron biosensores con diferente selectividad, que fueron capaces a priori de diferenciar muestras de leche con diferente composición y en diferente estado de frescura.

Para cuantificar esta capacidad de discriminación, se recurrió a una estrategia habitual en nuestro grupo de trabajo, que es la formación de redes de sensores acoplados a un software de reconocimiento de patrones (*lengua electrónica*). Como ya se indicó en la



introducción, utilizando este sistema, se pudieron analizar y discriminar muestras complejas.

En esta parte del trabajo, se plantearon dos objetivos. Por una parte, discriminar entre muestras con y sin lactosa. Este es un trabajo importante ya que la detección de lactosa en productos sin lactosa requiere métodos sensibles y a menudo se ve obstaculizada por los elevados niveles de glucosa y galactosa presentes después de su tratamiento con lactasa [61]. El segundo objetivo fue monitorizar la evolución de la leche con el tiempo.

El sistema multisensor se construyó a partir de una red de tres sensores ($\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}$, $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}/\text{GOD}$ y $\text{CHI+IL/CuPc}^{\text{SO}_3}/\text{GAO}$). Estos sensores se introdujeron en las muestras de leche para llevar a cabo la voltametría cíclica y con los datos obtenidos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), que permitió evaluar la capacidad de discriminación del sistema multisensor.

En esta sección, se mostraron los gráficos de scores 2D o 3D obtenidos del análisis PCA de las muestras de leche con ayuda del software matemático *Matlab*.

2.4.4.1. PCA de leche sin modificar

En primer lugar, se estudió la capacidad del sistema para discriminar muestras de leche entera (con lactosa) y semidesnatada (sin lactosa). Para ello, se realizó un análisis PCA de diferentes variedades de leche entera con lactosa (CLU y PEÑA) y semidesnatada sin lactosa (COVA Y PONFE).

En la *figura 32* se representó la PCA en 3D de las muestras de leche bruta el día que se abrieron los Tetra-brick, donde la primera componente (PC1) englobaba el 46,10% de la información original, la segunda componente (PC2) recogía el 32,90% de los datos, mientras que la tercera componente acumulaba el 3,40%.

Tal y como se pudo apreciar en la *figura 32*, el sistema multisensor fue capaz de discriminar, las muestras de leche en dos grandes grupos (entera con lactosa y semidesnatada sin lactosa). Además, distinguió entre muestras obtenidas de diferentes vaquerías. Este resultado indicó que el sistema podría utilizarse como control de calidad de leche en las industrias lácteas.

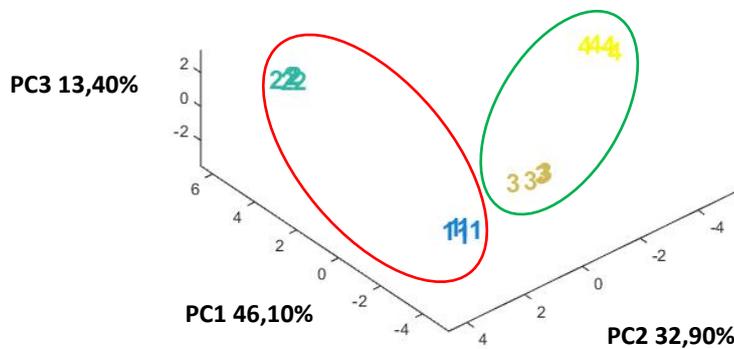


Figura 32. PCA en 3D de las muestras de leche fresca el primer día. **1:** CLU (entera y con lactosa), **2:** PEÑA (entera y con lactosa), **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa) y **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa).

Tras cuatro días en reposo, la representación PCA en 3D (*figura 33*) y en 2D (*figura 34*) de las muestras de leche sin modificar, mostró que la primera componente principal (PC1) capturaba el 52,94% de la información, la segunda componente (PC2) hasta 26,40%. y la tercera componente (PC3) 15,56%. Tal y como se observó en los diagramas, el sistema multisensor, fue capaz de discriminar las leches envejecidas, aunque en este caso, la dispersión de los datos es mayor. De hecho, en el diagrama de 3D, no se apreció con facilidad la discriminación, debido a la dificultad de valorar los datos en profundidad, por eso se mostró en la *figura 34*, la PCA de las leches envejecidas en dos dimensiones, donde es clara la discriminación entre muestras (no solo desnatada y semidesnatada, sino también entre muestras de la misma categoría). Así, las muestras de leche entera con lactosa se agruparon en la región negativa de PC1 y PC2, mientras las muestras semidesnatadas se organizaron en torno a valores positivos.

