



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Empleo de una lengua electrónica
potenciométrica para la detección de
adulteraciones en leche**

Autor:

González Rojo, Marta

Tutor:

Rodríguez Méndez, María Luz

García Hernández, Celia

Departamento

Química Física y Química

Inorgánica

Valladolid, junio 2019.

Agradecimientos

El primer agradecimiento tiene que ser para María Luz Rodríguez Méndez, mi tutora, por haberme dado la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Grado en su grupo de investigación; por su apoyo y colaboración que han sido fundamentales para que yo este hoy aquí presentando este proyecto.

En segundo lugar, agradecer su eterna paciencia y ayuda a Celia García Hernández, y a la Prof. Ana Cristina García Cabezón por su ayuda.

A Esther y María por ayudarme en esos momentos iniciales en los cuales, gracias a sus trucos comencé a experimentar en este proyecto.

A mis compañeros de carrera con los que he compartido mis éxitos y mis penas en estos años, en especial a Miriam, Patri, Leti y Esther que han sido un gran apoyo para mí.

A mis compañeros de laboratorio que en estos últimos meses me han ayudado y con los que he pasado muy buenos momentos.

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia, que han compartido conmigo estos duros años. Por su paciencia, comprensión y apoyo en este largo camino que me ha llevado a la realización de este trabajo y esta carrera.

Muchas gracias a todos por haberme acompañado estos años.

En última instancia quiero agradecer su colaboración al Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León (LILCYL S.A.)



Resumen

Este Trabajo de Fin de Grado ha consistido en el empleo de una lengua potenciométrica para diferenciar entre los cinco sabores básicos y analizar leche de vaca, con y sin adulteración, y mezcla de leche de vaca con leche de cabra.

Además, la lengua potenciométrica se ha modificado con la enzima β -galactosidasa para obtener un sistema de lengua biopotenciométrica, con el fin de mejorar la respuesta del dispositivo en las medidas de galactosa.

Por último, se han utilizado diferentes análisis estadísticos multivariantes sobre los datos obtenidos con la lengua potenciométrica. Así, el Análisis de Componentes Principales (PCA), se utilizó para estudiar la capacidad de discriminación de la lengua potenciométrica en el estudio de los sabores y muestras de leche. Por otro lado, el Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), se llevó a cabo para establecer modelos de predicción que permitan correlacionar los datos obtenidos con la lengua potenciométrica y los datos químicos obtenidos.

Palabras clave: lengua potenciométrica, lengua biopotenciométrica, sabor, leche, PCA y PLS.



Abstract

This Degree's Final Project has consisted of the use of a potentiometric tongue to differentiate between the five basic flavors and to analyze cow's milk, with and without adulteration, and mixing of cow's milk with goat's milk.

In addition, the potentiometric tongue has been modified with the enzyme β -galactosidase to obtain a biopotentiometric tongue system, in order to improve the response of the device to galactose.

Finally, different multivariate statistical analysis have been applied to the data obtained with the potentiometric tongue. So, the Principal Component Analysis (PCA) was used to study the discrimination capacity of the potentiometric tongue in the study of milk flavors and samples. On the other hand, the Partial Least Squares Analysis (PLS) was carried out to establish prediction models that allow correlating the data obtained with the potentiometric tongue with chemical data obtained with habitual methods.

Key words: Potentiometric tongue, biopotentiometric tongue, flavor, milk, PCA and PLS.



1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. JUSTIFICACIÓN DEL TFG	1
1.2. OBJETIVOS	1
.....	3
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
2.1. LECHE: DEFINICIÓN, COMPOSICIÓN Y TIPOS	5
2.1.1. Composición química de la leche	6
2.1.2. Propiedades físico-químicas de la leche de vaca	7
2.1.3. Tipos de leche y su clasificación	7
2.1.3.1. Según el tratamiento térmico para su conservación y consumo	7
2.1.3.2. Según su contenido nutricional.....	8
2.1.3.3. Según el estado físico que presente	9
2.2. EL SECTOR LÁCTEO EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA	9
2.3. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LECHE.....	11
2.4. TIPOS DE ADULTERACIONES EN LA LECHE	14
2.4.1. Adulteración de leche con agua	14
2.4.2. Adulteración de leche por mezclas entre leche de origen bovino y caprino	15
2.5. EL SENTIDO DEL GUSTO: LOS SABORES.....	16
2.6. LENGUAS ELECTRÓNICAS	17
2.6.1. Sensores utilizados en lenguas electrónicas	18
2.6.1.1. Sensores y biosensores químicos.....	18
2.6.1.2 Sensor potenciométrico	19
2.6.1.3. Sensores biopotenciométricos.....	20
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS MULTIVARIANTES OBTENIDOS CON LENGUAS ELECTRÓNICAS	21
2.7.1. Análisis de componentes principales (PCA)	21
2.7.2. Mínimos cuadrados parciales (PLS).....	22
2.8. LENGUAS ELECTRÓNICAS, AVANCES ACTUALES EN EL ANÁLISIS DE LECHE.....	22
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
3.1. MATERIALES Y REACTIVOS	25
3.1.1. Construcción del soporte de la lengua electrónica potenciométrica	25



3.1.2. Membranas utilizadas como elemento sensible en las lenguas potenciométricas ..	26
3.1.3. Elaboración de la lengua biopotenciométrica	28
3.1.4. Disoluciones patrón analizadas	28
3.1.5. Muestras de leche analizadas	28
3.2. EQUIPOS EMPLEADOS.....	29
3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.3.1. Desarrollo y construcción de la lengua potenciométrica.....	31
3.3.2. Adquisición de medidas con la lengua potenciométrica	32
3.3.3. Elaboración de la lengua biopotenciométrica	33
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	37
4.1. DISCRIMINACIÓN DE SABORES	37
4.2. ANÁLISIS DE DISOLUCIONES PATRÓN DE SABORES BASICOS	38
4.2.1. Resultado de las sales analizadas: sabor salado	38
4.2.2. Resultado de los ácidos analizadas: sabor ácido.....	42
4.2.3. Resultado de la base analizada: sabor amargo	44
4.2.4. Resultado de los azúcares analizados: sabor dulce.....	45
4.2.5. Resultado del glutamato monosódico: sabor umami	47
4.3. SENSORES MODIFICADOS CON ENZIMA: LENGUA BIOPOTENCIOMÉTRICA	48
4.4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LECHEs	49
4.4.1. Diferenciación entre leche de vaca cruda y pasteurizada sin adulteración.....	50
4.4.2. Diferenciación entre leches no adulteradas y leches adulteradas	54
4.4.2.1. Adulteración de leche de vaca con agua.....	54
4.4.2.2. Adulteración por mezcla de leche de cabra con leche de vaca	58
4.4.3. Análisis estadístico de mínimos cuadrados principales (PLS-1)	62
5. CONCLUSIONES.	67
6. BIBLIOGRAFÍA	71



Lista de Tablas

- Tabla 1. Composición básica de algunos tipos de leche [1].
- Tabla 2. Producciones de leche de vaca en el Mundo, en la Unión Europea y en España [8].
- Tabla 3 Parámetros analíticos convencionales de la leche.
- Tabla 4. Rango de proporciones empleado para la formación de membranas potenciales [20].
- Tabla 5. Componentes de las membranas [20].
- Tabla 6. Composición de las membranas empleadas.
- Tabla 7. Concentración de las disoluciones.
- Tabla 8. Datos químicos de las muestras de leche.
- Tabla 9. Abreviaturas empleadas para las muestras de leche de vaca y cabra.
- Tabla 10. Resultados obtenidos del análisis por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-1)
- .



Lista de Figuras

- Figura 1. Almacenamiento refrigerado de leche de vaca.
- Figura 2. Producción de los ganaderos españoles en 2018.
- Figura 3. Interpretación del test de inhibidores [11].
- Figura 4. Diagrama electroforético de las proteínas del suero de la leche [17].
- Figura 5. Distribución de los sabores en la superficie de lengua.
- Figura 6. Esquema del funcionamiento de una lengua electrónica.
- Figura 7. Dispositivo utilizado en el desarrollo de la lengua potenciométrica.
- Figura 8. Membranas colocadas sobre el soporte.
- Figura 9. Disposición de la celda electroquímica y el equipo de medida, a la derecha equipo de medida data logger.
- Figura 10. Ejemplo de registro de una medida.
- Figura 11. a) Vortex; b) microbalanza y c) placa de agitación magnética.
- Figura 12. Esquema e imagen de la colocación de la lengua potenciométrica.
- Figura 13. Representación de los cinco sabores básicos.
- Figura 14. PCA de los sabores.
- Figura 15. Disoluciones patrón de cloruro de calcio.
- Figura 16. Disoluciones patrón de cloruro de potasio.
- Figura 17. Disoluciones patrón de cloruro de sodio.
- Figura 18. Disoluciones patrón de cloruro de amonio.
- Figura 19. Disoluciones patrón de cloruro de magnesio.
- Figura 20. Gráficos con el valor de las pendientes obtenidas por las diferentes membranas y sales.
- Figura 21. Disolución patrón de ácido cítrico.
- Figura 22. Disolución patrón de ácido láctico.
- Figura 23. Ejemplo de membranas para las concentraciones 0,1 M, 0,01 M y 0,001M.
- Figura 24. Valores de las pendientes obtenidas para cada sensor.
- Figura 25. Disolución patrón de urea.
- Figura 26. Disolución patrón de lactosa.
- Figura 27. Disolución patrón de glucosa.
- Figura 28. Disolución patrón de galactosa.
- Figura 29. Disoluciones patrón de glutamato monosódico.
- Figura 30. Disoluciones patrón de galactosas medidas con lengua biopotenciométrica.
- Figura 31. Comparación de medidas de galactosa de membranas sin y con enzima.
- Figura 32. Diferenciación entre leches de vaca crudas y pasteurizadas sin adulteración.
- Figura 33. PCA de leches de vaca crudas y pasteurizadas sin adulteración.



Figura 34. Diferenciación entre leche de vaca sin pasteurizar, pasteurizada y leche con restos de medicación.

Figura 35. PCA leche sin pasteurizar (cruda), pasteurizada y con tratamiento médico.

Figura 36. Diferenciación entre leche de vaca sin pasteurizar (cruda) y adulterada.

Figura 37. Diferenciación entre leche de vaca pasteurizada y adulterada.

Figura 38. PCA de las leches de vaca sin pasteurizar (cruda) y adulteradas.

Figura 39. PCA de leches de vaca pasteurizadas y adulteradas.

Figura 40. PCA conjunto de leches pasteurizadas y sin pasteurizar, con y sin adulteración.

Figura 41. Diferenciación de leche de vaca, cabra y mezcla.

Figura 42. PCA de leche cruda de vaca, leche cruda de cabra y mezcla de leche de vaca y cabra 1:1.

Figura 43. Diferenciación entre leche de cabra con y sin adulteración.

Figura 44. PCA Leches crudas de vaca y cabra, adulteradas y mezcla vaca/cabra.

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN DEL TFG

El sector lácteo, dentro de la industria agroalimentaria, factura alrededor de 13.000 millones de euros al año, siendo uno de los pilares de la industria agroalimentaria. En España, la mayoría de la producción en el sector es de leche de vaca y se produce principalmente en Galicia, Asturias y Castilla y León.

Dentro del sector, debido a la gran producción existente, los parámetros para una calidad y sabor óptimos de los diferentes tipos de leche se establecen por legislación y son muy estrictos, debido a que deben proteger al consumidor final de fraudes e intoxicaciones.

Actualmente, los métodos de análisis convencionales (cromatografía, espectroscopía, citometría, etc.) no son inmediatos y no se pueden realizar *in situ*, lo que facilitaría a los ganaderos y transportistas el análisis de parámetros de interés de forma rápida. En el caso de los ganaderos productores de leche un análisis inmediato les daría la oportunidad de mejorar la calidad del producto diariamente, y en el caso de los transportistas asegurarse de que el producto que trasladan a fábrica tiene la calidad requerida. Estos análisis también servirían para detectar las posibles adulteraciones o alteraciones de la leche antes de su transporte.

En los últimos años, dentro del grupo de investigación UVaSens, dirigido por la prof. María Luz Rodríguez Mendéz, del Departamento de Química Física y Química Inorgánica de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid (UVa), se han desarrollado lenguas electrónicas y bioelectrónicas para el análisis de diferentes alimentos, entre ellos vino, zumos, y leche, con el fin de diseñar sensores capaces de detectar los componentes químicos y diferenciar entre ellos de forma rápida y eficaz. Los dispositivos desarrollados para estos estudios se basan en lenguas electrónicas y bioelectrónicas.

1.2. OBJETIVOS

El objetivo principal que persigue la realización de este Trabajo Fin de Grado es el desarrollo y optimización de una lengua potenciométrica y su aplicación en el estudio de muestras de leche con y sin adulteración.

Para conseguir el objetivo propuesto, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:



1. Construcción de una lengua potenciométrica basada en membranas de ion selectivo.
2. Acondicionamiento y calibrado de la lengua potenciométrica desarrollada.
3. Estudio de la capacidad de la lengua potenciométrica para distinguir entre los diferentes sabores básicos (salado, dulce, amargo, ácido y umami) mediante el análisis de disoluciones patrón.
4. Estudio de la capacidad de la lengua potenciométrica para distinguir entre diferentes muestras de leche de vaca: con y sin adulteraciones, con y sin modificación por medicamentos y con mezcla de leche de cabra.
5. Aplicación de tratamientos estadísticos multivariantes en los datos potenciométricos obtenidos en los diferentes análisis. Para ello, se realizó el Análisis de Componentes Principales (PCA), para el estudio de discriminación entre las diferentes muestras, y el análisis de Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), para establecer correlaciones entre los datos químicos obtenidos por métodos tradicionales de análisis y los datos obtenidos con la lengua potenciométrica.
6. Estudio de la viabilidad de la lengua biopotenciométrica introduciendo sensores modificados con galactosa oxidasa, específico para la detección de galactosa.

Capítulo 2:

FUNDAMENTO TEÓRICO



2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. LECHE: DEFINICIÓN, COMPOSICIÓN Y TIPOS

Se define leche de vaca como el fluido biológico que segregan las vacas en las glándulas mamarias; íntegro, sin alteraciones, ni adulteraciones ni calostros, obtenido mediante un ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido [1-3].



Figura 1. Almacenamiento refrigerado de leche de vaca.

La leche de vaca es un fluido heterogéneo, compuesto de una emulsión de materia grasa, en forma globular, en un líquido que es asimismo una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por azúcares y sales minerales propios de la leche [1,2].

Tabla 1. Composición básica de algunos tipos de leche [1].

Componentes (%)	Vaca	Cabra	Oveja
Agua	83,5	87,9	80,1
Proteínas	3,2	3,4	6,2
Grasas	3,6	3,8	7,9
Hidratos de carbono	4,7	4,1	4,9
Caseína	2,6	2,4	4,2
Albúminas, Globulina	0,6	0,6	1,0
Cenizas	0,7	0,8	0,9

A continuación, se describe con más detalle los componentes químicos de la leche de vaca.



2.1.1. Composición química de la leche

Como ya se ha escrito anteriormente, la leche de vaca es un fluido heterogéneo, una emulsión de materia grasa y un líquido en el cual se encuentran en suspensión proteínas y un suero, que contiene azúcares, principalmente lactosa, vitaminas y sales minerales. Todos estos componentes son considerados de interés en la alimentación humana [3].

Las proteínas que aporta la leche de vaca como complemento de la alimentación de un ser humano tienen un alto valor biológico y elevada digestibilidad y, además, presenta una composición de aminoácidos equilibrada y esencial para el correcto crecimiento y desarrollo de un ser humano. La estabilidad de estas proteínas condiciona las propiedades fisicoquímicas de la leche. Principalmente se diferencia entre dos grupos de proteínas: las caseínas y las proteínas séricas o solubles. Las caseínas, constituyen aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche, se encuentran en suspensión formando micelas. Los tipos de caseínas que se encuentran principalmente son cuatro tipos: alfa (α), beta (β), kappa (κ) y gamma (γ). De este grupo, la caseína kappa es la más importante pues de ella depende la formación de las micelas junto con el calcio y el fósforo, principalmente. Las proteínas séricas, o proteínas del suero, representan el 20% aproximadamente de las proteínas de la leche de vaca y son, principalmente, α -lactoalbúminas, β -lactoglobulinas, seroalbúminas e inmunoglobulinas [1].

Otras de las proteínas presentes en la leche son las enzimas que tienen tres orígenes diferentes: de la propia leche, de los microorganismos que pueden entrar en el periodo de ordeño y de los posibles microorganismos que adquiere al ser manipulada. Entre las múltiples enzimas que contiene la leche, se encuentran las enzimas fosfatasa alcalina, lipasa, proteasa, lactasa, lisozima y catalasa [1].

La materia grasa presente en la leche es una mezcla muy compleja de ácidos grasos y otras moléculas grasas. Los lípidos de la leche de vaca se encuentran formando microgránulos en suspensión acuosa. Los triglicéridos, que representan un 98% de la materia grasa, son los responsables del sabor de los derivados de la leche. Los fosfolípidos, que se encuentran en menor cantidad (0,8% de la materia grasa), se encuentran en las membranas de glóbulos o en la fase acuosa [1].

La lactosa es el hidrato de carbono más relevante presente en la leche. Consiste en un disacárido formado por una molécula de glucosa y una molécula de galactosa. Aporta sabor dulce a la leche, aunque se enmascara por la presencia de la caseína. Estos azúcares tienen la propiedad de poder ser fermentados por medio de la fermentación láctica a ácido láctico, que es responsable de la coagulación ácida de la leche [1].



Los minerales de la leche están en una proporción muy pequeña, 0,5-1%, y la mayoría de las sales presentes se encuentran enlazadas a la caseína o disueltas en el suero de la leche. Los minerales que se encuentran en la leche con mayor proporción son los cloruros, fosfatos, citratos de potasio, calcio, sodio y magnesio, a éstos se les denomina macroelementos y, en menor proporción, se encuentran aluminio, zinc, manganeso, hierro y cobre, denominados como oligoelementos. Todos estos compuestos tienen una gran importancia en la estabilidad de la leche y, en concreto, en la estabilidad de las proteínas de la leche que depende del equilibrio iónico de los principales iones de la leche [1].

Por último, la leche contiene numerosas vitaminas que se encuentran en muy pequeña cantidad, pero que tienen un alto interés biológico, ya que son necesarias para el correcto rendimiento de los procesos vitales. Entre ellas se encuentran las vitaminas liposolubles como la vitamina A, D, E y K, y las vitaminas hidrosolubles como la vitamina B1, B2, B6, B12 y C [1].

2.1.2. Propiedades físico-químicas de la leche de vaca

Los principales parámetros físico-químicos de la leche de vaca son los siguientes [1]:

- **Punto de congelación.** Se encuentra entre -0,53 y -0,57 °C.
- **Punto de ebullición.** Superior al del agua, 100,17 °C.
- **Densidad.** El valor habitual está entre 1,0231 y 1,0398.
- **Viscosidad.** Es superior a la del agua debido a la materia grasa y a las macromoléculas proteicas.
- **pH.** Se encuentra entre 6,65–6,71 y es fácilmente alterable.
- **Apariencia.** Es un líquido opaco y generalmente blanco.

2.1.3. Tipos de leche y su clasificación

Existen muchos tipos de clasificación para la leche de consumo humano, algunos de ellos comprenden hasta 9 tipos de leches diferentes.

2.1.3.1. Según el tratamiento térmico para su conservación y consumo

La leche puede ser [4,5]:

- **Leche cruda:** sin tratamiento térmico, es difícil de encontrar en tiendas, pero en algunos casos los productores la venden directamente al cliente.



- **Leche UHT:** se somete a una temperatura de 130-140 °C durante un periodo de 25 segundos, después es enfriada rápidamente a 32 °C. Este tipo de leche es la más común de encontrar en el mercado. Se almacena en tetrabriks y puede conservarse a temperatura ambiente durante 3-6 meses.
- **Leche pasteurizada:** en este caso, se somete a una temperatura de 71-72 °C durante 15 segundos, destruyéndose solo los organismos patógenos, no aquellos que degradan la leche, por lo que dura pocos días y se debe conservar refrigerada.