Estas diferencias tan claras, fueron consecuencia de la acidificación de la leche debida a la disminución del pH que provocó la formación de grumos y la coagulación más significativa en muestras semidesnatadas que en las enteras debido a su mayor contenido en proteínas [4] (las muestras de leche entera con lactosa contenían 3 g/100 mL de materia grasa frente al 3,3 g/100 mL en las muestras semidesnatada sin lactosa).

El aumento de la dispersión pudo ser provocado por la dificultad en la transferencia electrónica como consecuencia de la coagulación y la formación de agregados en la



leche durante su degradación, pese a que éstas fueron agitadas vigorosamente antes de llevarse a cabo las medidas electroquímicas.

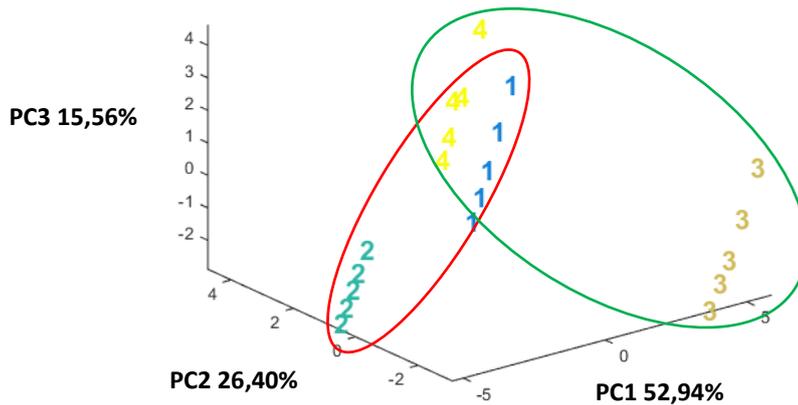


Figura 33. PCA en 3D de las muestras de leche fresca tras cuatro días en reposo. **1:** CLU (entera y con lactosa), **2:** PEÑA (entera y con lactosa), **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa), **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa).

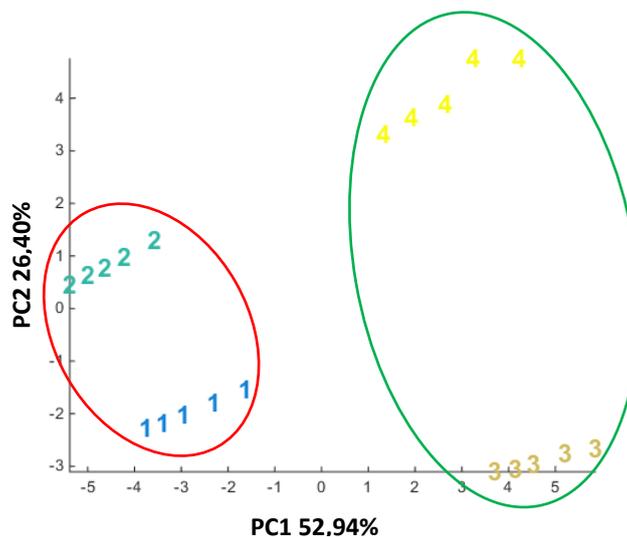


Figura 34. PCA en 2D de las muestras de leche fresca tras cuatro días en reposo. **1:** CLU (entera y con lactosa), **2:** PEÑA (entera y con lactosa), **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa) y **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa).



2.4.4.2 PCA de leche modificada

Con el fin de mejorar la capacidad de discriminación, el sistema multisensor se utilizó para analizar muestras de diferentes variedades de leche entera con lactosa (CLU y PEÑA) y semidesnatada sin lactosa (COVA Y PONFE) modificadas con ferrocianuro para mejorar la transferencia electrónica e intensificar las señales electroquímicas.

Como se pudo apreciar en la *figura 35*, las componentes PC1, PC2 y PC3 tomaron valores de 54,40% para la primera componente PC1, 29,10% para la segunda componente PC2 y 13,00% para la tercera componente PC3. Es importante resaltar que, la presencia de ferrocianuro aumentó la distancia entre los clústeres de cada muestra, mejorando notablemente, en especial, la discriminación entre las muestras de leche semidesnatada sin lactosa (COVA y PONFE).

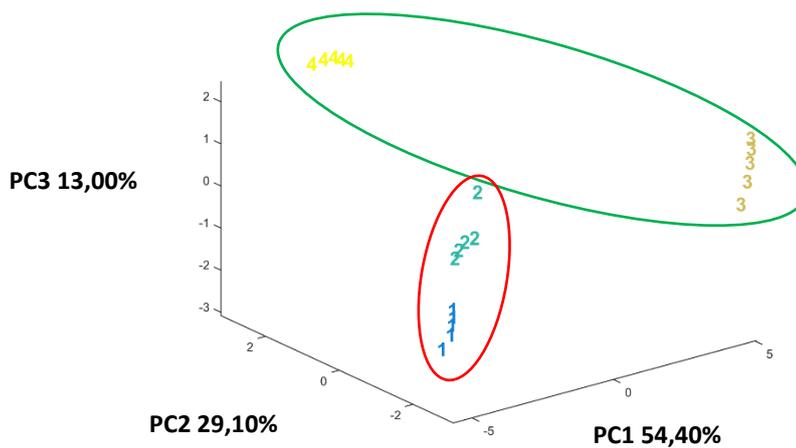


Figura 35. PCA en 3D de las muestras de leche modificadas con ferrocianuro el primer día. **1:** CLU (entera y con lactosa). **2:** PEÑA (entera y con lactosa). **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa). **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa).

Tras cuatro días de evolución, (*figura 36*) el análisis PCA de la leche en disolución con ferrocianuro (PC1 66,10%, PC2 31,00% y PC3 2,90%), mostró una mejora en la diferencia entre las muestras de leche. Este efecto se debió a la diferente composición química de cada muestra que hacía que cada muestra envejeciese de un modo diferente. Además, la dispersión disminuyó en gran medida, mejorando la discriminación respecto al primer día.

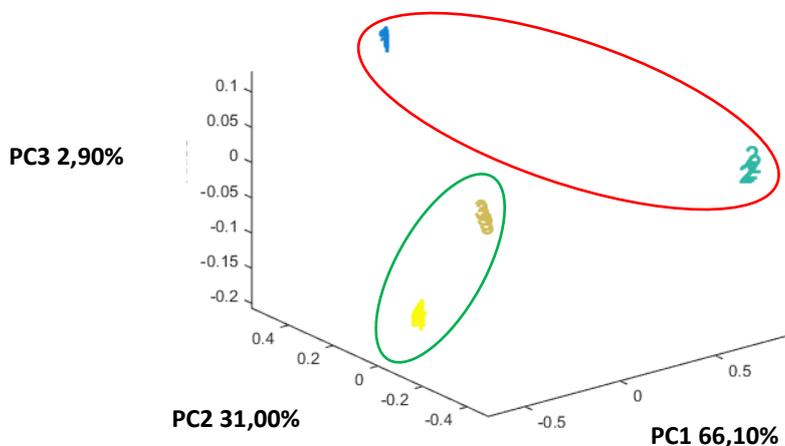


Figura 36. PCA en 3D de las muestras de leche modificadas con ferrocianuro tras cuatro días en reposo. **1:** entera y con lactosa). **2:** PEÑA (entera y con lactosa). **3:** COVA (semidesnatada y sin lactosa). **4:** PONFE (semidesnatada y sin lactosa).

2.4.4.3 PCA comparativa de las dos sesiones de medida para leche fresca y modificada con ferrocianuro

También se compararon las medidas electroquímicas llevadas a cabo el día que se abrieron los Tetra-brick frente a las obtenidas tras cuatro días en reposo sobre muestras frescas como modificadas con ferrocianuro, con el objetivo de evaluar la degradación que tenía lugar para cada variedad de leche, así como su influencia en función de su contenido en lactosa.

En definitiva, como se pudo comprobar en la *figura 37*, el modelo de estudio que se generó fue capaz de diferenciar los diferentes procesos de degradación de las muestras, así como su contenido en lactosa y la detección de posibles fallos o anomalías presentes en las muestras, desplazando las medidas electroquímicas de las muestras frescas hacia la región central y agrupándose en torno a valores negativos y alineándose las muestras modificadas hacia valores menores en el eje de abscisas.

Además, la modificación de las muestras brutas con ferrocianuro, evidenció que el empleo de éste como mediador electrónico mejoraba la transferencia electrónica, minimizando la dispersión de los resultados, haciendo que los resultados de las

mediciones electroquímicas se solapasen para una misma muestra y mejorando a su vez la capacidad de discriminación entre todas las muestras de leche.