2.1.3.2. Según su contenido nutricional

La leche puede ser [6]:

- **Leche entera:** este tipo de leche es aquella que no ha sido modificada químicamente, es rica en grasas saturadas. Se presenta generalmente como leche UHT.
- **Leche semidesnatada:** se elimina parte de la materia grasa de la leche dejando como mínimo un 1% en peso de materia grasa. Conserva las vitaminas liposolubles y parte de los ácidos grasos.
- **Leche desnatada:** se elimina la mayor parte de la grasa debiendo contener como máximo un 1% de materia grasa. Aporta proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales con un bajo valor energético. El principal inconveniente es que se pierden las vitaminas liposolubles y deben ser reincorporadas de forma artificial.
- **Leche sin lactosa:** es un derivado de la leche desnatada, con una menor presencia de azúcares, sobre todo lactosa. El resto de azúcares se someten a un proceso de hidrólisis y se dividen en glucosa y galactosa, que son azúcares de fácil digestión.
- **Leche con Omega-3:** en este tipo de leche se ha producido un cambio en su composición sustituyendo los ácidos grasos saturados por ácidos grasos insaturados, Omega-3.
- **Leches enriquecidas:** tienen como base la leche desnatada. En el proceso de desnatado se pierden nutrientes importantes para la salud, que pueden ser repuestos en una proporción igual o mayor a la presente en la leche de forma natural. De este modo, la leche se puede enriquecer con fósforo, vitaminas o proteínas. En este caso, el aditivo utilizado debe estar correctamente indicado en el etiquetado del envase.



2.1.3.3. Según el estado físico que presente

La leche puede ser [5]:

- **Leche líquida:** es la forma más común.
- **Leche evaporada:** se elimina el 60% del agua en un proceso industrial que conlleva una pasteurización-homogeneización- evaporación.
- **Leche condensada:** es leche concentrada con azúcar donde también se elimina parte del agua. El azúcar utilizado es sacarosa y representa el 40-50% del producto final. Para disolver el azúcar se calienta la leche a 125 °C, se evapora a vacío y, por último, tras un enfriamiento, se envasa.
- **Leche en polvo:** se compone de leche deshidratada con un contenido inferior al 5% en agua. El proceso de obtención conlleva una evaporación hasta una concentración del 50% en sólidos, posterior deshidratación y, por último, una granulación.

2.2. EL SECTOR LÁCTEO EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

Dentro de la industria agroalimentaria, el sector lácteo español factura alrededor 13.000 millones de euros al año, siendo uno de los pilares principales de la industria alimentaria en España y generando más de 60.000 empleos directos en la producción, transformación y comercialización de leche y productos lácteos derivados [7].

En 2018, se realizaron entregas en el sector lácteo de, aproximadamente, 23.000 ganaderos, los cuales se pueden clasificar en función del tipo de leche. En la figura 2, se observa el tipo de leche y su producción en 2018, donde se puede observar que la materia predominante es la leche de vaca, seguida de la de cabra y de la de oveja en menor proporción.

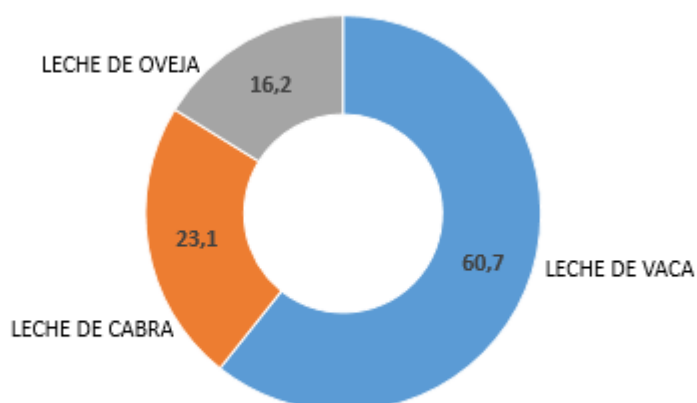


Figura 1. Producción de los ganaderos españoles en 2018.

Dentro del territorio español, los productores de leche se distribuyen de la siguiente forma [7]:

- Leche de vaca: Galicia, Asturias, Castilla y León, País Vasco y Andalucía.
- Leche de cabra: Andalucía, Castilla la Mancha y Extremadura.
- Leche de oveja: Castilla y León y Castilla la Mancha.

En Europa, España destaca en la producción de leche de vaca dentro del sector lácteo, siendo el séptimo productor. En 2017 se contaba en el territorio español con 823.390 vacas de ordeño, de las cuales el 42% se situaban en la provincia de Galicia, el 11,4% en Castilla y León y el 9% en Cataluña. Las entregas de leche a la industria fueron de 7.020.884,6 toneladas. En la siguiente tabla se muestra el progreso anual entre 2015-2017 de la leche de vaca en España, la Unión Europea y a nivel mundial:

Tabla 2. Producciones de leche de vaca en el Mundo, en la Unión Europea y en España [8].

	Miles de toneladas de leche		
	2015	2016	2017
MUNDO	582.806	589.242	598.528
UE	154.550	156.400	155.933
ESPAÑA	6.793	6.886	7.021



2.3. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LECHE

Los laboratorios de análisis de leche y de productos lácteos utilizan diferentes técnicas para determinar los parámetros que deben cumplir estos productos antes de llegar al consumidor. Los análisis obligatorios para la leche están establecidos por el Real Decreto 1728/2007 21 de diciembre, por el que se establece “la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo” y se modifica el Real Decreto 217/2004 de 6 de febrero, por el que “se regula la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche” [9]. Estos análisis incluyen la determinación del punto crioscópico, de la materia grasa, de la cantidad de proteínas, del extracto seco magro (ESM), de la cantidad de células somáticas, de las colonias de gérmenes a 30°C y de la presencia de antibióticos. Por otro lado, también se puede incluir, de forma individual, la determinación de la acidez de la leche.

A continuación, se describen con más detalle los análisis que se realizan para el control de calidad de la leche.

Determinación del punto crioscópico: este parámetro evalúa la cantidad de agua presente en la leche. Se considera un parámetro físico de gran interés. Se evalúa comparando el punto de congelación del agua y la leche. La referencia es agua porque la leche se considera como un solvente disuelto en agua. La diferencia entre la curva de congelación del agua y de la leche se denomina descenso crioscópico que es directamente proporcional a la concentración de soluto presente en la leche.

La leche es una solución en la cual se encuentran biopolímeros, electrolitos y no electrolitos disueltos en agua, por ello la leche tiene un punto de congelación inferior al agua. El valor normal para este parámetro en leches crudas o en leches pasteurizadas debe estar entre -0,540 y -0,555°C. Para poder determinarlo experimentalmente se necesita una muestra de leche fresca [10].

Determinación de la materia grasa: para su determinación se debe separar la leche del resto de componentes mediante la rotura de la forma globular de la grasa o por extracción de la grasa mediante disolventes. Para el proceso de determinación se utiliza el método volumétrico Gerber, que consiste en medir el volumen de grasa que ha sido separada de la fase acuosa de la leche mediante un proceso de centrifugación de forma precisa y rápida. En primer lugar, se produce la liberación total de la materia grasa por disolución de las proteínas y después se separa mecánicamente por centrifugación. El valor de grasa se expresa en % por 100 ml de leche. Para la leche de vaca, los valores, según la normativa, deben ser iguales o superiores a 3,6% [11].



Determinación de proteínas en la leche: el contenido proteico de la leche se evalúa en función del % de nitrógeno en peso multiplicado por un factor de conversión. Para la determinación del nitrógeno se utiliza el método Kjeldahl, que consiste en adicionar a una muestra de leche una cantidad de ácido sulfúrico, en presencia de óxido de mercurio II, como catalizador para transformar el nitrógeno presente en los compuestos orgánicos en nitrógeno amoniacal. Este amoniaco se libera con la adición de hidróxido sódico. Después se destila y se recoge sobre ácido bórico. Posteriormente, se realiza la valoración con ácido clorhídrico. A partir de este dato y con un factor de conversión se calcula el % de nitrógeno en peso de la muestra. El valor normal exigido por empresas del sector es de 3,10% [12].

Determinación del extracto seco magro (ESM): este parámetro se calcula a partir del valor del extracto seco y el porcentaje de materia grasa. Para obtener el porcentaje de extracto seco se debe pesar una muestra de leche y llevarla a un desecador a temperatura constante. Tras el proceso de desecación se vuelve a pesar y se obtiene el porcentaje de extracto seco mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Extracto Seco} = \frac{\text{Peso después de desecación}}{\text{Peso antes de desecación}} \times 100 \quad (1)$$

El valor aceptado para el ESM debe ser igual o superior a 8,2% [12].

Determinación de las células somáticas: este parámetro se emplea, principalmente, para comprobar la existencia de ganado con mamitis. Su valor normal oscila entre 200.000 células/ml y 400.000 células/ml. Si este valor se encuentra por encima de 400.000 células/ml, indica que hay presencia de ganado enfermo. Para medir el número de células somáticas se emplea un método de tinción del ADN y posteriormente, se emplean equipos electrónicos muy precisos y rápidos para cuantificar de forma exacta el número de células [13].

Determinación de las colonias de gérmenes a 30°C: a partir de este análisis se evaluará la higiene y control en el ordeño, así como su almacenamiento y el transporte de la leche. Para realizar el recuento de colonias se pueden emplear dos técnicas diferentes. Normalmente se analiza mediante la técnica de recuento en placa, para la cual se necesita una muestra de leche que esté refrigerada a 6°C y se debe evaluar en menos de 24 horas tras el ordeño. Otra técnica emplea un equipo automático de análisis por citometría de flujo. El valor del recuento no puede ser superior a 100.000 UFC/ml (UFC: unidad formadora de colonias) para considerar la muestra de leche con calidad higiénica [9,11].

Determinación de presencia de antibióticos o inhibidores: la determinación de estas sustancias se realiza para observar la presencia de β -lactámicos y



tetraciclinas, que hacen a la leche no apta para el consumo humano. El método empleado es una cromatografía en papel, para el análisis empleado se emplearán dos receptores en una misma reacción. En el momento en el que se pone en contacto el reactivo del microtubo con la muestra de leche, los receptores se pueden unir a los analitos correspondientes presentes en la muestra y dar diferentes coloraciones en función de la presencia, o no, de las sustancias antibióticas mencionadas [11]. Las formas en las cuales puede presentarse el resultado del test se presenta en la Figura 3:

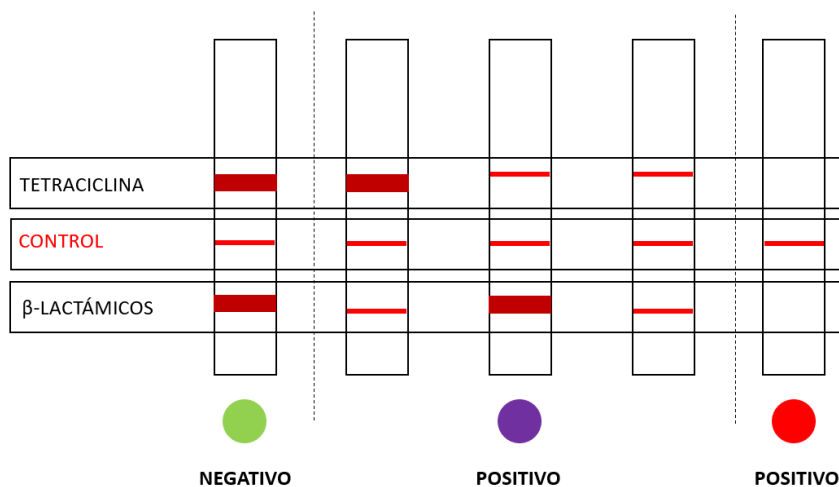


Figura 2. Interpretación del test de inhibidores [11].

Determinación de la acidez: se utiliza para determinar si la leche se ha conservado de forma correcta y es apta para su manipulación y transformación de forma industrial. Para el procedimiento de medida se debe homogeneizar la muestra de leche y adicionar entre 3 y 5 gotas de fenolftaleína. Después, se rellena una bureta con sosa y por goteo se vierte sobre la leche con agitación constante. Una vez se observa un tono rosa suave y se mantiene se habrá concluido la valoración, se leen los ml de sosa empleados y se expresarán en grados Dronic. Un grado Dronic ($^{\circ}D$) equivale a 0,1 ml de sosa. La leche posee una acidez normal debida a su composición en la cual presenta sustancias como el ácido cítrico, anhídrido carbónico, la caseína, la lacto albúmina, fosfatos y cloruros que le aportan carácter ácido. Por ello, los valores que se han establecido como valores regulares para la leche están entre 14-18 $^{\circ}D$. Cualquier muestra por debajo, o por encima, del valor de este intervalo no se considerará apta para consumo [11].

En la Tabla 3 se recogen los valores de los parámetros químicos convencionales.



Tabla 3. Parámetros analíticos convencionales de la leche.

Parámetros	Leche de vaca
Materia grasa (%)	3,6
Proteínas (%)	3,1
ESM (%)	8,2
Punto crioscópico (°C)	0,540-0,555
Acidez (°Dronic)	14-18
Células somáticas (cel/ml)	<400.000
Colonias de gérmenes a 30°C (UFC/ml)	<100.000

2.4. TIPOS DE ADULTERACIONES EN LA LECHE

La adulteración o modificación de la leche cruda está regulada por el Código del Sector de Productos Lácteos, que establece la prohibición de adicionar o sustraer, así como sustituir elementos propios de la leche [14]. Así mismo, este código también establece que la leche que contenga menos de 2,5% de proteínas debe ser analizada por posible adulteración [15].

Un ejemplo de leche adulterada es el caso descubierto en un municipio de la provincia de Lugo en el que, entre los años 2010 y 2011, varios ganaderos de la localidad, junto con un transportista, añadían agua a la leche con fines lucrativos. Esta práctica se realizó durante meses hasta que se descubrió el fraude.

2.4.1. Adulteración de leche con agua

Cuando se añade agua a la leche se hace variar su composición y, además, se aumenta el riesgo de contaminación microbiológica, se diluyen los nutrientes y sus propiedades fisicoquímicas se ven alteradas. En algunos casos se intenta enmascarar el adulterado con la adición de sólidos como féculas o almidones, sacarosa y cloruros [10].

Algunas formas básicas de detección de este fraude son:

- Medir la densidad de la muestra adulterada, aunque sólo es aceptable con adiciones por encima del 10% de agua.
- Para saber con exactitud si una muestra de leche ha sido adulterada con agua se emplea el análisis de punto crioscópico. Este valor, expresado en grados centígrados, nos indica si el punto de congelación de la muestra está dentro del rango normal. El valor normal para el punto crioscópico está comprendido entre -0,540 y -0,555°C [10].



2.4.2. Adulteración de leche por mezclas entre leche de origen bovino y caprino

La mezcla de leche de cabra con leche de vaca se lleva a cabo para aumentar el volumen de leche de cabra ya que ésta tiene mayor valor en el mercado, además de para emplear el excedente de leche de vaca de algunos productores, que suele ser pagado a un precio inferior por las empresas. Esta práctica se lleva a cabo tanto con leche como con productos derivados como puede ser el queso.

Para la determinación de este tipo de mezclas se utiliza un método electroforético en el que se determina el comportamiento de las proteínas del suero de la leche. Este método se realiza usando 10 ml de leche cruda o pasteurizada, fresca o conservada por proceso de congelación o adición de dicromato potásico. La técnica de electroforesis se basa en la separación por migración diferencial de iones, macromoléculas, células, bacterias u hongos vivos o materia inerte en un campo eléctrico. En el caso de los análisis de leche se analizan las proteínas que se detallan a continuación, obteniéndose un diagrama de bandas, figura 4 [19]. Una vez realizado el ensayo electroforético, se realiza una densitometría y la cuantificación de las bandas [16,17].

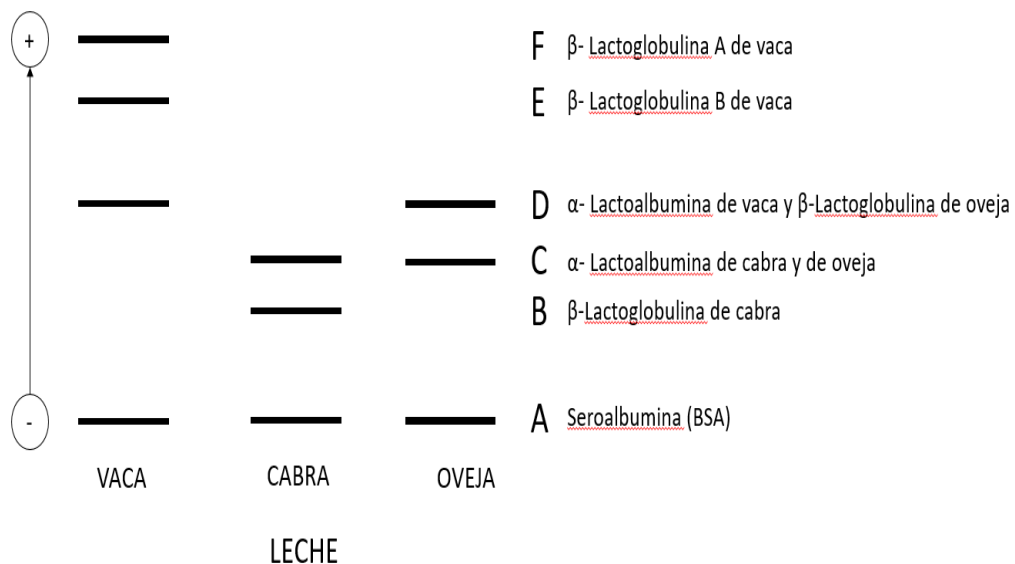


Figura 3. Diagrama electroforético de las proteínas del suero de la leche [17].



2.5. EL SENTIDO DEL GUSTO: LOS SABORES

El sentido del gusto es a través del cual se percibe las sustancias químicas que provienen de los alimentos ingeridos cuando éstos entran en contacto con la saliva y se disuelven en ella, llegando así a los receptores sensoriales que envían impulsos al cerebro. Los receptores sensoriales se encuentran en pequeñas estructuras llamadas papilas gustativas. El órgano que alberga las papilas gustativas en mayor proporción es la lengua, un órgano de superficie rugosa debido a que las papilas que lo recubren, las cuales tienen diferentes formas y se distribuyen por la lengua en función del tipo [18].

El ser humano puede detectar cinco sabores que se distribuyen en la superficie de la lengua como se observa en la Figura 5.

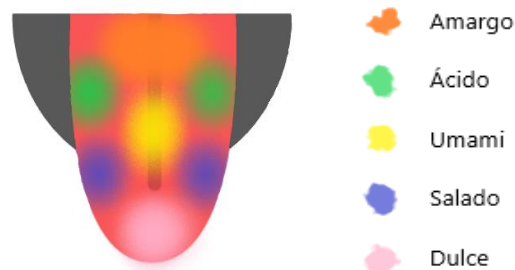


Figura 4. Distribución de los sabores en la superficie de lengua.

La definición de los sabores es, de forma breve, la siguiente [18]:

- **Amargo:** es el sabor que se identifica con las sustancias tóxicas. Generalmente se le asocia a alimentos o sustancias desagradables. Este sabor está proporcionado por sales inorgánicas. Algunos de los alimentos aceptados como amargos son el café, la cerveza o el cacao puro.
- **Ácido:** este sabor se asocia a las sustancias agrias. Se identifica en alimentos en mal estado. También está asociado a los cítricos.
- **Salado:** se produce por la detección de cloruro sódico y otras sales. Ayuda a controlar el equilibrio electrolítico del organismo y a mantener la homeóstasis.
- **Dulce:** es el sabor más agradable. Se asocia a los compuestos hidrocarbonados como son los azúcares. Además, es el sabor que mayor aceptación provoca al ingerirlo.

- **Umami:** este sabor ha sido definido hace pocos años. Su percepción se debe al glutamato monosódico y al aspartato. Es uno de los sabores más agradables, junto con el dulce.

2.6. LENGUAS ELECTRÓNICAS

La lengua electrónica es un instrumento analítico compuesto de una red de varios sensores químicos con baja especificidad, poco selectivos, con alta estabilidad y sensibilidad cruzada ante los diferentes componentes de una disolución. La sensibilidad de los sensores junto con un tratamiento estadístico adecuado hace que este instrumento sea ideal en el caso de medidas rápidas y sencillas, además este tipo de sensor es de bajo coste [9,20].

El principio de funcionamiento de las lenguas electrónicas se basa en el análisis de propiedades físicas, químicas o/y bioquímicas. Para ello, el conjunto de sensores que forman la red transducen estas cualidades a señales de tipo analíticas. Los datos recogidos son tratados mediante análisis quimiométricos que proporcionan información para poder discriminar la muestra [19]. Estas redes buscan asemejarse al funcionamiento de nuestros sentidos, en concreto el sentido del gusto. En la figura 6 se muestra un esquema que representa el funcionamiento de una lengua electrónica.