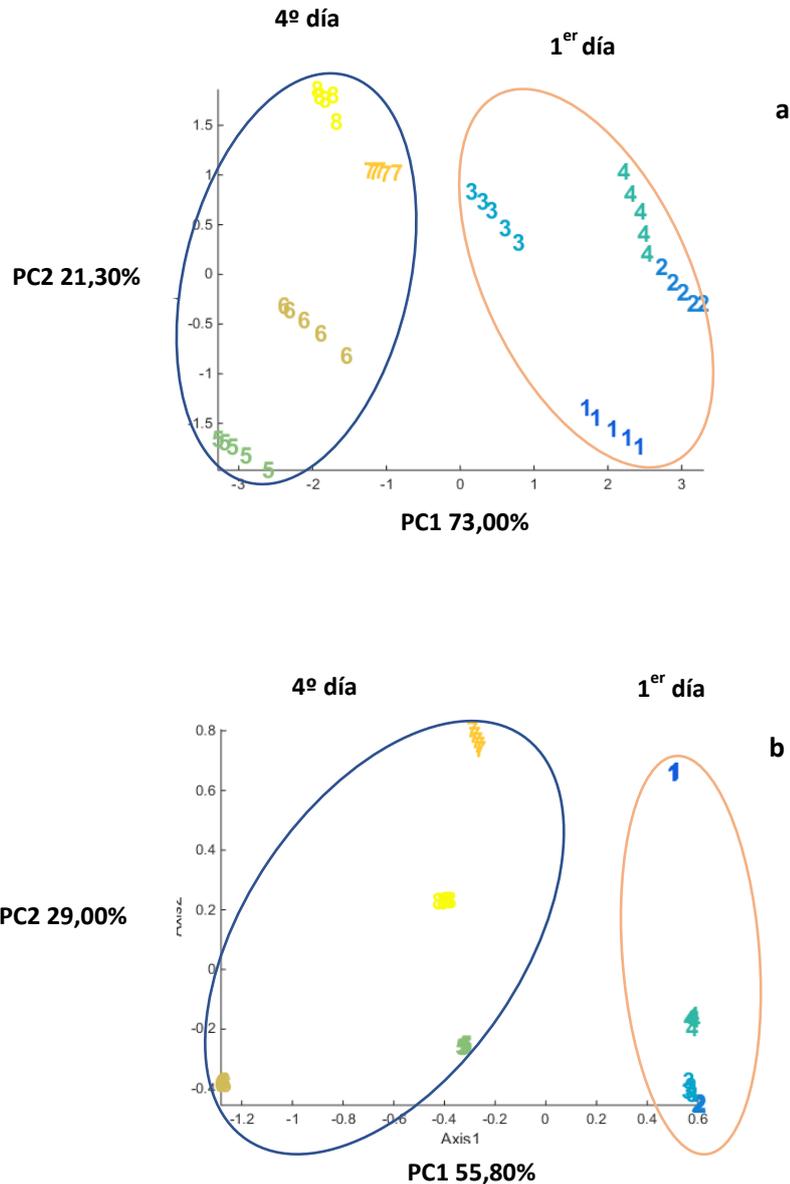


Figura 37. PCA comparativa de la evolución temporal de todas las muestras en 2D para leche bruta (a) y para leche modificada con ferrocianuro (b). **1** y **5**: CLU (entera+lactosa), **2** y **6**: PEÑA (entera+lactosa), **3** y **7**: COVA (semi+sin lactosa), **4** y **8**: PONFE (semi+sin lactosa).



2.4.5. Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1)

Una vez analizadas las muestras de leche con el sistema multisensor, también se analizaron algunos parámetros característicos de las muestras de leche, como el contenido en grasas (Fat), proteínas (Prot), lactosa, extracto seco magro (ESM), urea y acidez de la leche. Los resultados del análisis químico de componentes se obtuvieron sobre las muestras de leche en bruto, en la primera sesión de medida en colaboración con el Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León (LILCYL, S.A.) (Tabla 2).

ID	Fat	Prot	Lactosa	ESM	Urea	Acidez
CLU	3,52	3,22	4,87	8,842	242	13,8
PEÑA	3,53	3,26	4,86	9,009	262	14,4
COVA	1,80	3,40	3,32	7,325	619	11,4
PONFE	1,84	3,30	3,14	7,195	594	11,6

Tabla 2. Resultados del análisis químico.

Donde:

Fat: Grasas.	ESM: Extracto seco magro.
Prot: Proteínas.	Urea
Lactosa	Acidez de la leche: Contenido en ácido láctico.

Se establecieron modelos matemáticos mediante análisis multivariante, para establecer correlaciones lineales entre los datos obtenidos con el sistema multisensor y los datos químicos.

Utilizando Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-1), se estableció el modelo predictivo entre la recta de calibración (ajuste modelo-datos químicos) y la predicción (ajuste modelo-datos experimentales).