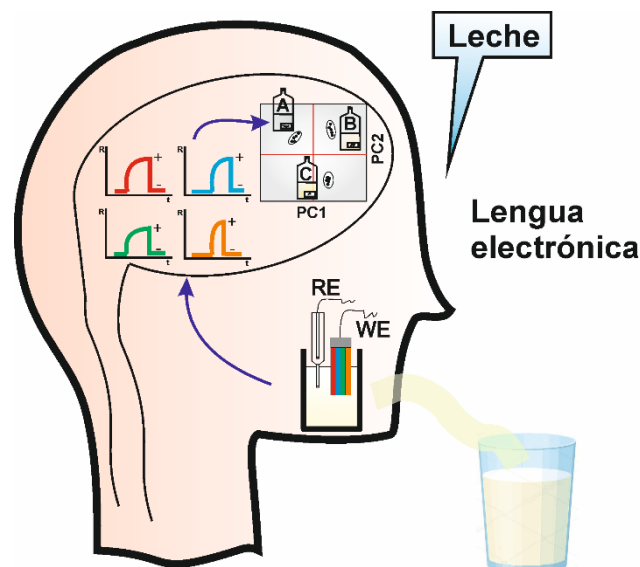


Figura 5. Esquema del funcionamiento de una lengua electrónica.

Este tipo de instrumento comenzó a implementarse con el uso de redes de sensores para el análisis de metales pesados e iones en la década de 1990. Además, en los últimos años se han aplicado en la evaluación del sabor y deterioro de productos alimenticios [19,21].



Además, en el grupo de investigación UVaSens se han desarrollado lenguas electrónicas para el análisis de vinos [22,32], en estos últimos años. También se ha comenzado, en los últimos meses el estudio del uso de lenguas electrónicas para el análisis de leche [23].

Las lenguas electrónicas aportan muchas ventajas frente a los sistemas de medida tradicionales [24]:

- Reduce el coste de los análisis en comparación con los realizados con los equipos actuales como son los cromatógrafos.
- Las medidas son realizadas en tiempos breves y de forma sencilla.
- Los sensores son químicamente resistentes, de fácil limpieza y, en algunos casos, los materiales pueden ser esterilizados. Esto depende principalmente de los materiales empleados en los sensores.
- Los sensores se pueden modificar para obtener una alta especificidad.
- Las medidas realizadas se pueden llevar a cabo en continuo, permitiendo detectar fácilmente anomalías y corregirlas en poco tiempo.
- Se puede implementar de forma automática en una línea de producción industrial debido a su resistencia y ligereza. Además, gracias al sistema de medida en continuo, es posible ver la evolución y trazabilidad de la línea de producción de forma fácil y automática [24].

2.6.1. Sensores utilizados en lenguas electrónicas

2.6.1.1. Sensores y biosensores químicos

Un sensor químico es un elemento diseñado para detectar de forma selectiva un compuesto de interés en un medio y transformar la señal química detectada en una señal analógica. La forma de detección del compuesto de interés en un sensor químico es mediante la reacción química del compuesto con el sensor. Un sensor está compuesto por una parte de detección química y un transductor. Existen varios tipos de sensores químicos [25].

Un biosensor químico es un tipo de sensor que aprovecha las reacciones o interacciones propias de los organismos como son anticuerpo/antígeno, o enzima/sustrato, etc. Está compuesto por un componente biológico como enzimas, microorganismos, etc., combinado con el componente químico propio del sensor o con un compuesto con el que pueda interactuar.

Existen varios tipos de sensores químicos [25,26]:

- **Electroquímicos:** este tipo de sensores incluye a los sensores potenciométricos y los voltamétricos o amperométricos.



- **Sensores voltamétricos:** se basan en la medida de los cambios de corriente que se producen sobre el electrodo de trabajo cuando se le aplica un potencial variable. El sistema más básico de voltametría es aquel que cuenta con tres electrodos, el de trabajo, el de referencia y el contra electrodo.
- **Sensores amperométricos:** se basan en la medida de la intensidad de corriente resultante de la reacción de oxidación o reducción en la superficie del electrodo de trabajo cuando el potencial aplicado es constante. Para realizar la medida se utilizan tres electrodos como en el caso de los voltamétricos [28].
- **Sensores potenciométricos:** se basan en la medida de la diferencia de potencial que se produce en el electrodo de trabajo cuando no se ha aplicado corriente al sistema. El sistema está formado por un electrodo de trabajo y por un electrodo de referencia.
- **Ópticos:** se basan en la medida del cambio en una característica espectroscópica asociada a las reacciones químicas. La medida de la luminiscencia, absorbancia y reflectancia son las técnicas más utilizadas por este tipo de sensores.
- **Másicos o piezoeléctricos:** se fundamentan en la microgravimetría, mide los cambios de masa que se producen en el aparato de medición por la interacción con las especies químicas [25].
- **Calorimétricos:** se basan en medir el calor de la reacción química que involucra al analito estudiado. Generalmente, se emplea un termómetro de platino para controlar la reacción y como transductor.

En el presente TFG se ha utilizado una lengua electrónica potenciométrica. A continuación, se describe con más detalle el funcionamiento de los sensores potenciométricos.

2.6.1.2 Sensor potenciométrico

Se basa en el estudio del potencial eléctrico que presenta la superficie del material del sensor al introducirlo en una solución que contiene iones cuando en el sistema la corriente es cero. Los iones interactúan con la superficie del sensor y crean un potencial superficial. La intensidad del potencial está relacionada con la concentración de iones en la solución [25,26,28].

Los sensores potenciométricos están compuestos por un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. El **electrodo de referencia** debe tener un potencial reproducible y conocido, debe ser fácil de instalar y mantenerse estable



con el paso de pequeñas corrientes. En cuanto al **electrodo de trabajo**, existen varios tipos, en función del material del que están formados [26,27,28]:

- **Electrodos de membrana sólida:**
 - **De cristal:** estos sensores están compuestos de óxido de silicio (SiO_2), los intercambios se realizan sobre las imperfecciones del cristal. Son selectivos para iones como H^+ , Na^+ y NH_4^+ .
 - **De sales inorgánicas poco solubles:** está formado por una sal inorgánica o por polvo prensado, por ejemplo, sal de fluoruro de lantano (LaF_3) dopado con iones de europio que se utiliza para determinar el ion fluoruro de forma selectiva.
 - **Polimérica con ionóforos inmovilizados:** está compuesto principalmente por una matriz polimérica en la que se encuentran embebidos compuestos selectivos a iones.
 - **Con enzimas inmovilizadas en geles:** en este caso las enzimas se encuentran incorporadas en la matriz o sobre una superficie de sustrato sólido. Estos sensores emplean el carácter catalítico de las enzimas en las reacciones.

Generalmente, en las lenguas potenciométricas, los electrodos de trabajo empleados son electrodos de membrana sólida con matriz de policloruro de vinilo (PVC), con un plastificante orgánico y un aditivo orgánico, en un rango de proporciones constantes. En este tipo de membranas, en ausencia de un ionóforo, el plastificante actuará como intercambiador de iones que producirá una variación del potencial [29]. En la Tabla 4 se recoge la concentración de los componentes de las membranas empleadas en el presente TFG, que son las empleadas por el grupo del Prof. Dias L. en sus estudios de análisis de leches [20].

Tabla 4. Rango de proporciones empleado para la formación de membranas potenciométricas [20].

Componente	%
PVC	31,9-32,3
Plastificante	64,7-65,2
Aditivo	2,8-3,2

2.6.1.3. Sensores biopotenciométricos

En cuanto a la aplicación de biosensores en dispositivos potenciométricos, existen hasta la fecha pocos estudios sobre lenguas electrónicas potenciométricas en las que incluyen sensores en los que se inmovilizan enzimas sobre la superficie de las membranas. Algunos de ellos se han destinado a la detección de urea, creatinina, amoníaco, sodio y potasio en fluidos biológicos y algunos alimentos.



Uno de los estudios con lenguas biopotenciométricas, desarrollado por el grupo del profesor Gutiérrez del instituto de microelectrónica de Barcelona IMB-CNM, empleó la enzima ureasa y la enzima creatinina aminohidrolasa en la determinación de urea y creatinina [21,30].

Actualmente, el desarrollo de lenguas biopotenciométricas basadas en el empleo de enzimas de interés es uno de los temas más candentes en el campo de investigación de las lenguas electrónicas.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS MULTIVARIANTES OBTENIDOS CON LENGUAS ELECTRÓNICAS

Los resultados obtenidos con lenguas electrónicas y/o bioelectrónicas dan lugar a una cantidad de datos muy vasta. Estos datos han de ser tratados estadísticamente con técnicas multivariantes apropiadas que ayuden a disminuir el tamaño del conjunto de datos. Los análisis estadísticos multivariantes más utilizados para analizar los datos obtenidos con lenguas electrónicas incluyen aquellos que permiten discriminar entre las muestras analizadas, como es el caso del análisis de componentes principales (PCA, de sus siglas en inglés), y otros que permiten realizar modelos de predicción que para correlacionar los datos obtenidos con la lengua electrónica con aquellos obtenidos mediante los análisis químicos tradicionales (véase apartado 2.3.), como es el análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS, de sus siglas en inglés) [23,30-32].

2.7.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales se basa en la reducción del conjunto de variables originales que están interrelacionadas a un conjunto menor formado por nuevas variables, denominadas componentes principales, de tal modo que se pierda cantidad de información posible en el proceso. Estas componentes obtenidas son independientes entre sí y resultan de las combinaciones lineales del conjunto de variables originales. Las correlaciones obtenidas se consideran óptimas cuando el número de variables disminuye y no se pierde información del conjunto inicial.

Las variables o componentes principales obtenidas se ordenan entre sí por la cantidad de varianza que representan, siendo la componente PC1, la que mayor información aporta seguida por la PC2, PC3 y así, sucesivamente [23,30].



2.7.2. Mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión por mínimos cuadrados se utiliza para establecer modelos de predicción a partir de las respuestas obtenidas del análisis instrumental (variable X), en este caso con la lengua potenciométrica, y los parámetros químicos obtenidos de los análisis químicos tradicionales (variable Y). De este modo, el análisis PLS modela simultáneamente las variables X e Y para encontrar las variables latentes en X que mejor predicen las variables latentes en Y. Los resultados obtenidos en la calibración se deben al ajuste de todos los datos, mientras que en la validación se comprueba el nivel de ajuste para nuevos datos [23,31,32].

2.8. LENGUAS ELECTRÓNICAS, AVANCES ACTUALES EN EL ANÁLISIS DE LECHE

Se han realizado muchos estudios con lenguas electrónicas en la industria alimentaria, en concreto para vino, zumos, aceite y leche principalmente. El uso de lenguas electrónicas en el análisis de la leche se ha extendido. En los últimos diez años se ha desarrollado mucho la implantación y diseño de lenguas electrónicas para su implantación en la industria láctea.

Existe una gran área de aplicación de estas lenguas electrónicas: evaluación de la frescura, crecimiento microbiano, seguimiento y estudios de control de calidad y detección de adulteraciones en leche y derivados lácteos. Los principales resultados se recogen en la referencia [21].

En la actualidad en el grupo de investigación en el cual se ha realizado este Trabajo de Fin de Grado (UVaSens) se ha comenzado a desarrollar diferentes lenguas electrónicas para el análisis de leche. [23]

Capítulo 3:

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este apartado se explicará con detalle el procedimiento experimental que se llevó a cabo durante la realización del trabajo de fin de grado.

3.1. MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1. Construcción del soporte de la lengua electrónica potenciométrica

En la elaboración de la lengua electrónica se utilizaron los siguientes materiales y reactivos para construir el dispositivo (Figura 7):

- Tubo cilíndrico de metacrilato.
- Hilo de cobre.
- Enganche tipo macho/hembra de 25 pines.
- Cable con pinza final.
- Loctite.
- Resina epoxi de plata E4110 10Z.
- Cloroformo.
- Laca de plata.

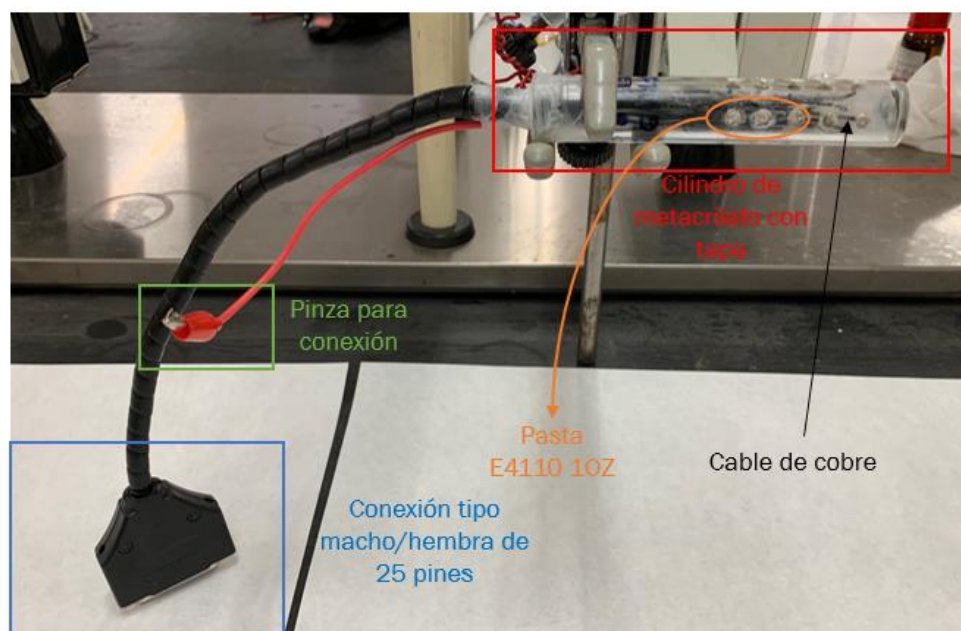


Figura 6. Dispositivo utilizado en el desarrollo de la lengua potenciométrica.



3.1.2. Membranas utilizadas como elemento sensible en las lenguas potenciométricas

Se ha empleado material de laboratorio de vidrio como pipetas Pasteur, viales, etc. En cuanto a los reactivos con los que se han elaborado las membranas, en la tabla 5 se recogen los aditivos y plastificantes empleados. La matriz que se ha empleado para mezclar el plastificante y el aditivo ha sido el policloruro de vinilo (PVC) de alto peso molecular.

Tabla 5. Componentes de las membranas [20].

	Nombre	Compuesto	Formula química
Plastificante	B	BIS(1-BUTYLPENTYL)ADIPATE	C ₂₄ H ₄₆ O ₄
	C	TRIS(2-ETHYLHEXYL)PHOSPHATE	C ₂₄ H ₅₁ O ₄ P
	D	DIBUTYL SEBACATE	C ₁₈ H ₃₄ O ₄
	E	2-NITROPHENYL-OCTYLETHER	C ₁₄ H ₂₁ NO ₃
	F	DIOCTYL PHENYLPHOSPHONATE	C ₂₂ H ₃₉ O ₃ P
Aditivo	1	OCTADECYLAMINE	C ₁₈ H ₃₉ N
	3	OLEYL ALCOHOL	C ₁₈ H ₃₆ O
	5	TRIDODECYLMETHYLAMMONIUM CHLORIDE	C ₃₇ H ₇₈ ClN
	6	OLEIC ACID	C ₁₈ H ₃₄ O ₂

A continuación, se detalla en la tabla 6 la composición de las membranas empleadas [20].



Tabla 6. Composición de las membranas empleadas.

Nº	Membrana	Aditivo (g)	Plastificante (g)	PVC (g)	% Aditivo	%Plastificante	%PVC
1	1B	0,0118	0,2636	0,1280	2,9205	65,3511	31,7285
2	1C	0,0120	0,2666	0,1310	2,9297	65,0879	31,9824
3	1D	0,0152	0,2635	0,1292	3,7264	64,5992	31,6744
4	1E	0,0121	0,2664	0,1285	2,9730	65,4545	31,5725
5	1F	0,0121	0,2626	0,1292	2,9861	65,0209	31,9930
Nº	Membrana	Aditivo (g)	Plastificante (g)	PVC (g)	% Aditivo	%Plastificante	%PVC
6	3B	0,0226	0,2658	0,1324	5,3707	63,1654	31,4639
7	3C	0,0186	0,2615	0,1287	4,5498	63,9661	31,4841
8	3D	0,0128	0,2694	0,1290	3,1128	65,5156	31,3716
9	3E	0,0121	0,2672	0,1284	2,9679	65,5384	31,4937
10	3F	0,0209	0,2617	0,1280	5,0901	63,7360	31,1739
Nº	Membrana	Aditivo (g)	Plastificante (g)	PVC (g)	% Aditivo	%Plastificante	%PVC
11	5B	0,0145	0,2702	0,1250	3,5392	65,9507	30,5101
12	5C	0,0121	0,2636	0,1433	2,8878	62,9117	34,2005
13	5D	0,0118	0,2690	0,1470	2,7583	62,8799	34,3619
14	5E	0,0140	0,2630	0,1274	3,4619	65,0346	31,5035
15	5F	0,0140	0,2620	0,1300	3,4483	64,5320	32,0197
Nº	Membrana	Aditivo (g)	Plastificante (g)	PVC (g)	% Aditivo	%Plastificante	%PVC
16	6B	0,0146	0,2713	0,1340	3,4770	64,6106	31,9124
17	6C	0,0208	0,2638	0,1267	5,0571	64,1381	30,8048
18	6D	0,0139	0,2876	0,1480	3,0923	63,9822	32,9255
19	6E	0,0162	0,2670	0,1304	3,9168	64,5551	31,5280
20	6F	0,0112	0,2849	0,1281	2,6403	67,1617	30,1980

Para homogeneizar la mezcla de los componentes de las membranas se ha usado tetrahidrofurano como disolvente. En la figura 8 se puede ver el resultado de cómo quedan las membranas colocadas en el soporte.

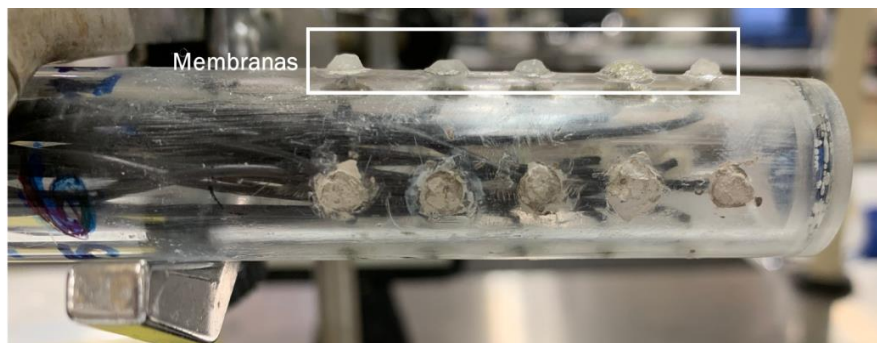


Figura 7. Membranas colocadas sobre el soporte.



3.1.3. Elaboración de la lengua biopotenciométrica

Los materiales y reactivos empleados para la preparación de la disolución de la enzima son:

- Material de vidrio de laboratorio.
- Eppendorf (1 ml).
- Buffer fosfato (pH 7,0)
- Agua Mili-Q.
- Enzima β -Galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.
- Glutaraldehído 2,5%.

3.1.4. Disoluciones patrón analizadas

Con el fin de calibrar la lengua potenciométrica y analizar su capacidad de discriminar entre los diferentes sabores, se analizaron las siguientes disoluciones (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de las disoluciones.

Nombre	Disoluciones	Concentraciones analizadas
Cloruro de potasio	KCl	0,01M; 0,1M; 0,2M; 0,5M
Cloruro de calcio	CaCl₂	0,01M; 0,1M; 0,2M; 0,5M
Cloruro de magnesio	MgCl₂	0,01M; 0,1M; 0,2M; 0,5M
Cloruro de sodio	NaCl	0,01M; 0,1M; 0,2M; 0,5M
Cloruro de amonio	NH₄Cl	0,01M; 0,1M; 0,2M; 0,5M
Urea	CH₄N₂O	0,0001M; 0,001M; 0,01M; 0,1M
Lactosa	C₁₂H₂₂O₁₁	0,0001M; 0,001M; 0,01M; 0,1M
Glucosa	C₆H₁₂O₆	0,0001M; 0,001M; 0,01M; 0,1M
Galactosa	C₆H₁₂O₆	0,0001M; 0,001M; 0,01M; 0,1M
Ácido cítrico	C₆H₈O₇	0,0001M; 0,001M; 0,01M; 0,1M
Ácido láctico	C₃H₆O₃	0,0001M; 0,001M; 0,01M; 0,1M
Ácido L-glutámico monosódico	C₅H₈NNaO₄	0,0001M; 0,001M; 0,01M; 0,1M

3.1.5. Muestras de leche analizadas

Para la realización de los análisis de leche se recogieron muestras de ganaderos locales, de Palencia y de Ávila. Se consiguieron 2 muestras de leche cruda de vaca y una de leche cruda de cabra respectivamente. Las muestras de

vaca se midieron sin pasteurizar (crudas) y pasteurizadas. También se consiguió un amuestra de leche de vaca que contenía restos de medicación.

Con el fin de establecer correlaciones entre los datos experimentales y los datos químicos, las muestras de leche procedentes de Palencia se analizaron en el Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León. Los datos químicos se recogen en la siguiente tabla 8.

Tabla 8. Datos químicos de las muestras de leche.

Muestra	Grasa	Proteína.	Lactosa	ESM	Cel. Somat.	P. Crioscópico.	Acidez
Unidades	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	%	cel/ml	°C	°Dronic
LC1	3,54	3,17	4,84	8,76	208000	-0,522	15,4
LP1	3,64	3,19	4,97	8,91	948000	-0,537	14,6
LC2	3,82	3,12	4,8	8,67	1355000	-0,517	14,6
LP2	3,88	3,17	4,93	8,85	989000	-0,533	14,8
LM	4,18	3,34	4,61	8,7	10539000	-0,523	16,8

3.2. EQUIPOS EMPLEADOS

Para la toma y registro de medidas de diferencia de potencial, se ha empleado un Data logger KEYSIGHT 34972A LXI Data Acquisition/Switch Unit (Figura 9) combinado con el software Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies), como procesador de los datos obtenidos por el equipo (Figura 10).

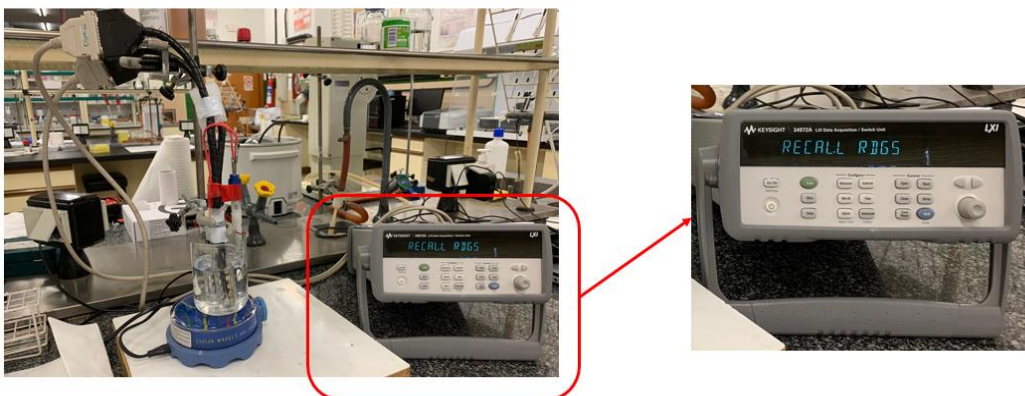


Figura 8. Disposición de la celda electroquímica y el equipo de medida, a la derecha equipo de medida data logger.

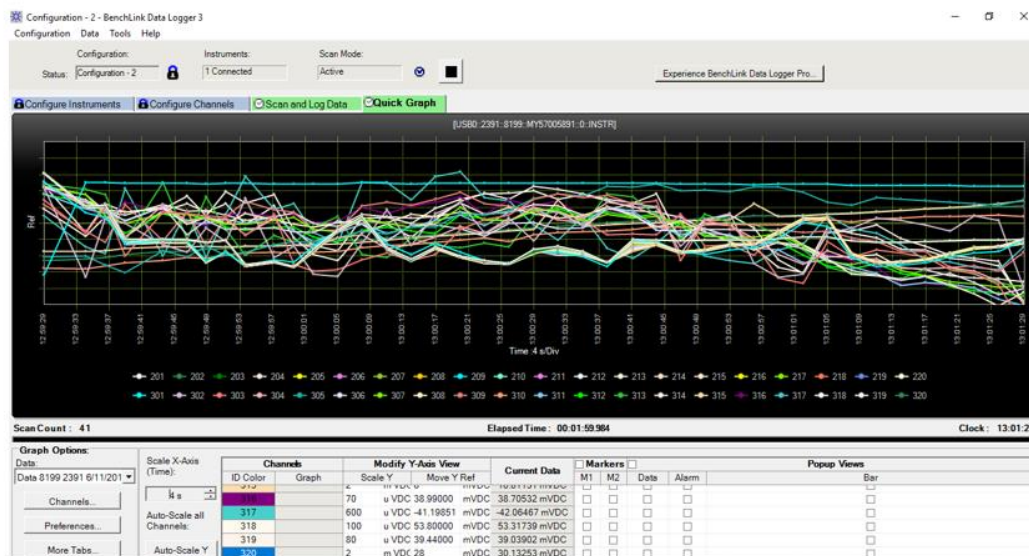


Figura 9. Ejemplo de registro de una medida.

Otros equipos que se han empleado en el proceso de preparación de las membranas y la adquisición de medidas fueron (Figura 11):

- Ika Vortex Genius 3.
- Microbalanza RADWAG XA110.
- Placa IKA Color Squid.

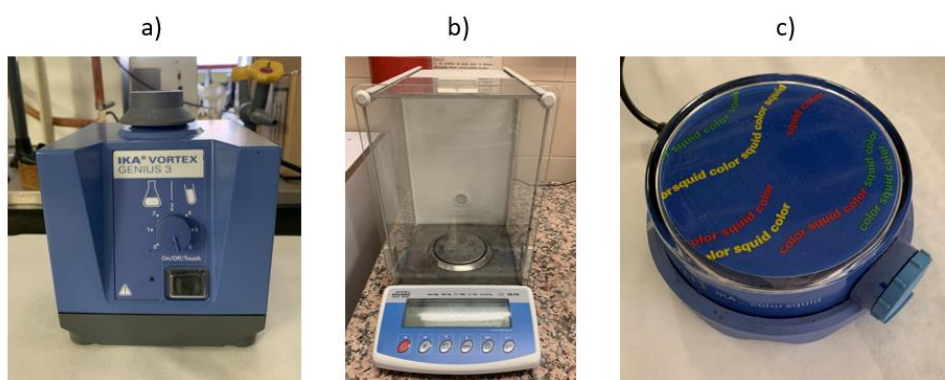


Figura 10. a) Vortex; b) microbalanza y c) placa de agitación magnética.



3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1. Desarrollo y construcción de la lengua potenciométrica

La construcción de la lengua potenciométrica desarrollada en este TFG, no es un trabajo sencillo y requiere de habilidad suficiente tanto para la fabricación del dispositivo como para la deposición de las membranas sobre el soporte. Se desarrollaron 2 redes de sensores para tener datos de reproducibilidad. A continuación, se detalla el proceso de preparación del soporte base que se ha utilizado en este TFG. Este soporte se fabricó por duplicado.

Para la construcción del soporte sobre el que se depositarán las membranas se emplearon tubos cilíndricos de metacrilato de 108 mm de alto y 20mm de diámetro. En ellos se realizaron 4 columnas con 5 perforaciones de 5mm de diámetro cada una, sin traspasar la pared del tubo. En cada perforación se realizaron pequeños orificios para insertar un cable de cobre encargado de transmitir la señal del sensor. El siguiente paso fue etiquetar todos los cables de cobre, en total 20 cables, uno por membrana, para conectarlos a un puerto hembra/macho de 25 pines. Una vez etiquetados, se introdujeron por el interior del tubo y se hizo coincidir con las pequeñas perforaciones en un orden concreto pegándolos con loctite al tubo. Tras colocarlos y comprobar que estaban bien pegados se cerró el tubo por la parte inferior con la tapa y se humedeció el tubo con un poco de cloroformo para adherir la tapa. A continuación, se colocó la resina epoxi de plata E4110 10Z para rellenar el espacio del taladro inicial. La resina de plata empleada se obtuvo de la mezcla de E4110 10Z (parte A y parte B) sobre una lámina de metacrilato fino y posterior curado en horno. Por último, el tubo base se llevó al taller para eliminar el sobrante y dar forma cóncava a las perforaciones.

Una vez finalizado el soporte, se llevó a cabo la deposición de las membranas sobre el mismo. Para ello, se han utilizado 20 membranas con diferentes combinaciones de plastificante y aditivos orgánicos (Tabla 6), todas ellas con base de PVC de alto peso molecular. Durante su preparación es necesario mantenerlas refrigeradas para su correcta conservación. Para disolver y unificar los componentes de las membranas, que en algunos casos son líquidos y en otros sólidos, se utilizó tetrahidrofurano en pequeñas cantidades hasta obtener una textura óptima y similar en todas las membranas.

A continuación, se detalla el proceso de deposición de las membranas sobre el dispositivo potenciométrico. Este proceso se distribuye en varios pasos:

1º Se limpiaron los soportes con alcohol y agua desionizada.



2° Se utilizó laca de plata para cubrir con una fina capa la pasta antes de colocar en cada orificio la membrana correspondiente y se dejó secar.

3° Preparar las membranas, si es necesario añadir tetrahidrofurano para obtener una textura un poco espesa.

4° Se utilizaron pipetas Pasteur, una por tipo de membrana usada, se depositó una gota de cada tipo de membrana sobre la laca de plata, se esperó 10 minutos, aproximadamente, y se depositó una nueva gota. En total se depositaron 3 gotas para cada membrana sobre el soporte, evitando que se produjera la mezcla de unas con otras por contacto.

5° Una vez se han colocado todas las membranas, se dejaron una noche secando y después se colocaron en una disolución de KCl 0,1M para hidratarlas durante 3 ó 5 días.

3.3.2. Adquisición de medidas con la lengua potenciométrica

El primer análisis fue la medida de disoluciones patrón para acondicionar los sensores y, además, analizar los distintos sabores básicos.

Se realizaron disoluciones de diferentes sales, ácidos, bases y azúcares, (presentes en leche y otros alimentos) con diferentes concentraciones. Las sales se han disuelto en agua Mili-Q, la urea en KOH 0,1M y el resto de disoluciones en buffer fosfato 0,01M (pH 7).

Para realizar las medidas, la disolución se coloca en un vaso de precipitados de 250 ml y después se sumergen los dos soportes con 20 sensores cada uno y se sujetan con unas pinzas. Las disoluciones se agitan 1 minuto antes de realizar la medida, que se realiza durante 5 minutos y se registra la diferencia de potencial medida cada 3 segundos. Los soportes se conectan al equipo tal y como se muestra en la Figura 12. En la figura se representa de forma esquemática y real la colocación de los elementos en el proceso de toma de medidas de una muestra.

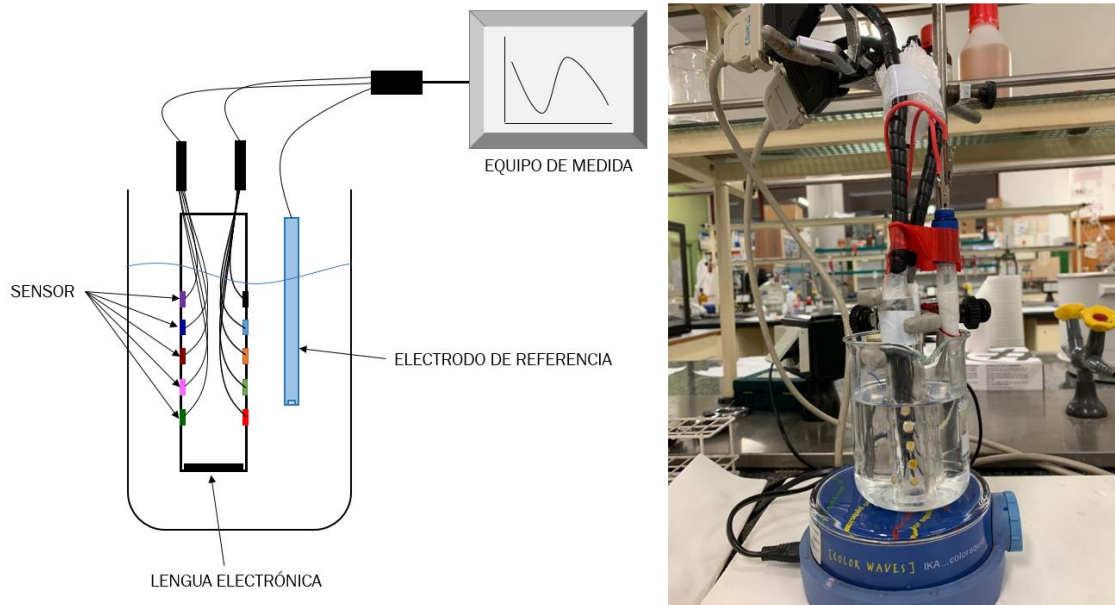


Figura 11. Esquema e imagen de la colocación de la lengua potenciométrica.

Por otro lado, para medir las muestras de leche, se analizó leche en distintas condiciones: leche entera pasteurizada y sin pasteurizar (cruda), con restos de medicación y diluidas 1:2 y 1:4 con agua Mili-Q. Las muestras provienen directamente de ganaderos de la zona de Tierra de Campos de Palencia y de Ávila. Se conservaron las muestras de 500 ml a una temperatura de 4°C, aproximadamente, para la preservación de la leche. Las medidas se realizaron de la misma manera que las disoluciones patrón.

En este caso fue necesario intensificar el lavado del sensor entre muestras para asegurarse de eliminar cualquier resto que pudiera quedar depositado en los sensores.

3.3.3. Elaboración de la lengua biopotenciométrica

Para la mejorar la detección de azúcares de interés, se buscó la forma de adherir enzimas con el fin de mejorar la capacidad de detección de ciertas sustancias. En concreto, en este trabajo se ha utilizado la enzima β -Galactosidasa de *Aspergillus oryzae* para analizar disoluciones de galactosa de diferentes concentraciones.



En primer lugar, se sometió al soporte con las 20 membranas a vapores de glutaraldehído al 2,5% durante 20 ó 30 minutos en la campana extractora para mejorar la adherencia de la enzima sobre la membrana. El glutaraldehído es un dialdehído que reacciona con las enzimas y la superficie del sensor de forma que crea enlaces covalentes facilitando la adherencia de la enzima sobre la superficie del sensor. Transcurrido el intervalo de tiempo, se colocaron los soportes en pinzas para facilitar la colocación de la enzima.

Para la preparación de la enzima se utilizó una concentración de enzima de 5 mg/ml en buffer fosfato pH 7,0. La disolución se almacena en un eppendorf a -4°C hasta su uso.

Finalmente, para colocar la enzima sobre las membranas se utilizó una micropipeta para colocar, aproximadamente, 10 µl sobre cada una. Una vez seco, se guardó en el frigorífico. Antes de medir las disoluciones de galactosa los sensores se introducen en la disolución de buffer fosfato de pH 7,0 durante 30 segundos, aproximadamente.

Estas lenguas biopotenciométricas se utilizan para realizar una única medida, ya que después de ésta, las membranas con la enzima pueden quedar contaminadas o saturadas por el analito. Es por ello que, para realizar nuevas medidas, es necesario depositar nuevamente las membranas y, posteriormente, la enzima, siguiendo los procedimientos descritos, siendo un trabajo largo y complejo si se quieren realizar medidas en un periodo de tiempo corto.

Capítulo 4:

RESULTADOS EXPERIMENTALES



4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1. DISCRIMINACIÓN DE SABORES

Una vez analizadas todas las disoluciones patrón que se asemejan a los diferentes sabores, se han representado los datos obtenidos de algunos compuestos a una concentración de 0,01 M (Figura 13). Tal y como se observa, las señales obtenidas para cada compuesto (representante de un sabor) son distintas entre sí para las 20 membranas con las que se han trabajado.

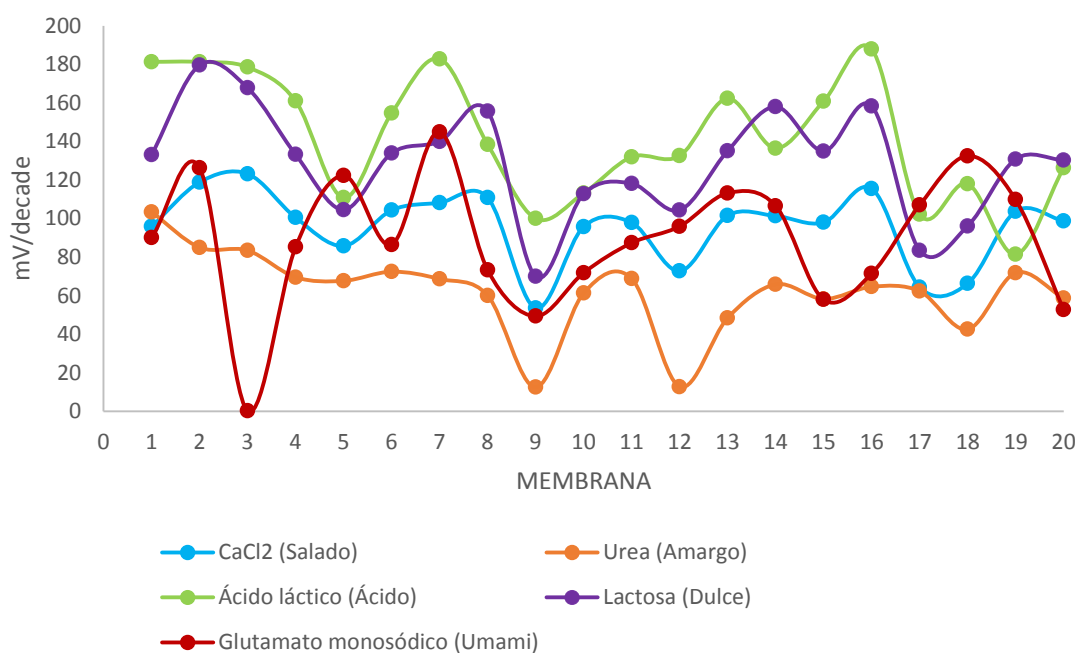


Figura 12. Representación de los cinco sabores básicos.

Se observó que algunas membranas tenían mayor capacidad de discriminación siendo las membranas 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13 y 18 las que mayor variabilidad aportaron.

Con el fin de estudiar la capacidad de la lengua potenciométrica para distinguir entre los diferentes sabores analizados, se ha llevado a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA, de sus siglas en inglés) que permite hacer un análisis de discriminación. Para ello, se han tenido en cuenta los datos potenciométricos obtenidos para la concentración de 0,01 M de los diferentes compuestos analizados.

En la figura 14 se muestran los scores 2D de los resultados obtenidos en el PCA. La primera componente (PC1) recoge el 59% de la variabilidad original, la segunda (PC2) recoge el 15% y la tercera (PC3), no visible en el gráfico, el 7%. De



esta forma, entre las componentes generadas a partir del estudio se recoge el 81% de la información original del conjunto de datos de las muestras.

Además, se observa como los sabores se pueden distinguir entre sí y, además, todos los compuestos que dan carácter salado aparecen en una región del gráfico próximo entre sí, así como los ácidos se agrupan en otra zona y los azúcares también. Por lo tanto, se ha obtenido una discriminación completa de los distintos sabores a partir de los datos potenciométricos obtenidos.

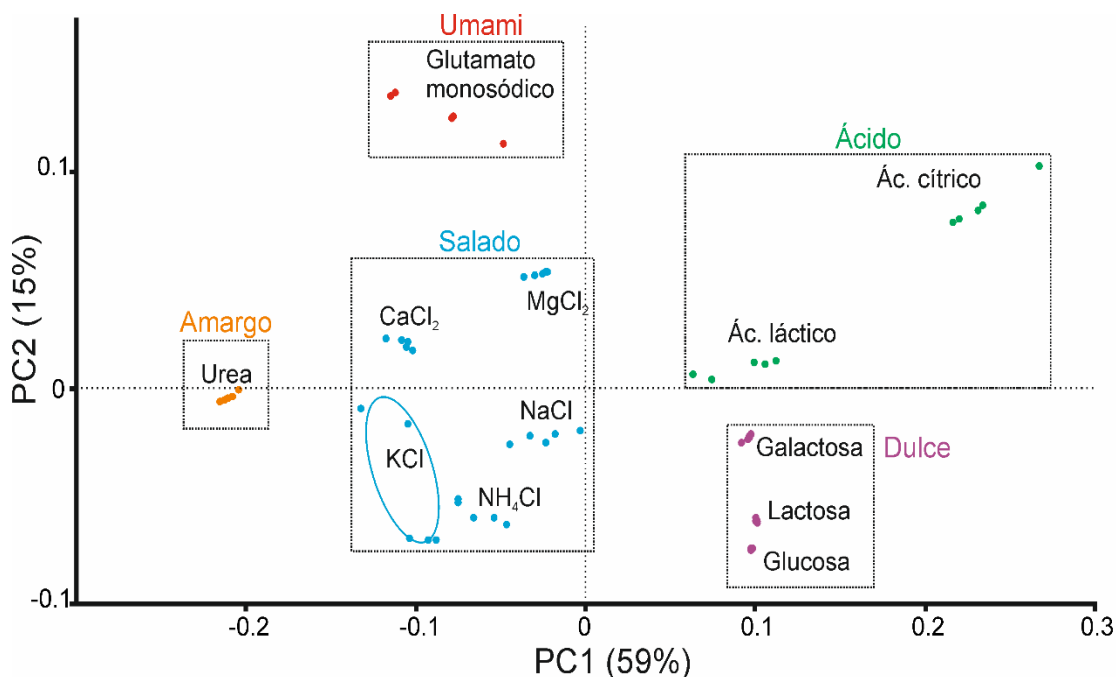


Figura 13. PCA de los sabores.