Parámetro	R^2_c	RMSEC	R^2_p	RMSEP	Variables latentes
Fat	0,9243	0,2345	0,9050	0,2770	2
Prot	0,9494	0,0151	0,9280	0,0190	1
Lactosa	0,8893	0,2728	0,8571	0,3263	1
FDP	0,9467	0,0820	0,9270	0,0101	1
Urea	0,9206	50,0362	0,9031	58,1922	2
Acidez	0,9232	0,3655	0,8939	0,4523	2

Tabla 3. Resultados del análisis de Regresión Lineal por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1).

Donde:

R^2_c : Coeficiente de correlación en calibración.
RMSEC: Error cuadrático medio en calibración.
 R^2_p : Coeficiente de correlación en predicción.
RMSEP: Error cuadrático medio en predicción.

En la *tabla 3*, se expusieron los valores resultantes de los modelos de regresión PLS-1 que correlacionaron los datos químicos y experimentales obtenidos de las medidas voltamétricas realizadas en la primera sesión donde se presentaron los coeficientes de correlación y los errores cuadráticos medios en las rectas de calibración (R^2_c , RMSEC) y predicción (R^2_p , RMSEP).

Se han conseguido errores cuadráticos medios pequeños y buenas correlaciones para ambos coeficientes, siendo ligeramente mayores en el caso de los coeficientes de correlación en calibración para los parámetros analizados grasas (Fat), proteínas (Prot), lactosa, extracto seco magro (ESM), urea y acidez de la leche frente a los coeficientes en predicción.



Universidad de Valladolid

CAPÍTULO II: Desarrollo del TFG

2.4. Resultados experimentales



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Además, el número de variables latentes, que hace referencia al número de componentes necesarias que determinan la covarianza entre los valores en forma de matriz correspondientes a las rectas de calibración y predicción fue óptimo pues a menor número de variables necesarias, la covarianza entre las matrices aumentaba y en nuestro caso se obtuvieron variables latentes próximas a 1, que sería el caso ideal. Estos resultados corroboraron el excelente funcionamiento del sistema multisensor.



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

CAPÍTULO III:

3. CONCLUSIONES



3. Conclusiones

Se han desarrollado biosensores voltamétricos para el análisis de leche, basados en la detección de los azúcares glucosa y galactosa.

Estos biosensores, formados por películas nanoestructuradas se construyeron mediante adsorciones electrostáticas a partir de la combinación de compuestos electrocatalíticos catiónicos CHI, LI, así como de un compuesto aniónico $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$, sobre los que se depositaron y se inmovilizaron las enzimas GOD y GAO por entrecruzamiento con vapores de glutaraldeído.

La construcción de películas finas nanoestructuradas sobre el ITO consiguió intensificar las señales electroquímicas de las reacciones que tenían lugar sobre la superficie del electrodo.

Se ha comprobado que el biosensor $\text{CHI+LI/CuPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{GOD}$, ofrecía mejores resultados en términos de reproducibilidad e intensidad a pH 5,6, mientras el biosensor $\text{CHI+LI/CuPc}^{\text{SO}_3^-}/\text{GAO}$, por el contrario, mostraba mejores señales a pH 7 con LODs en el rango de 10^{-10} M para glucosa y galactosa.

Las medidas electroquímicas en leche se mejoraron con la adición de ferrocianuro, que actuaba mejorando la conductividad de la leche, a la vez que favorecía la transferencia electrónica.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) permitió discriminar entre las diferentes muestras de leche tanto en función de su degradación temporal como de su contenido en lactosa, viéndose favorecida su capacidad de discriminación en presencia de ferrocianuro.

A su vez, el análisis de Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS-1) demostró la existencia de correlaciones muy buenas y con errores pequeños entre los resultados obtenidos a través del análisis químico y los datos experimentales obtenidos por voltametría cíclica.



Universidad de Valladolid

CAPÍTULO III: Conclusiones



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

Estos biosensores nanoestructurados podrían tener interés en la industria láctea por su capacidad para discriminar muestras de leche en función de su contenido en lactosa, la detección de posibles anomalías presentes o algún tipo de fallo de forma instantánea en el proceso de producción, aunque cabe destacar que presentan algunos inconvenientes como su costosa fabricación, que no son reutilizables y se requeriría además un laboratorio auxiliar en el que preparar previamente los sensores. Por lo que, a día de hoy, los sensores comerciales, como por ejemplo DropSens, siguen siendo más utilizados, pues son económicos, aunque sean de un único uso.



Universidad de Valladolid

Desarrollo de sensores
electroquímicos nanoestructurados
para el análisis de leche



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

CAPÍTULO IV: 4. BIBLIOGRAFÍA



4. Bibliografía

- [1] Gobierno de España. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, “Alimentación. Cifras de la industria alimentaria.” [Online]. Available: <http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/>. [Accessed: 20-Apr-2018].
- [2] Junta de Castilla y León. Conserjería de Agricultura y Ganadería, “La industria agroalimentaria en Castilla y León.” [Online]. Available: http://www.jcyl.es/web/jcyl/AgriculturaGanaderia/es/Plantilla100/1284250174899/11/_/_. [Accessed: 20-Apr-2018].
- [3] E. I. I. UVa, “Química Inorgánica. SensorGroup UVA.” [Online]. Available: <http://www.eis.uva.es/inorganica/>. [Accessed: 20-Apr-2018].
- [4] C. Alais, *Science du lait, Principes des techniques laitières*, 4^a edición. 1984.
- [5] OMS y FAO, *Codex Alimentarius. Leche y Productos lácteos*, 2^a edición. 2011.
- [6] Universidad Nacional y Abierta a Distancia, “Lectura: Tecnología de lácteos.”
- [7] M. Lodovici, E. Bigagli, and G. Bardini, “Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes,” *Toxicol. Ind. Health*, vol. 25, pp. 337–341, 2009.
- [8] P. Toth, “Triglyceride-rich lipoproteins as a casual factor for cardiovascular disease,” *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 12, pp. 171–183, 2016.
- [9] P. L. McSweeney and P. F. Fox., *Advanced dairy chemistry. Volume 3. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, 3^a edición. 2009.
- [10] J. C. B. Feng Liu, Priyatanu Roy, Qi Shao, Cunlan Jiang, Jeunghwan Choi, Connie Chung, and Dushyant Mehra, “The Role of Protein Loss and Denaturation in Determining Outcomes of Heating , Cryotherapy and Irreversible Electroporation on Cardiomyocytes,” *Biomech. Eng.*, 2018.
- [11] G. B. Celli, R. Ravanfar, S. Kaliappan, R. Kapoor, and A. Abbaspourrad, “Annatto-Entrapped Casein-Chitosan Complexes Improve Cheddar Cheese Whey Color,” *Food Chem.*, vol. 255, pp. 268–274, 2018.
- [12] G. Marrubini, P. Appelblad, M. Maietta, and A. Papetti, “Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: an updated review,” *Food Chem.*, vol. 257, pp. 53–66, 2018.



- [13] T. Asledottir, T. T. Le, N. A. Poulsen, T. G. Devold, L. B. Larsen, and G. E. Vegarud, "Release of b -casomorphin-7 from bovine milk of different b -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion," *Int. Dairy J.*, vol. 81, pp. 8–11, 2018.
- [14] I. Muñoz, P. Gou, P. A. Picouet, A. Barlabé, and X. Felipe, "Dielectric properties of milk during ultra- heat treatment," *Food Eng.*, vol. 219, pp. 137–146, 2017.
- [15] B. Gąsowska-bajger, Y. Nishigaya, K. Hirsz-, A. Rybczyńska, and T. Yamazaki, "Interference of carbidopa and other catechols with reactions catalyzed by peroxidases," *BBA Gen. Subj.*, vol. 1862, pp. 1626–1634, 2018.
- [16] R. Marino, S. Torretta, P. Capaccio, L. Pignataro, and F. Spadari, "Different therapeutic strategies for burning mouth syndrome : preliminary data," *J Oral Pathol Med*, vol. 39, pp. 611–616, 2010.
- [17] F. C. Ferrari, R. L. Lima, Z. S. Filha, C. H. Barros, M. C. Araújo, and D. A. Súde-Guimaraes, "Effects of Pimenta pseudocaryophyllus extracts on gout: Anti-inflammatory activity and antihyperuricemic effect through xantine oxidase and uricosuric action," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 180, pp. 37–42, 2016.
- [18] F. Guimaraes, V. Veloso, D. Malveira, H. Fonseca, M. Pinto, R. Careli, and E. Duarte, "Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes do leite de transição bovino fermentado," *Interciencia*, vol. 43, pp. 132–136, 2018.
- [19] O. Nivala, G. Faccio, M. Arvas, P. Permi, J. Buchert, and K. Kruus, "Characterization of sulfhydryl oxidase from *Aspergillus tubingensis*," *BMC Biochem.*, pp. 15–18, 2017.
- [20] P. Andrewes, "Indirect detection of lipase in UHT milk by measuring methyl ester formation," *Int. Dairy J.*, vol. 79, pp. 1–4, 2018.
- [21] D. Ismene, K. Gawl, D. Andrade, and M. Cruz, "Determination of the protease inhibitory activity of the aqueous extract of the vegetative and reproductive organs of *Ismene amancaes* s (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) 'amancaes' endemic to Peru," *Arnaldoa*, vol. 25, pp. 273–286, 2018.
- [22] P. Yago, "Leche y derivados lácteos," *Nutrición Humana y Dietética*. [Online]. Available: <https://eldietista.es/blog/alimentos/leche-y-derivados-lacteos>. [Accessed: 20-Apr-2018].
- [23] S. Ajit, *Engineering Biosensors. Kinetics and Design Applications*, 1ª edición. 2002.