4.2. ANÁLISIS DE DISOLUCIONES PATRÓN DE SABORES BASICOS

Con el fin de calibrar y acondicionar las membranas del dispositivo potenciométrico desarrollado, se han analizado disoluciones de varios compuestos que imitan a los sabores: sales (CaCl₂, KCl, NaCl, MgCl₂, NH₄Cl), ácidos (cítrico y láctico), una base (urea), glutamato monosódico y azúcares propios de la composición de la leche (lactosa, glucosa y galactosa).

4.2.1. Resultado de las sales analizadas: sabor salado

Los resultados obtenidos tras las medidas de las sales evidenciaron que la lengua potenciométrica es capaz de diferenciar distintas concentraciones de cada sal, tal y como se observa en los siguientes gráficos, que representan el valor medio obtenido para cada membrana y para 5 medidas en cada sal analizada.



Además, se observó que algunas membranas tienen mayor capacidad de discriminación que otras.

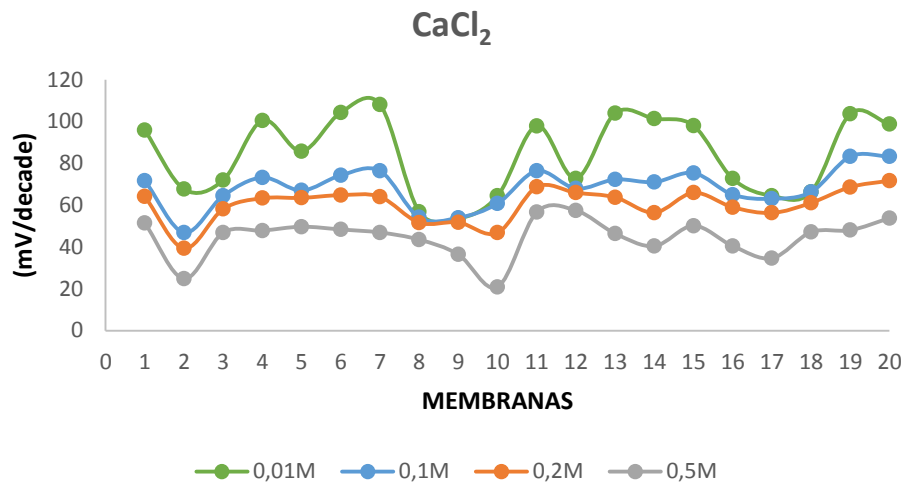


Figura 14. Disoluciones patrón de cloruro de calcio.

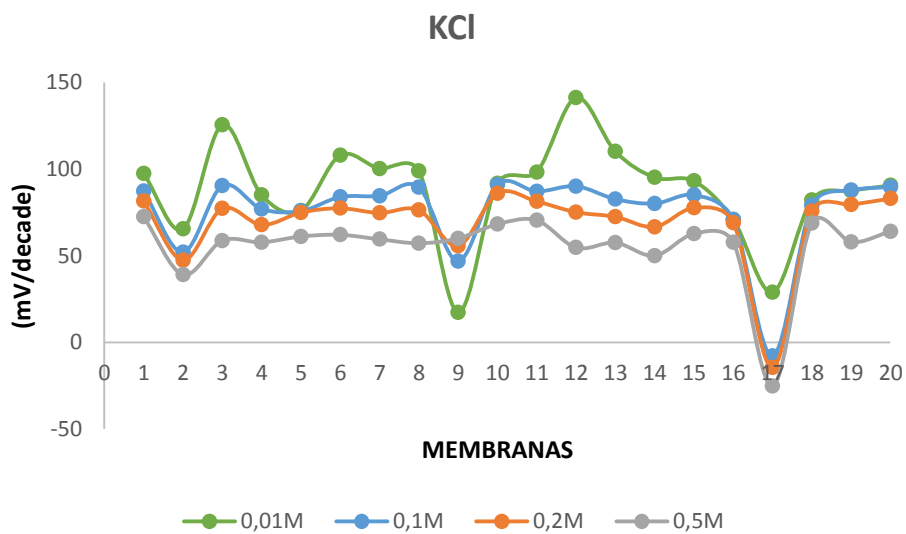


Figura 15. Disoluciones patrón de cloruro de potasio.

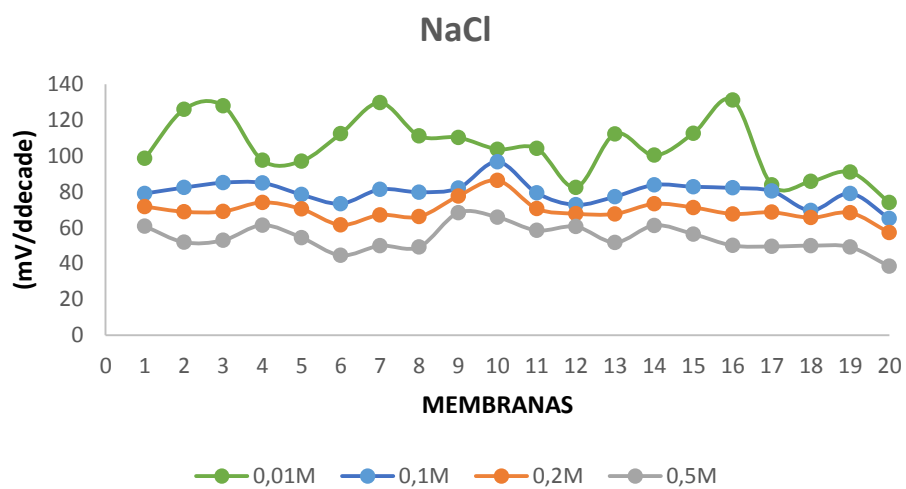


Figura 16. Disoluciones patrón de cloruro de sodio.

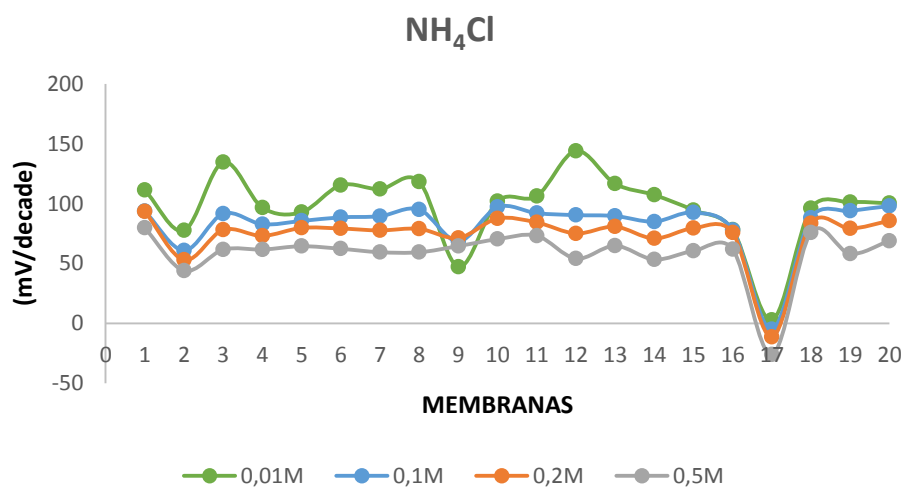


Figura 17. Disoluciones patrón de cloruro de amonio.

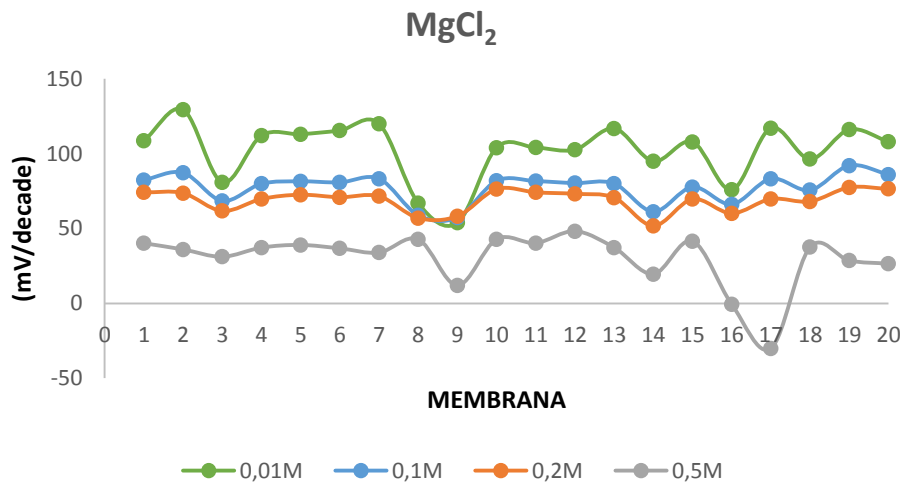


Figura 18. Disoluciones patrón de cloruro de magnesio.

Como se observa en las figuras, en general, los resultados obtenidos demostraron la capacidad de discriminación de las membranas entre disoluciones con diferente concentración.

En el caso del cloruro de calcio, las membranas 8, 12, 17 y 18 no diferenciaron entre las disoluciones de diferente concentración, son menos sensibles, no pudiendo distinguir entre concentraciones altas y bajas como sí lo hacen el resto de membranas (Figura 15). Para el cloruro de potasio, las membranas 5, 10, 16, 18, 19 y 20 no diferenciaron entre disoluciones de diferente concentración como en el caso de la sal anterior (Figura 16). En el caso del cloruro de amonio las membranas, 10, 15, 16, 18, 19 y 20 tampoco diferenciaron entre las diferentes disoluciones medidas (Figura 18). Por último, el cloruro de sodio, la membrana 17 y el cloruro de magnesio, la membrana 8, son las menos sensibles a estas disoluciones (Figura 17 y 19).

En la Figura 20, se han representado el valor de la pendiente de la recta de calibrado obtenida al representar las concentraciones frente a la respuesta potenciométrica (mV) para cada membrana y para cada sal.

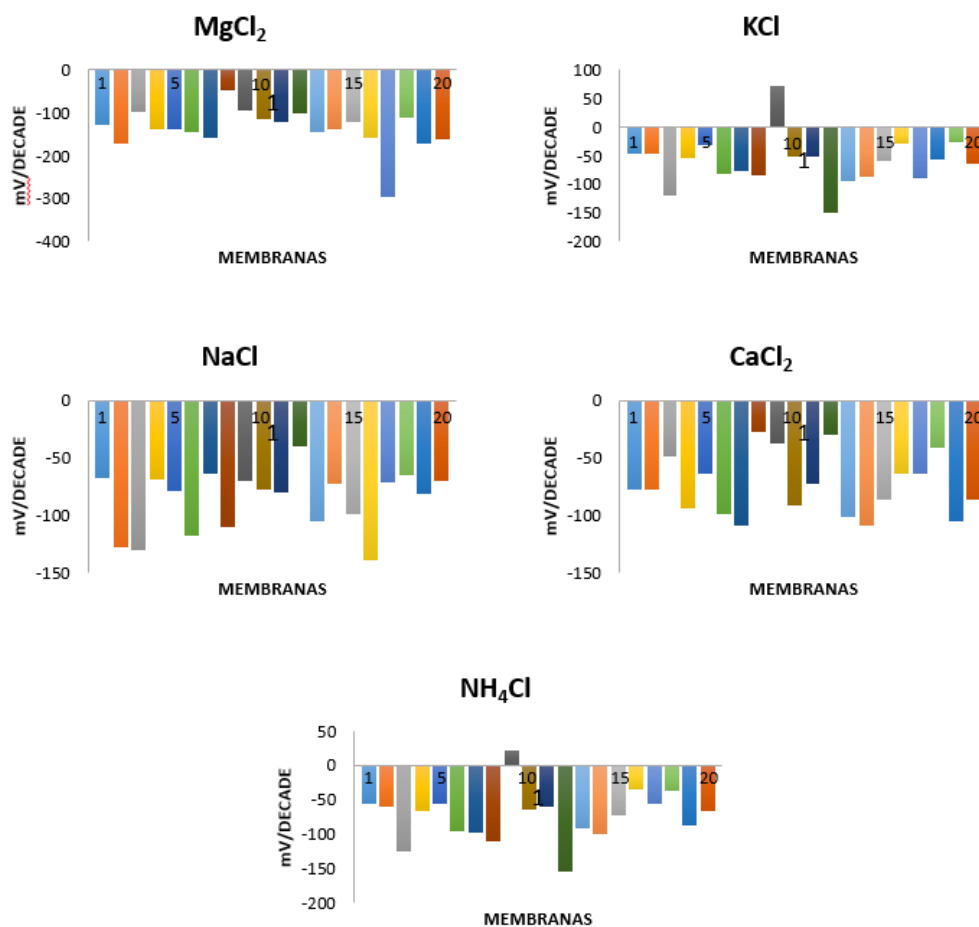


Figura 19. Gráficos con el valor de las pendientes obtenidas por las diferentes membranas y sales.

Se observa que, principalmente, las pendientes son negativas, excepto en un par de casos, lo que indica que la diferencia de potencial medido disminuye con el aumento de la concentración de sal. Además, también se aprecia que algunas membranas son más sensibles que otras y que la respuesta de los sensores es mayor para las sales MgCl₂, NaCl y CaCl₂. Este resultado es similar al reportado en la bibliografía [24].

4.2.2. Resultado de los ácidos analizadas: sabor ácido

En el caso de los ácidos (Figuras 21 y 22), tanto para el ácido cítrico como el láctico, se observa que la lengua potenciométrica distingue entre las concentraciones de 0,1 M, 0,01 M y 0,001 M. Sin embargo, concentraciones muy bajas de 0,0001 M no se pueden distinguir del 0,001 M. En este caso, a medida



que aumenta la concentración, la diferencia de potencial medido aumenta, mientras que en el caso de las sales ocurría lo contrario.

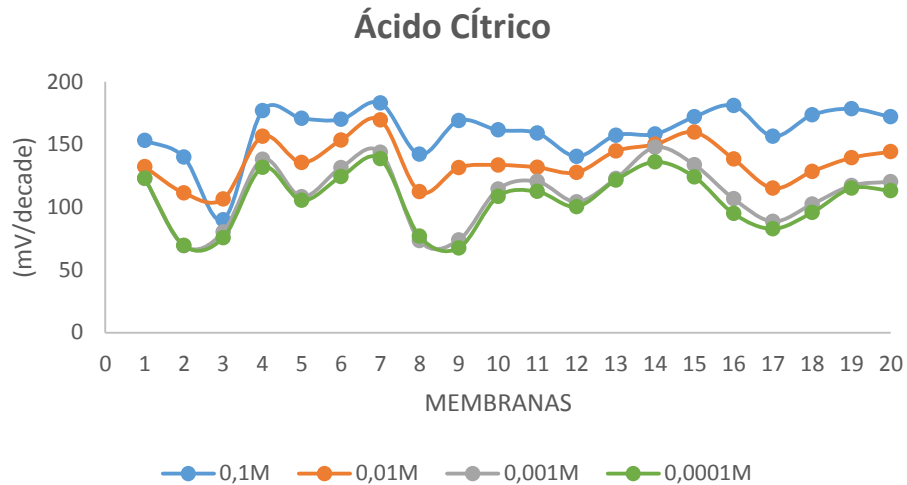


Figura 20. Disolución patrón de ácido cítrico.

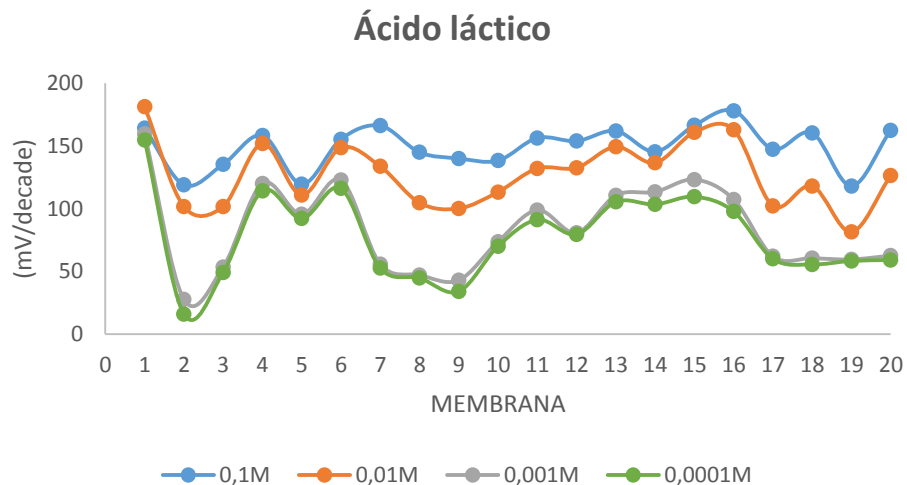


Figura 21. Disolución patrón de ácido láctico.

Las membranas que mejor discriminaron entre las diferentes disoluciones de diferente concentración para el ácido cítrico fueron la 11, 14, 15, 16 y 17, mientras que las membranas 1, 2, 3, 5, 8, 12, 13 y 19 fueron las que menos capacidad de discriminación mostraron.

En los resultados obtenidos para el ácido láctico, se observó que las membranas con mayor capacidad de discriminación fueron 9, 11, 14, 15 y 16 y las de menor capacidad fueron 1, 4, 7, 10, 18, 19 y 20.



Con el fin de obtener el valor de las pendientes para cada membrana se representaron sólo los datos de las concentraciones de 0,1 M, 0,01 M y 0,001 M, rango de concentraciones donde sí se observó una linealidad. En la Figura 23 se representan los datos obtenidos para algunas de las membranas a modo de ejemplo.

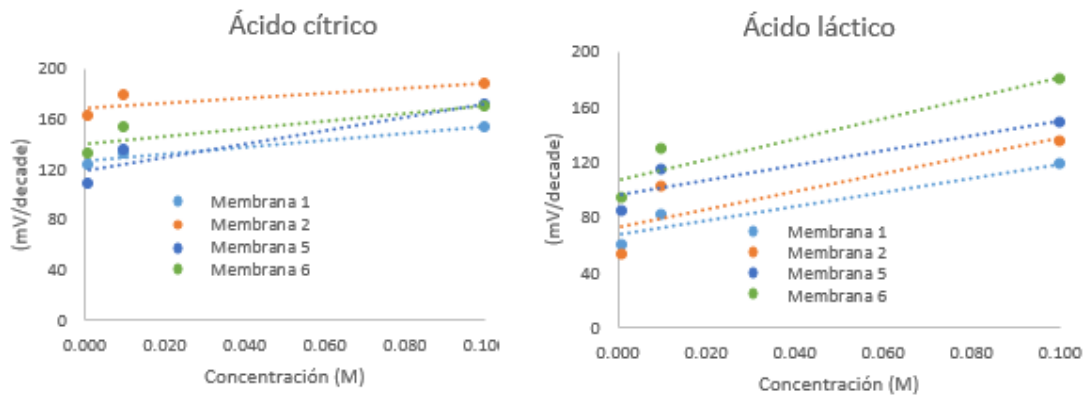


Figura 22. Ejemplo de membranas para las concentraciones 0,1 M, 0,01 M y 0,001M.

En la figura 24 se observa el valor de las pendientes obtenidas de las rectas de calibrado para cada membrana y para cada ácido. El valor obtenido de las pendientes es positivo con una única excepción, indicando que el crecimiento de la señal va en aumento al aumentar la concentración. Todas las membranas fueron sensibles en la medida de los ácidos, si bien, en el caso del ácido láctico, los valores obtenidos son, en general, ligeramente mayores que los obtenidos en el ácido cítrico, indicando que las membranas fueron más sensibles.

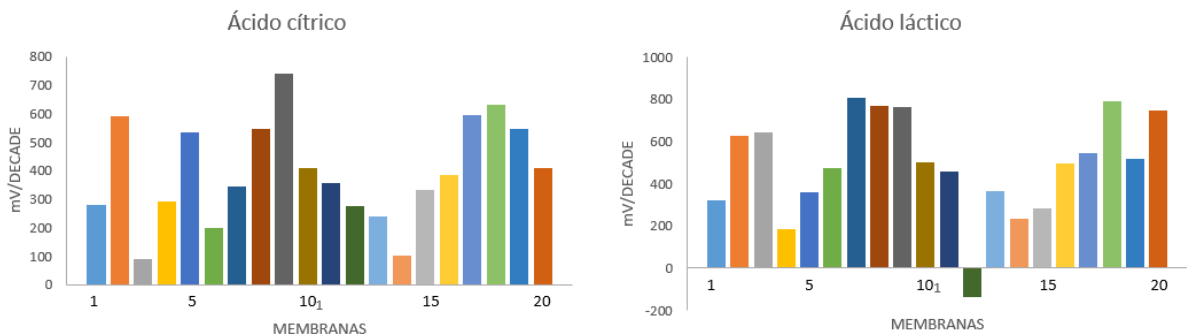


Figura 23. Valores de las pendientes obtenidas para cada sensor.

4.2.3. Resultado de la base analizada: sabor amargo



Como ejemplo de base patrón se midió urea que, además, es un componente presente en la leche. Los resultados de las medidas de disoluciones con diferente concentración se muestran en la figura 25.

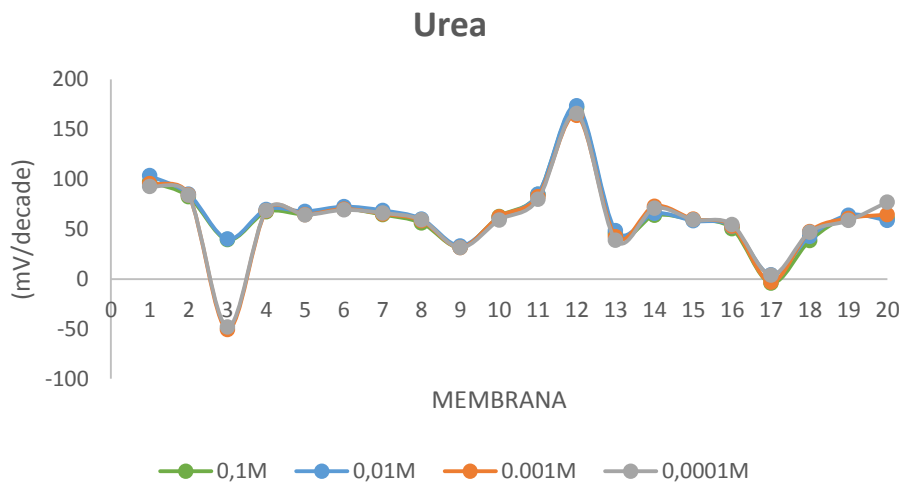


Figura 24. Disolución patrón de urea.

En este caso, tal y como se puede observar en la figura, la lengua potenciométrica no es capaz de distinguir entre las disoluciones con diferentes concentraciones, ya que se obtuvo siempre el mismo valor para cada membrana y concentración, aunque obteniéndose una señal diferente a las obtenidas para los demás analitos analizados. Debido a ello, no se han podido ajustar los datos experimentales a una recta de calibrado y, en consecuencia, tampoco se ha podido obtener un gráfico de las pendientes para analizar cuáles membranas fueron las más sensibles.

4.2.4. Resultado de los azúcares analizados: sabor dulce

Se analizaron los azúcares mayoritariamente presentes en la leche: lactosa, glucosa y galactosa. La lactosa es un disacárido formado por una molécula de galactosa y otra de glucosa, es por ello que se decidió medir ambos monosacáridos por separado. Al igual que en el análisis de urea, las membranas no son capaces de distinguir entre diferentes concentraciones, aunque la señal obtenida es distinta a las obtenidas para el caso de las sales, ácidos y urea. Además, sí se observa que la tendencia de la respuesta, la forma de la señal obtenida, es similar para los 3 azúcares analizados, especialmente para el caso de glucosa y lactosa. Sólo algunas membranas fueron capaces, ligeramente, de distinguir entre las disoluciones con distintas concentraciones, aunque con diferencias muy pequeñas. En el caso de la



glucosa estas membranas fueron 14, 15, 17, 18 y 20, para la lactosa fueron 6, 11, 14, 17 y 20 y para la galactosa 8, 10, 11, 14, 15 y 17 (Figuras 26, 27 y 28).

Tampoco en este caso se ha podido representar el valor de la pendiente obtenida de la recta de calibrado para cada membrana, considerando que las membranas no son sensibles a los azúcares, al igual que en el caso de la urea.

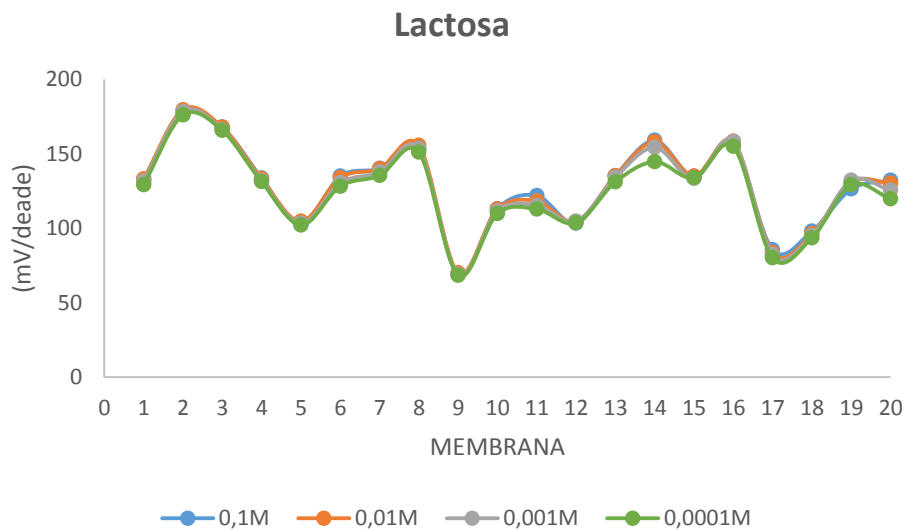


Figura 25. Disolución patrón de lactosa.

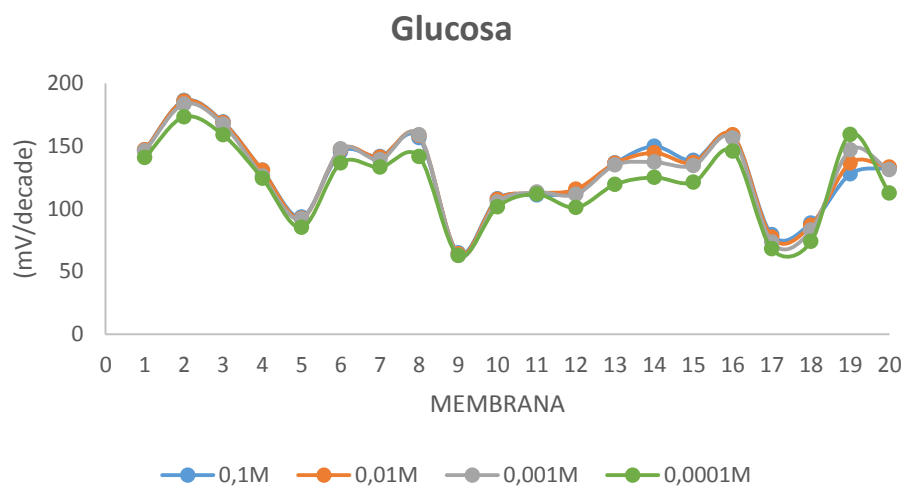


Figura 26. Disolución patrón de glucosa.

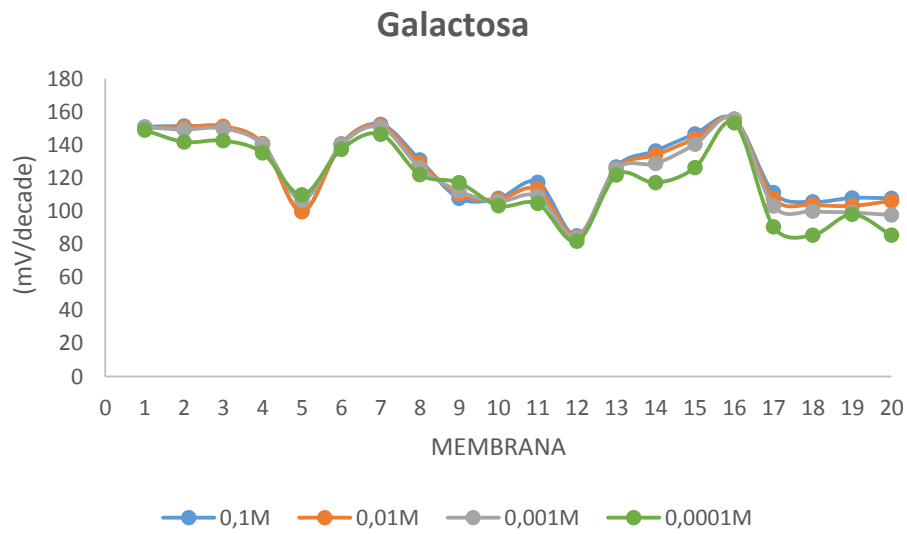


Figura 27. Disolución patrón de galactosa.

4.2.5. Resultado del glutamato monosódico: sabor umami

Por último, el ácido L-glutámico monosódico o glutamato monosódico se midió como representación del quinto sabor: sabor umami. Los resultados obtenidos se muestran la figura 29.

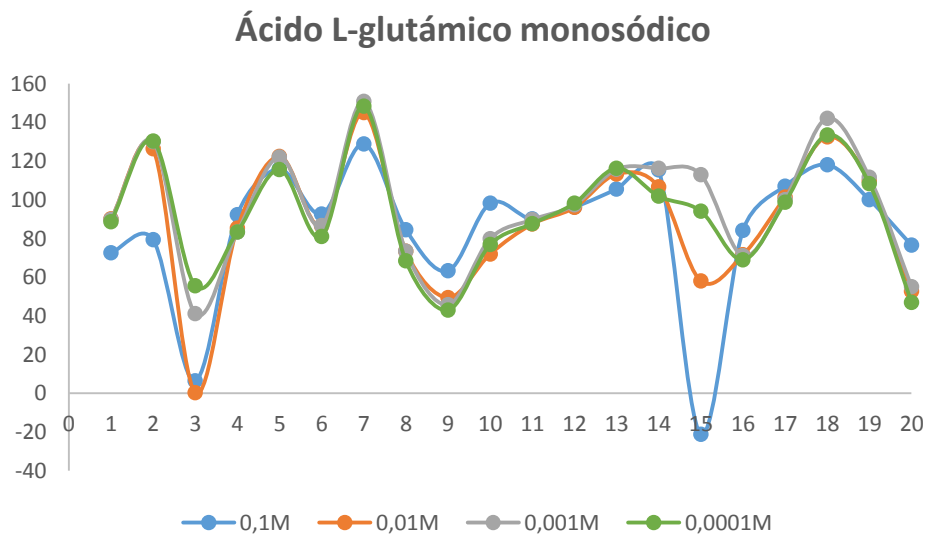


Figura 28. Disoluciones patrón de glutamato monosódico.

Tal y como se observa, algunas membranas, especialmente la 9 y 13, son capaces de distinguir entre las disoluciones con diferentes concentraciones



analizadas, pero, en general, estas membranas tampoco son sensibles a este compuesto de carácter ácido, tal y como se observó en el caso de los ácidos.

4.3. SENSORES MODIFICADOS CON ENZIMA: LENGUA BIOPOTENCIOMÉTRICA

Con el fin de estudiar la capacidad de la lengua potenciométrica para ser aplicada como dispositivo biopotenciométrico, se depositó la enzima β -galactosidasa en algunas membranas para analizar azúcar galactosa. Esta enzima catalizada la hidrólisis de los galactósidos, que contienen moléculas de galactosa en su composición. Las concentraciones estudiadas 0,1 M, 0,01 M, 0,001 M y 0,0001 M.

Como se pudo observar en el apartado 4.2.4 los sensores apenas diferencian entre las disoluciones de azúcares a diferentes concentraciones (Figura 28). Para comprobar la acción de la enzima, se midieron las mismas concentraciones de galactosa con los sensores modificados con la enzima β -galactosidasa, y se comprobó que existe mayor diferencia entre las disoluciones medidas (figura 30).

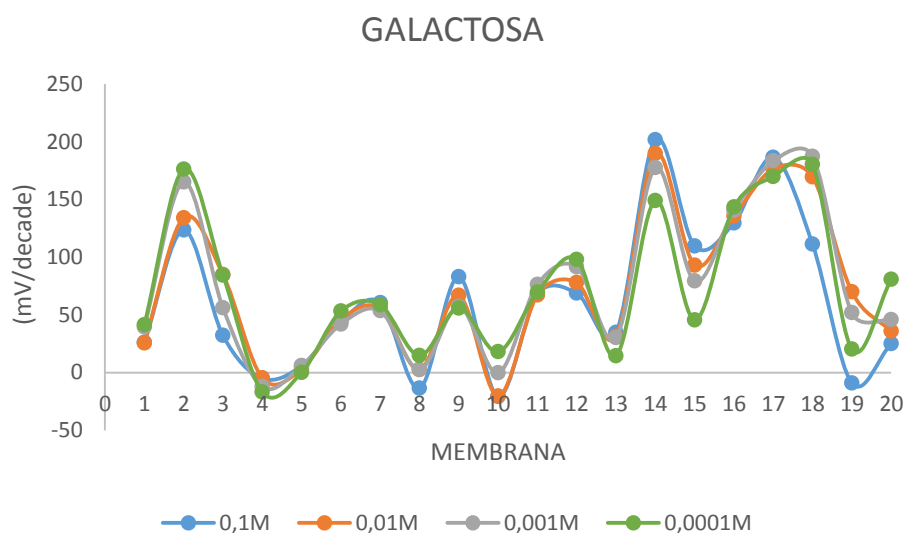


Figura 29. Disoluciones patrón de galactosas medidas con lengua biopotenciométrica.

En la figura 30 se pudo observar que la acción de la enzima ha ayudado a diferenciar entre las disoluciones de diferente concentración medida, siendo las membranas 2, 9, 12, 14, 15, 16 y 20 las que aportaron mejor resultado.

A modo de ejemplo comparativo, los datos obtenidos en 4 membranas modificadas con enzima y sin modificar se muestran en la figura 31:

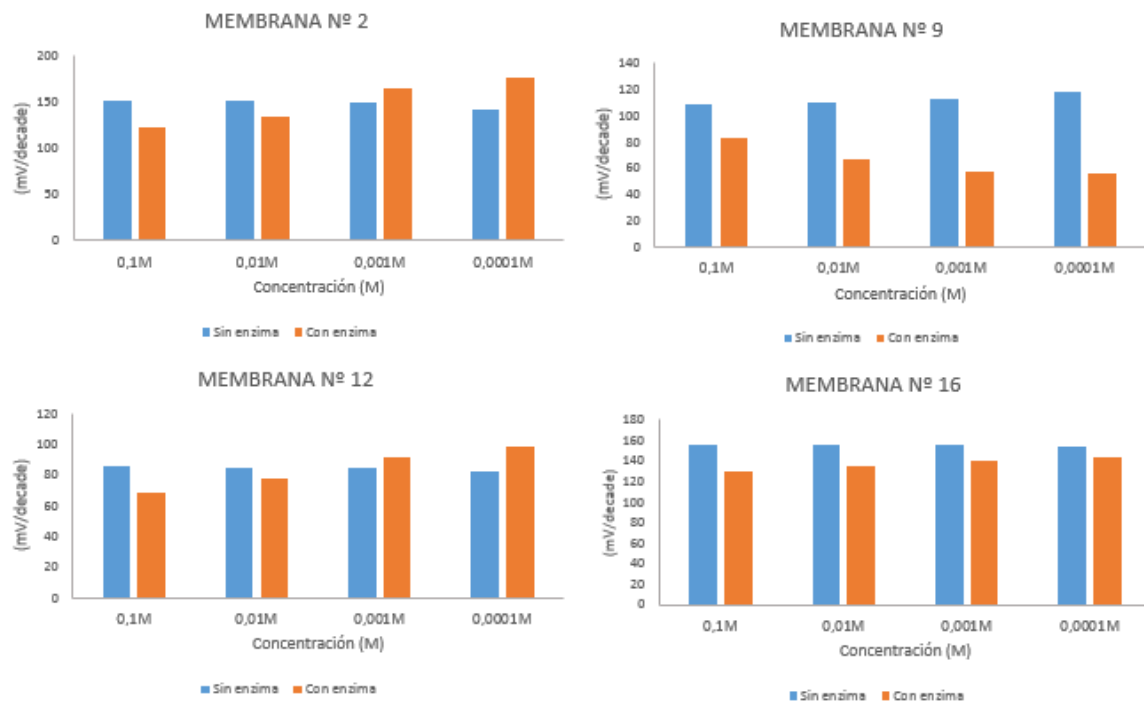


Figura 30. Comparación de medidas de galactosa de membranas sin (azul) y con enzima (naranja).

En la figura 31 se observó como para las medidas sin enzima (azul) la diferencia de potencial no se diferencia entre las disoluciones de diferente concentración medidas, por el contrario, en las medidas con enzima (naranja) si se puede apreciar la diferencia entre las disoluciones de diferente concentración de galactosa medidas.

Se comprobó que los resultados evidenciaron que, si bien con las membranas no modificadas los resultados obtenidos son casi estables y no muestran diferencia entre las disoluciones de una concentración a otra, con los sensores modificados con la enzima se puede ver que aportaron una mayor variabilidad en las respuestas. Por lo tanto, se puede concluir que se ha observado un resultado significativo para que la lengua electrónica potenciométrica desarrollada pueda ser utilizada como biopotenciométrica. Este estudio, de carácter preliminar, se realizó para comprobar la capacidad del dispositivo para ser modificado con enzimas en un futuro.

4.4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LECHE

A continuación, se expondrán las medidas realizadas en muestras de leche. Las diferentes muestras se obtuvieron directamente de ganaderos locales, sin



pasar por procesos industriales. Éstas se recogieron en el día de ordeño del ganado directamente de los tanques de almacenamiento refrigerados. Posteriormente, las muestras se conservaron refrigeradas y se midieron durante los 2-3 días posteriores. En concreto, para el estudio realizado, se ha dispuesto de leche de vaca cruda o sin pasteurizar de dos ganaderos locales de Palencia, de estas mismas muestras de leche habiendo sido ya pasteurizadas, de leche obtenida de una vaca enferma de mamitis que está siendo tratada con medicamento y, finalmente, de una muestra de leche cruda de cabra de la localidad de Ávila. Además, con el fin de determinar si la lengua potenciométrica es capaz de distinguir entre leches adulteradas y no adulteradas, las muestras de leche se diluyeron 1:2 y 1:4 con agua desionizada y se analizaron.

La nomenclatura empleada en los gráficos es la indicada en la siguiente tabla 9:

Tabla 9. Abreviaturas empleadas para las muestras de leche de vaca y cabra.

Nombre	Nº de muestra	Abreviatura
Leche de vaca cruda	1	LC1
Leche de vaca cruda	2	LC2
Leche de vaca pasteurizada	1	LP1
Leche de vaca pasteurizada	2	LP2
Leche de vaca cruda dilución 1:2	1	LC1*
Leche de vaca cruda dilución 1:2	2	LC2*
Leche de vaca pasteurizada dilución 1:2	1	LP1*
Leche de vaca pasteurizada dilución 1:2	2	LP2*
Leche de vaca cruda dilución 1:4	1	LC1**
Leche de vaca cruda dilución 1:4	2	LC2**
Leche de vaca pasteurizada dilución 1:4	1	LP1**
Leche de vaca pasteurizada dilución 1:4	2	LP2**
Leche de cabra cruda	3	LC cabra
Leche de cabra cruda dilución 1:2	3	LC cabra*
Leche de cabra cruda dilución 1:4	3	LC cabra**
Leche de vaca con medicamento	4	LM
Leche mezcla de vaca (1) y cabra 1:1	Mezcla	Vaca/Cabra

4.4.1. Diferenciación entre leche de vaca cruda y pasteurizada sin adulteración

Para este ensayo se midieron las muestras de leche de vaca crudas y pasteurizadas, no adulteradas. Se realizaron 10 réplicas para cada muestra analizada. La señal potenciométrica obtenida para cada muestra se observa en la figura 32.