- [24] E. Cortón, “Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos,” Universidad de Buenos Aires, 2000.
- [25] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, “Glucose oxidase,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, pp. 489–501, 2009.
- [26] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, “Introduction to biosensors,” *Essays Biochem.*, vol. 60, pp. 1–8, 2016.
- [27] P. Shaibani, H. Etayash, K. Jiang, A. Sohrabi, M. Hassanpourfard, S. Naicker, M. Sadrzadeh, and T. Thundat, “Portable Nanofiber-Light Addressable Potentiometric Sensor for Rapid Escherichia coli Detection in Orange Juice,” *ACS Sensors*, vol. 3, pp. 815–822, 2018.
- [28] M. Barsan, M. David, M. Florescu, T. Laura, and C. Brett, “A new self-assembled layer-by-layer glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped graphene,” *Bioelectrochemistry*, vol. 99, pp. 46–52, 2014.
- [29] D. Mascagni, C. Miyazaki, N. Cruz, M. Moraes, A. Riul, and M. Ferreira, “Layer-by-layer assembly of functionalized reduced graphene oxide for direct electrochemistry and glucose detection,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 68, pp. 739–745, 2016.
- [30] L. Zhou, J. Wang, L. Gai, D. Li, and Y. Li, “Chemical An amperometric sensor based on ionic liquid and carbon nanotube modified composite electrode for the determination of nitrite in milk,” *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 181, pp. 65–70, 2013.
- [31] A. Benvidi, M. T. Nafar, S. Jahanbani, M. D. Tezerjani, M. Rezaeinasab, and S. Dalirnasab, “Developing an electrochemical sensor based on a carbon paste electrode modified with nano-composite of reduced graphene oxide and CuFe₂O₄ nanoparticles for determination of hydrogen peroxide,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 1435–1447, 2017.
- [32] M. Eguílaz, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, N. Ferreyra, and G. Rivas, “Chemical Functionalization of bamboo-like carbon nanotubes with 3-mercaptophenylboronic acid-modified gold nanoparticles for the development of a hybrid glucose enzyme electrochemical biosensor,” *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 216, pp. 629–637, 2015.
- [33] A. Gutiérrez, A. Ibáñez, M. Valle, and F. Céspedes, “Automated SIA e-Tongue Employing a Voltammetric Biosensor Array for the Simultaneous Determination of Glucose and Ascorbic Acid,” *Electroanalysis*, vol. 18, pp. 82–88, 2006.



- [34] O. GURSOY, G. CELIK, S. GURSOY, "Electrochemical Biosensor Based on Surfactant Doped Polypyrrole (PPy) Matrix for Lactose Determination," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 40200, pp. 1–7, 2014.
- [35] G. MADURAVEERAN, M. SASIDHARAN, and V. GANESAN, "Biosensors and Bioelectronics Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 103, pp. 113–129, 2018.
- [36] B. HAI, B. THANH, H. VAN VU, and C. VAN NGUYEN, "Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly (1,5-diaminonaphthalene) film," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 16, pp. 135–140, 2016.
- [37] Y. ZHU, C. GAO, T. HE, X. LIU, and J. SHEN, "Layer-by-Layer Assembly To Modify Poly (L-lactic acid) Surface toward Improving Its Cytocompatibility to Human Endothelial," *Biomacromolecules*, vol. 4, pp. 446–452, 2003.
- [38] A. J. LEITE, R. R. COSTA, M. S. COSTA, J. S. MACIEL, F. G. COSTA, C. M. PAULA, and J. F. MANO, "The potential of cashew gum functionalization as building blocks for layer-by-layer films," *Carbohydr. Polym.*, vol. 174, pp. 849–857, 2017.
- [39] J. XIE, C. CHEN, Y. ZHOU, J. FEI, Y. DING, and J. ZHAO, "A Galactose Oxidase Biosensor Based on Graphene Composite Film for the Determination of Galactose and Dihydroxyacetone," *Electroanalysis*, vol. 28, pp. 183–188, 2016.
- [40] J. TKAC, J. W. WHITTAKER, and T. RUZGAS, "The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, pp. 1820–1824, 2007.
- [41] M. LI, J. YANG, Y. OU, Y. SHI, L. LUI, C. SUN, H. ZHENG, and Y. LONG, "Peroxidase-like activity of 2',7' -difluoro fluorescein and its application for galactose detection," *Talanta*, vol. 182, pp. 422–427, 2018.
- [42] U. National Center for Biotechnology Information U. S. National Library of Medicine, "PubChem. Open Chemistry Database," 2004. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11973707>. [Accessed: 20-Apr-2018].
- [43] M. S. ROMERO and P. G. FRANCO, "Caracterización de la enzima glucosa oxidasa (gox) libre e inmovilizada en dos soportes (alginato de sodio y agarosa) para la producción de ácido glucónico," Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 2010.
- [44] J.A.Cowan, *Bioinorganic Chemistry an Introduction*, 3ª edición. 2017.