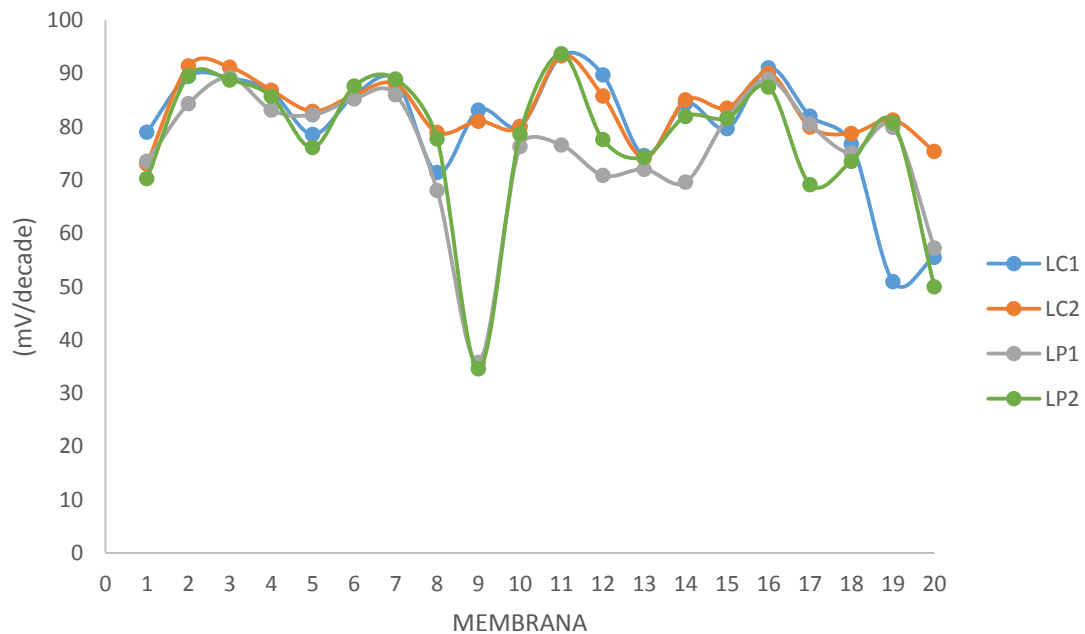


Figura 31. Diferenciación entre leches de vaca crudas y pasteurizadas sin adulteración.

Tal y como se observa, la respuesta es distinta para cada leche, estas variaciones pueden utilizarse para discriminar las muestras de leche, como por ejemplo las membranas 5, 9 y 12.

A continuación, se realizó el análisis estadístico de componentes principales (PCA) al conjunto de datos y se obtuvo la siguiente figura de scores 2D:

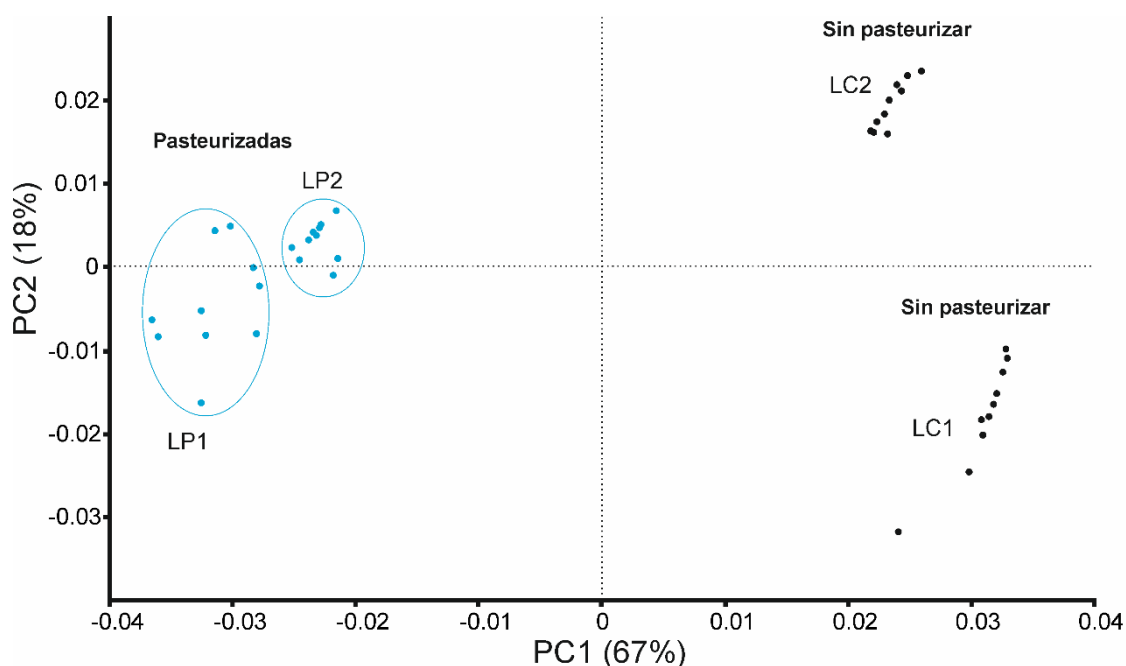


Figura 32. PCA de leches de vaca crudas y pasteurizadas sin adulteración.

La suma de las componentes principales (PC1+PC2+PC3) recogen el 95% de la información original del conjunto de datos, siendo la PC1 la que recoge un mayor porcentaje de variabilidad, con un 67%. La PC2 y PC-3 aportan 18% y 10%, respectivamente.

Como se pudo observar, mediante el análisis PCA se discrimina, por un lado, las dos muestras pasteurizadas (azul) que aparecen a valores negativos de la componente principal 1 y, por otra parte, las muestras sin pasteurizar (negro), que aparecen a valores positivos de la componente principal 1. Además, diferencia entre las dos muestras de diferentes proveedores (ganadero 1 y 2), intensificándose la diferencia en el caso de las leches crudas. Esto hace pensar que, cuando se pasteurizan las muestras de leche, las diferencias entre las distintas leches son menores y tienden a homogeneizarse.

En la figura 34 se ha incluido la respuesta potenciométrica obtenida en la medición de la leche de vaca con restos de medicación, que tiene como principio activo amoxicilina. Al igual que en el caso anterior, la respuesta es distinta de las obtenidas para leches de vaca crudas y pasteurizadas.

Las membranas que mayor capacidad de discriminación son las membranas 3, 6, 9, 13 y 17.

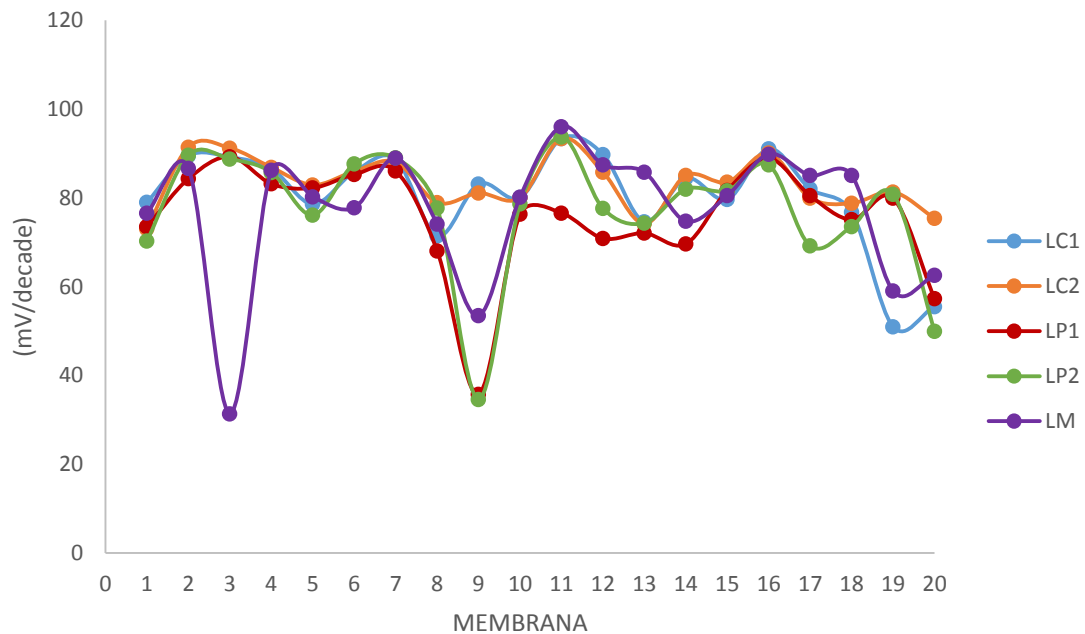


Figura 33. Diferenciación entre leche de vaca sin pasteurizar, pasteurizada y leche con restos de medicación.

El análisis PCA (Figura 35) permitió distinguir entre las muestras de leche sin y con restos de medicamento. Tal y como se observa en la figura de scores 2D, la muestra de leche con restos de medicamento aparece muy apartada de las muestras de leche sin restos del mismo. De nuevo, se observa que las muestras de leche pasteurizadas se asemejan más cuando han sido sometidas a la pasteurización que cuando están crudas, donde las muestras aparecen más separadas entre sí.

En este caso, las componentes principales recogen el 43% (PC1), 38% (PC2) y 10% (PC3), sumando un total de 91%.

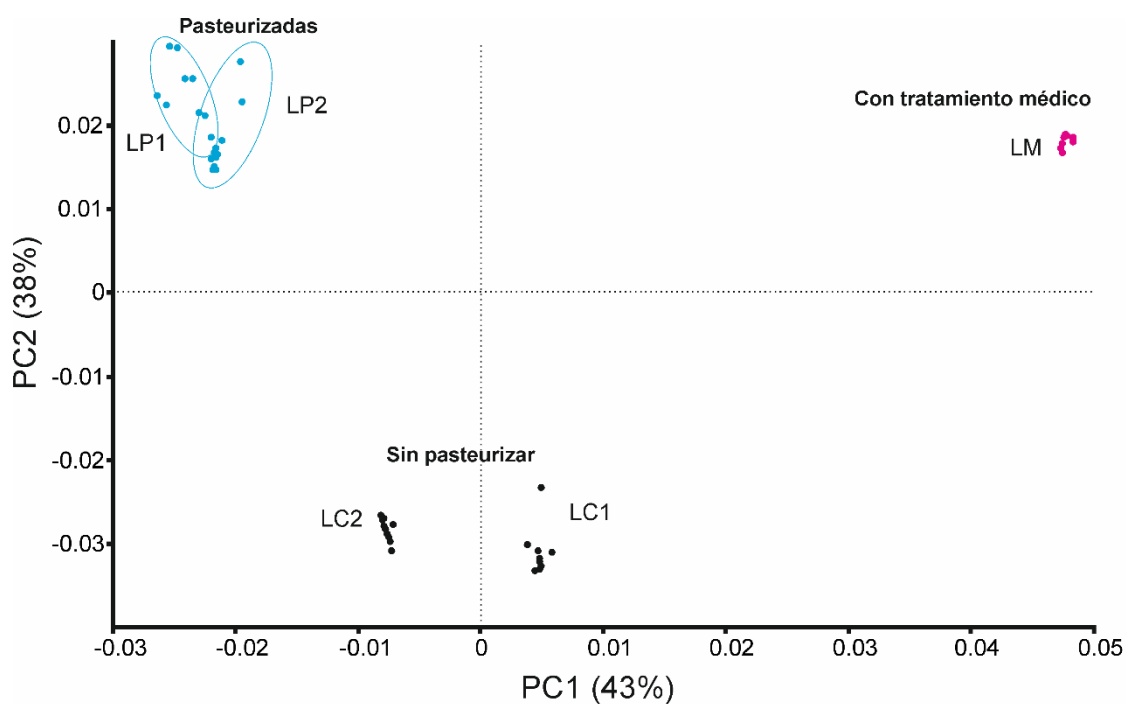


Figura 34. PCA leche sin pasteurizar (cruda), pasteurizada y con tratamiento médico.

Se comprobó que los sensores detectan la presencia de medicamentos en la leche cruda de vaca y la diferencia de la leche cruda y pasteurizada de vaca sana.

4.4.2. Diferenciación entre leches no adulteradas y leches adulteradas

4.4.2.1. Adulteración de leche de vaca con agua

Como ya se explicó en la introducción, una de las prácticas más habituales para adulterar la leche que algunos ganaderos llevan a cabo es mezclarla con agua. Para evaluar la capacidad de discriminación de la lengua potenciométrica entre leches no adulteradas y leches adulteradas, se diluyeron las muestras de leche con agua. Se obtuvieron los siguientes resultados:

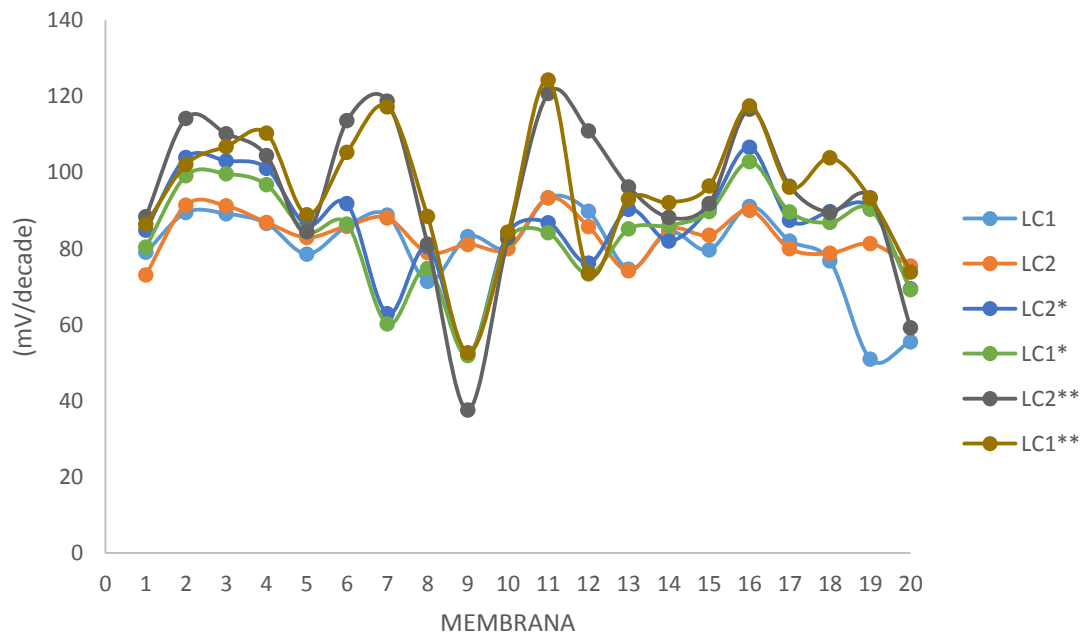


Figura 35. Diferenciación entre leche de vaca sin pasteurizar (cruda) y adulterada.

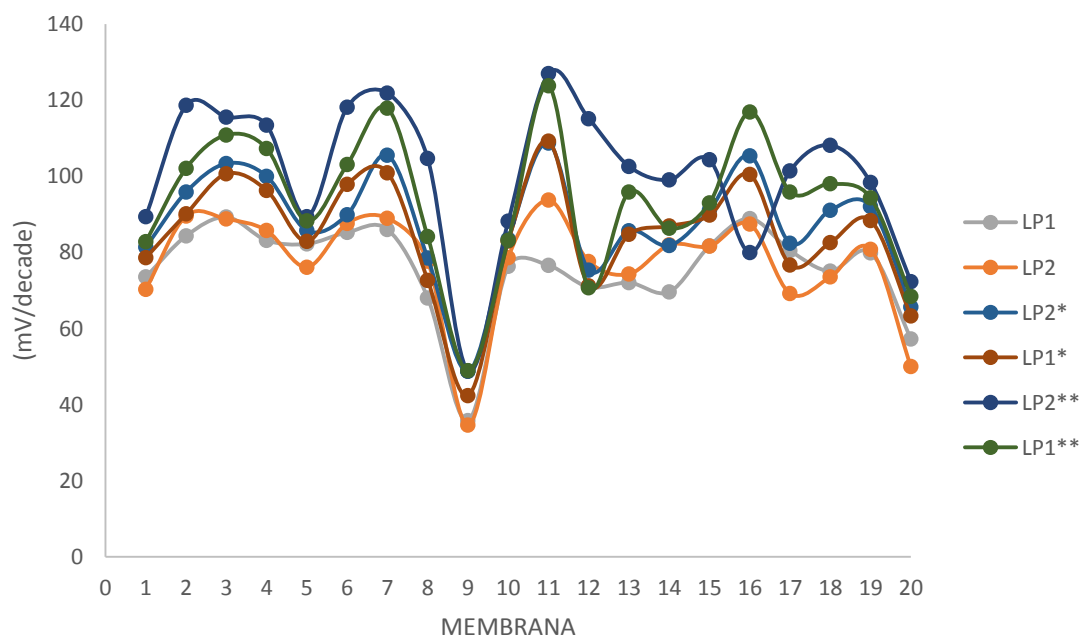


Figura 36. Diferenciación entre leche de vaca pasteurizada y adulterada.

Como se observó en las medidas, algunas de las membranas aportan mayor diferencia entre las muestras. En el caso de las leches sin pasteurizar, las membranas 3, 4, 7, 16 y 17 (Figura 36), han dado un resultado con mayor capacidad de diferenciación dentro del conjunto. Para las muestras de leche



pasteurizadas, las membranas que mayor diferencia aportaron fueron 3, 4, 7, 13, 18 y 19 (Figura 37), se pudo observar que en la mayoría de las membranas la señal se intensifica con el aumento de agua, las diluciones 1:4 (tres partes de agua y una de leche) en las que el potencial medido fue mayor.

A continuación, como en el caso anterior, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) del conjunto de datos analizados.

Como se observa en la figura 38, se puede distinguir entre las muestras de leche originales y las adulteradas, apareciendo cada muestra en una zona del gráfico. Por otro lado, se aprecia como las muestras de leche crudas aparecen próximas entre sí, al igual que las leches adulteradas 1:2 y las adulteradas 1:4. Además, aún se puede distinguir entre las muestras de los diferentes proveedores. Este resultado es importante porque indica que se podría monitorizar el grado de adulteración en muestras de leche. Las componentes principales (PC1+PC2+PC3) explican el 93% de la información original del conjunto de datos.

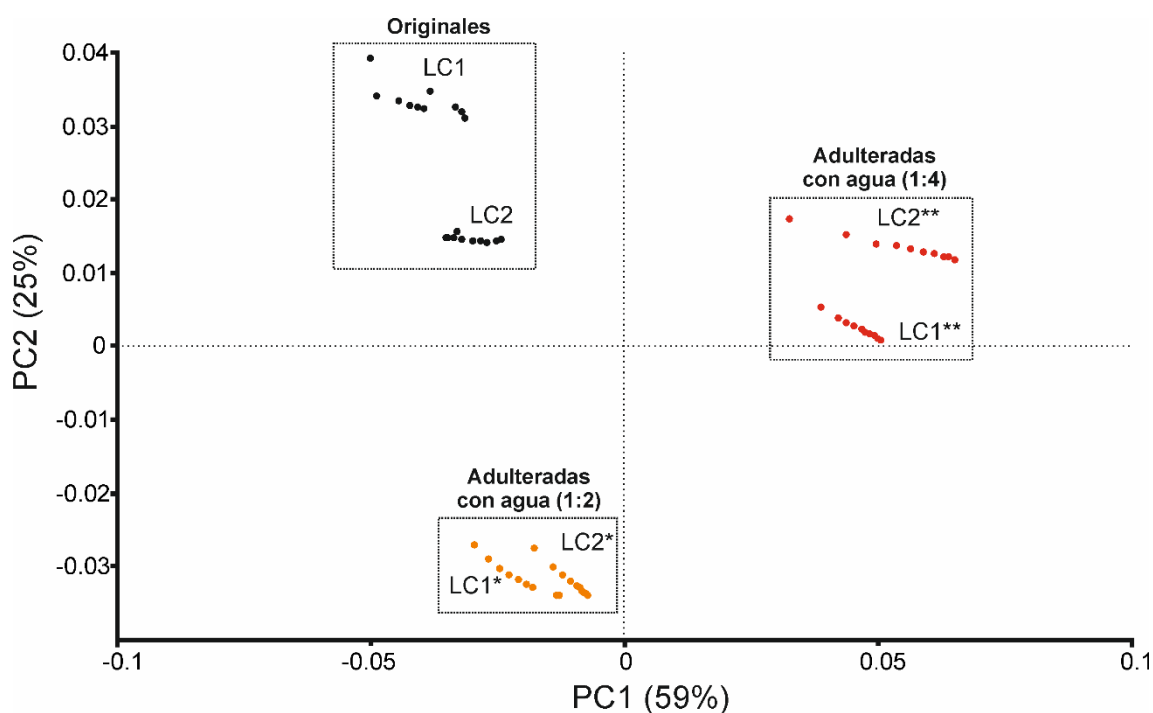


Figura 37. PCA de las leches de vaca sin pasteurizar (cruda) y adulteradas.

La figura 39 muestra los resultados obtenidos del análisis PCA para muestras de leche pasteurizadas con y sin adulteración. Al igual que en el caso anterior, se puede distinguir entre muestras sin adulteración y muestras adulteradas con agua en diferente grado. Si bien, en este caso, las muestras pasteurizadas y con adulteración 1:4 aparecen más distanciadas entre sí, se sigue manteniendo que las muestras pasteurizadas sin adulteración aparecen próximas entre sí y las diluidas 1:2 también. Además, las muestras de leche también se distinguen dentro de cada zona según el proveedor. En este caso, las componentes



principales (PC1+PC2+PC3) explican el 97% de la información original del conjunto de datos.