- [45] K. Khun, Z. Ibupoto, O. Nur, and M. Willander, "Development of Galactose Biosensor Based on Functionalized ZnO Nanorods with Galactose Oxidase," *J. Sensors*, vol. 2012, pp. 1–7, 2012.
- [46] D. M. Arroyo, "Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications," *Ars Pharm.*, pp. 23–39, 1998.
- [47] M. L. Rodríguez Méndez, *Electronic noses and tongues in food science*, 1^a edición. 2016.
- [48] D. A. Skogg, F.J. Holler, and T. A. Nieman, *Principles of instrumental analysis*, 7^a edición. 2016.
- [49] K. A. Rubinson and J. F. Rubinson, *Contemporary chemical analysis*, 1^a edición. 2000.
- [50] J. M. M. León, "Desarrollo de un método de análisis voltamperométrico para la cuantificación de acetaminofén empleando electrodos modificados con polipirrol," Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2013.
- [51] Y. Castrillejo and E. Barrado, "Introducción al estudio de procesos electroquímicos para Trabajos de Fin de Grado (TGF) o de máster (TFM)," pp. 19–24.
- [52] M.T.Gurrea, "Análisis de componentes principales," pp. 1–11, 2000.
- [53] S. Shrikrishnan and V. Lakshminarayanan, "Electron transfer studies of redox probes in bovine milk," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 370, pp. 124–131, 2012.
- [54] V. S. Rao, T. V. Krishna, T. M. Mohan, and P. M Rao, "Thermodynamic and volumetric behavior of green solvent 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate with aniline from T=(293.15 to 323.15)K at atmospheric pressure," *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 100, pp. 165–176, 2016.
- [55] S. A. Dharaskar, K. L. Wasewar, M. N. Varma, D. Z. Shende, and C. Yoo, "Synthesis , characterization and application of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate for extractive desulfurization of liquid fuel," *Arab. J. Chem.*, vol. 9, pp. 578–587, 2016.
- [56] M. Norman, J. Zdarta, P. Bartczak, A. Piasecki, I. Petrenko, H. Ehrlich, and T. Jesionowski, "Marine sponge skeleton photosensitized by copper phthalocyanine : A catalyst for Rhodamine B degradation," *Open Chem*, pp. 243–254, 2016.



- [57] F. Lu, M. Bao, C. Ma, X. Zhang, D. P. Arnold, and J. Jiang, "Infrared spectra of phthalocyanine and naphthalocyanine in sandwich-type (na) phthalocyaninato and porphyrinato rare earth complexes . Part 3 . The effects of substituents and molecular symmetry on the infrared characteristics of phthalocyanine in bis (ph," *Spectrochim. Acta Part A*, vol. 59, pp. 3273–3286, 2003.
- [58] J. Zeng, S. Sun, J. Zong, X. Li, R. Wang, L. Wu, L. Wang, and Y. Fan, "Pd nanoparticles supported on copper phthalocyanine functionalized carbon nanotubes for enhanced formic acid electrooxidation," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 9, pp. 2–10, 2014.
- [59] R. A. Hatton, N. P. Blanchard, V. Stolojan, A. J. Miller, and S. R. Silva, "Nanostructured Copper Phthalocyanine-Sensitized Multiwall Carbon Nanotube Films," *Lagmuir*, vol. 23, pp. 6424–6430, 2007.
- [60] Y. Wang, H. Chen, H. Li, and M. Wang, "Fabrication of carbon nanotubes / copper phthalocyanine composites with improved compatibility," *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 117, pp. 296–301, 2005.
- [61] D. Guille, B. Walther, R. Badertscher, A. Bosshart, C. Brugger, M. Bruhlart, R. Gauch, P. Noth, and G. Vergeres, "Detection of lactose in products with low lactose content," *Int. Dairy J.*, vol. 83, pp. 17–19, 2018.