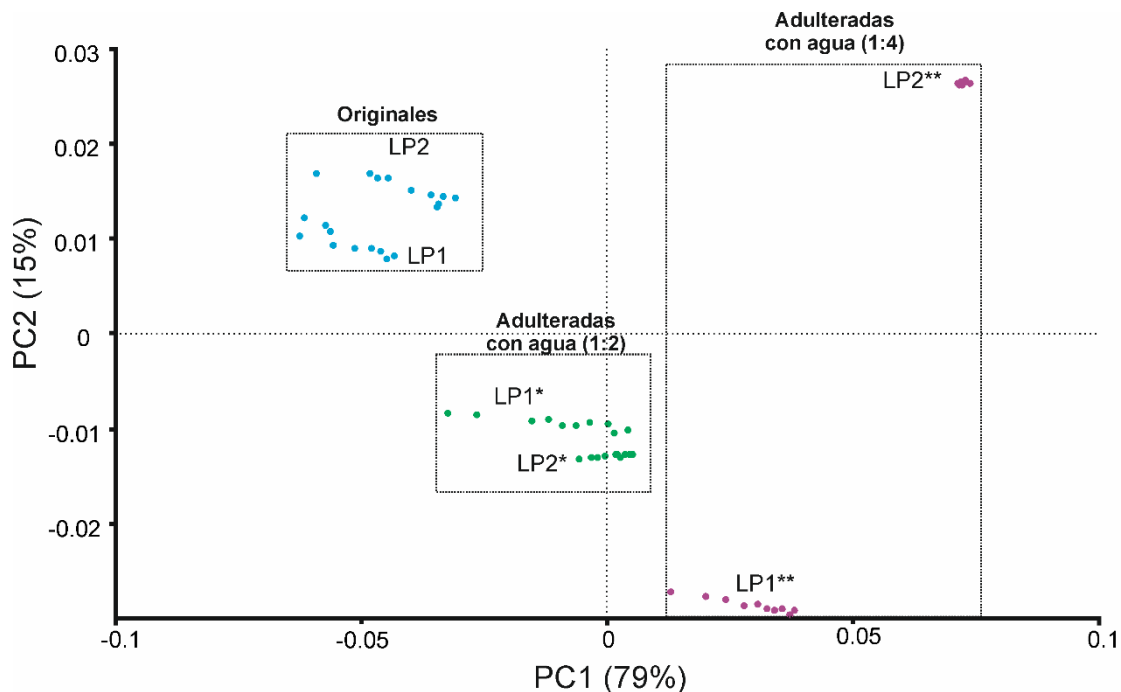


Figura 38. PCA de leches de vaca pasteurizadas y adulteradas.

Por último, se llevó a cabo un análisis PCA del conjunto de datos obtenidos para leches crudas y pasteurizadas, con y sin adulteración. Tal y como se observa en la figura 40, las muestras de leche sin adulteración aparecen en una zona del gráfico bien diferenciada, al igual que las leches con adulteración 1:2 y 1:4. Al igual que en los casos anteriores, las muestras de leche adulteradas 1:2 aparecen entre las leches no adulteradas y las leches adulteradas 1:4, siendo éstas últimas las que más alejadas aparecen de las muestras originales. Este resultado es lógico, porque a medida que la muestra esté más diluida, debe parecerse menos a la muestra original. Por otro lado, siguen diferenciándose las muestras originales crudas y pasteurizadas. Las muestras diluidas 1:4 están más separadas entre sí que las muestras diluidas 1:2, al igual que se observó en los análisis anteriores.

Las componentes principales (PC1+PC2+PC3) explican el 83% de la información original del conjunto de datos.

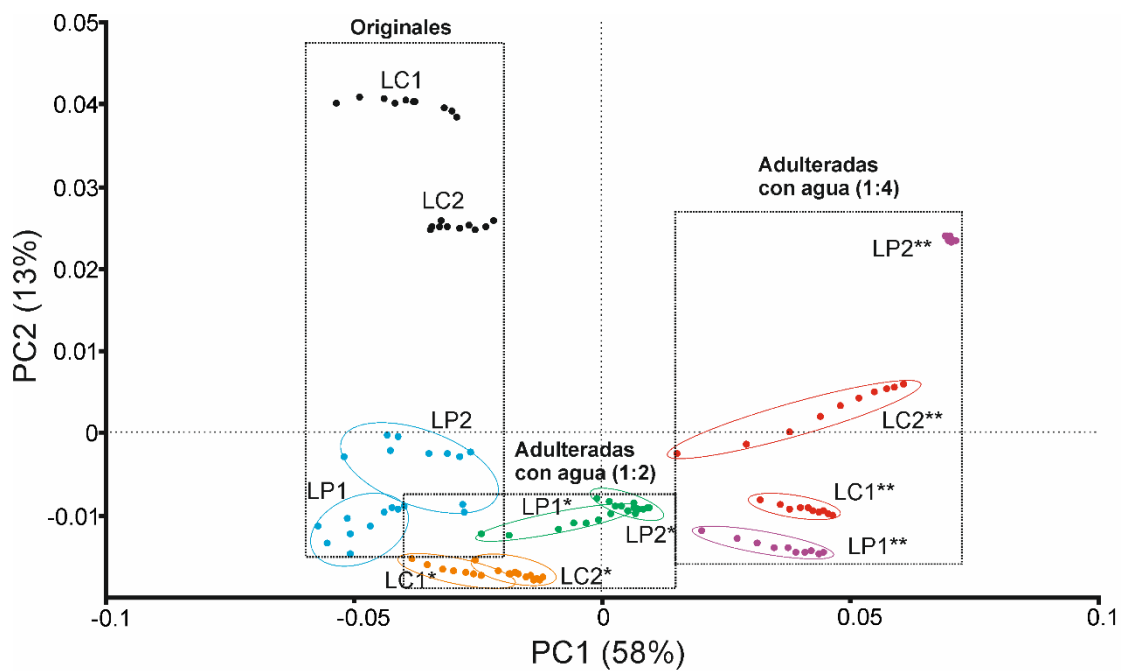


Figura 39. PCA conjunto de leches pasteurizadas y sin pasteurizar, con y sin adulteración.

4.4.2.2. Adulteración por mezcla de leche de cabra con leche de vaca

La leche de cabra presenta un valor nutricional y económico mayor que la leche de vaca en el mercado. Es por ello que, algunas veces se han descubierto fraudes por parte de algunos ganaderos que han adulterado leche de cabra con leche de vaca. Con el fin de evaluar la capacidad de la lengua potenciométrica de distinguir entre leche de diferentes mamíferos y mezclas de leche, se ha analizado leche de cabra y mezcla de leche de cabra con leche de vaca. Tal y como se observa en la figura 41, la señal potenciométrica de la mezcla vaca/cabra tiende a parecerse más a la señal obtenida en leche de cabra, indicativo de que la leche de cabra tiene una mayor influencia en esta mezcla.

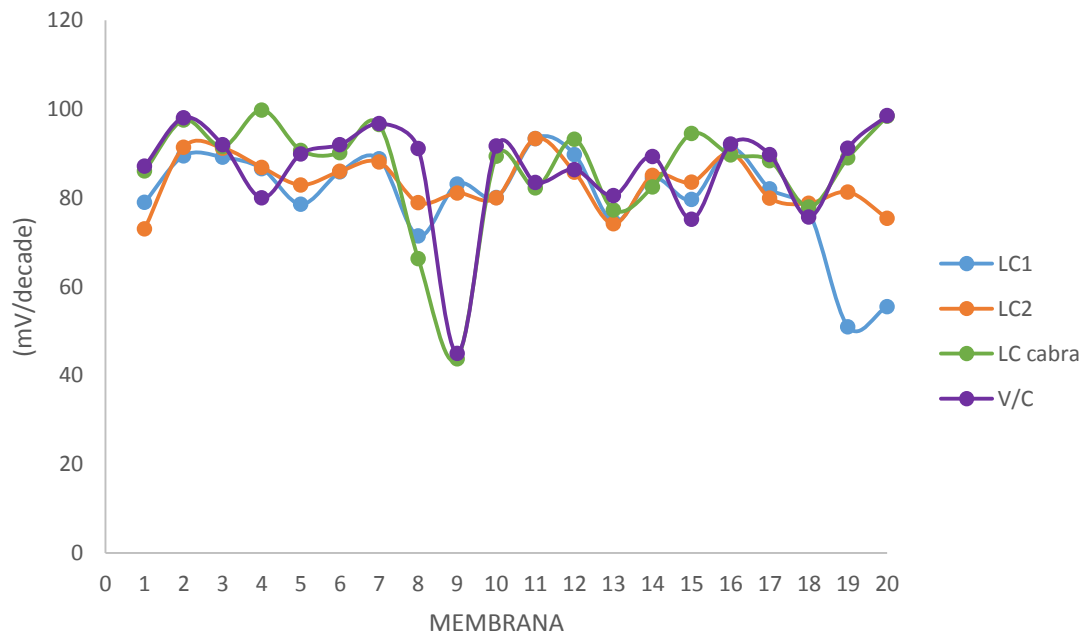


Figura 40. Diferenciación de leche de vaca, cabra y mezcla.

Como resultado de las medidas se pudo observar que las membranas tienden a distinguir entre las muestras de leche de vaca de la leche de cabra y la mezcla de ambas. Las membranas que mejor resultado aportan entre las medidas son 1, 2, 6, 9, 13, 17 y 19.

El resto de membranas diferencian en menor proporción y, en algunos casos, la leche de cabra y la mezcla tienen una medida de diferencia de potencial similar.

Como en los casos ya mencionados, se realizó el análisis estadístico de componentes principales PCA obteniéndose la siguiente figura de scores 2D:

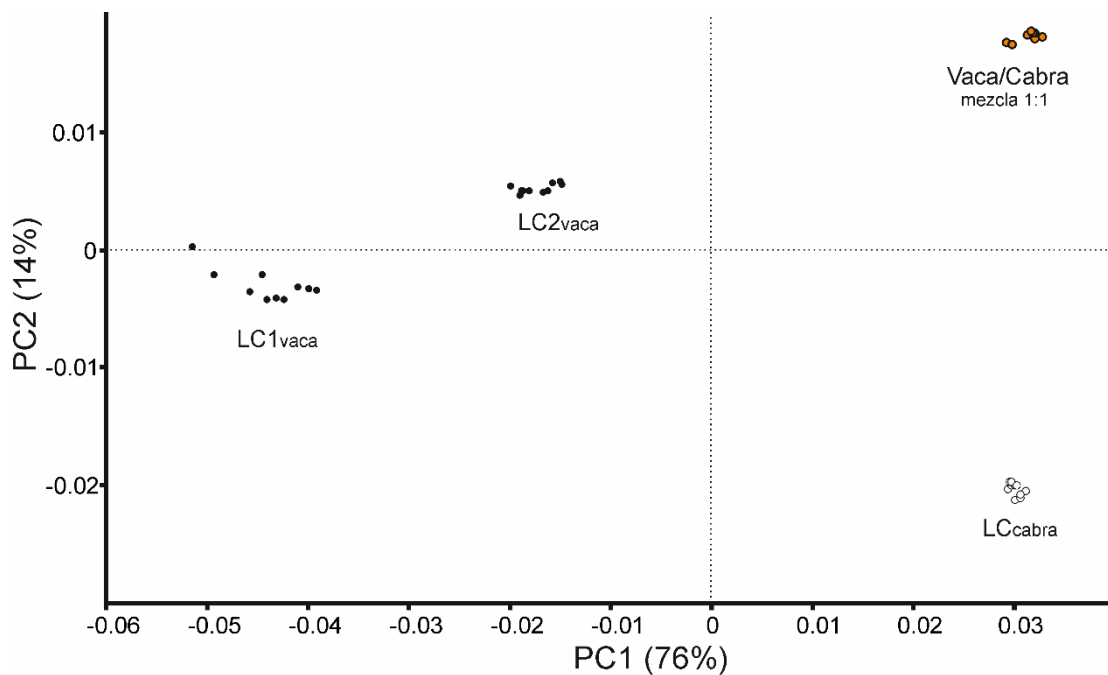


Figura 41. PCA de leche cruda de vaca, leche cruda de cabra y mezcla de leche de vaca y cabra 1:1.

En la figura 42 se puede distinguir entre leche de vaca y leche de cabra, apareciendo las muestras muy separadas entre sí. Además, las muestras de leche de vaca de cada proveedor se distinguen, pero aparecen próximas entre sí y lejos de la muestra de leche de cabra. Las componentes principales (PC1+PC2+PC3) explican el 98% de la información original del conjunto de datos.

A continuación, se evaluó la muestra de cabra con adulteración con agua (diluciones 1:2 y 1:4) y se comparó con las muestras de leche de vaca con y sin adulteración, figura 43.

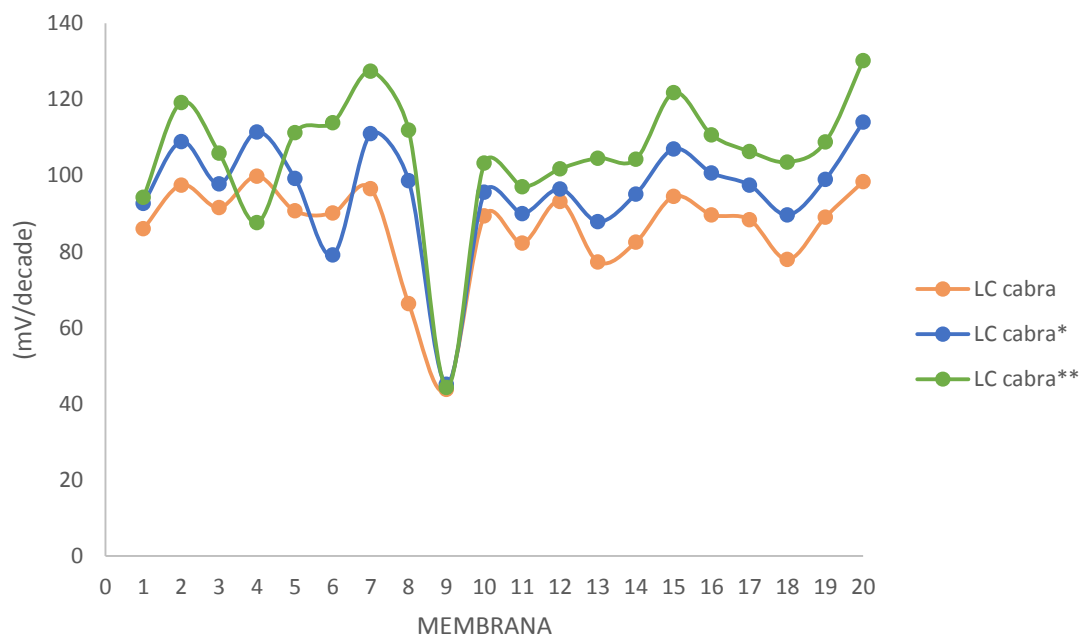


Figura 42. Diferenciación entre leche de cabra con y sin adulteración.

Al igual que en el caso de leche de vaca, se observó que a mayor grado de adulteración la señal potenciométrica se intensificó.

El análisis PCA (Figura 44) refleja que las muestras de leche de cabra con y sin adulteración aparecen separadas de las muestras de leche de vaca con y sin adulteración. Por otro lado, se distinguen también para cada tipo de leche sus muestras con y sin adulteración. Las muestras adulteradas 1:4 aparecen siempre más alejadas de sus originales, resultado que ya se observó anteriormente. Por último, la muestra de mezcla vaca/cabra aparece más próxima a la muestra original de cabra, lo que indica que esta mezcla se parece más a la muestra de cabra, es decir, la leche de cabra, que es una leche más fuerte e intensa, está influenciando más en la mezcla.

En este caso, las componentes principales recogen el 53% (PC1), 20% (PC2) y 11% (PC3), sumando un total de 84%.

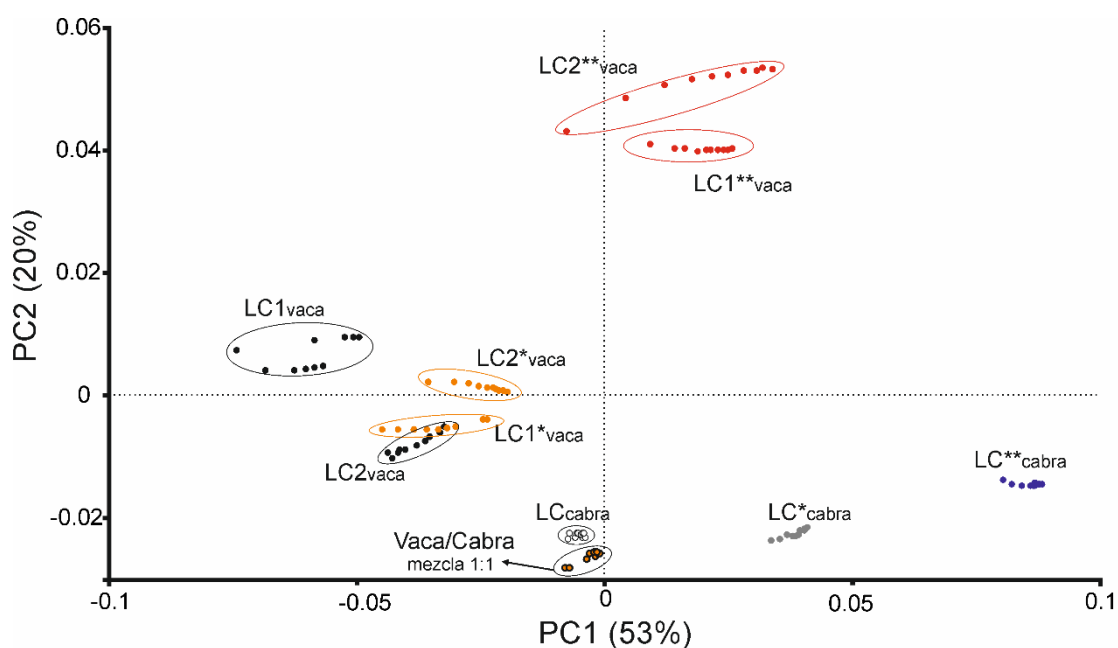


Figura 43. PCA Leches crudas de vaca y cabra, adulteradas y mezcla vaca/cabra.

4.4.3. Análisis estadístico de mínimos cuadrados principales (PLS-1)

Se ha llevado a cabo un análisis multivariante de regresión PLS-1 entre los datos obtenidos con la lengua potenciométrica y los parámetros químicos aportados por el Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León (LILCYL S.A.) (Tabla 8). Este estudio se ha llevado a cabo con el fin de estudiar si, a partir de los datos potenciométricos obtenidos de los análisis en las leches, se pueden determinar los parámetros químicos tradicionales que se obtienen en los laboratorios químicos.

La Tabla 10 recoge los resultados obtenidos para los modelos de regresión PLS-1 que correlacionan los datos potenciométricos obtenidos del análisis de leche con los parámetros químicos de grasa, proteínas, ESM, células somáticas de leche sin pasteurizar (cruda), pasteurizada y tratada con medicación, células somáticas de leche sin pasteurizar (cruda) y pasteurizada, el punto crioscópico y la acidez.

En la tabla se muestran los siguientes parámetros:

- R_C^2 : coeficiente de correlación en la calibración.
- $RMSEC$: error cuadrático medio de la calibración.
- R_P^2 : coeficiente de correlación en la predicción.
- $RMSEP$: error cuadrático medio en la predicción.

Se encontraron buenas correlaciones, tanto en la calibración como en la predicción, con coeficientes de correlación por encima de 0,90 y valores bajos en los errores cuadráticos medios en comparación con el valor de cada parámetro. El



número de variables indica el número de variables latentes que se necesitarían para explicar la covarianza que existe entre la matriz X (datos obtenidos con la lengua potenciométrica) y la matriz Y (parámetros químicos obtenidos en los laboratorios). Un número bajo de variables latentes es indicativo de que la correlación entre ambas matrices es más alta. Por lo tanto, las mejores correlaciones se obtuvieron con respecto a los parámetros de proteínas y lactosa, seguidos del porcentaje de grasa y el valor de ESM.

Con estos resultados preliminares, se puede esperar que la lengua potenciométrica sirva para establecer modelos de predicción que permitan analizar las muestras de leche y predecir parámetros químicos de interés. No obstante, para que el estudio tenga más envergadura habría que analizar más muestras de leche para tener modelos con un gran número de muestras y que aporten más fiabilidad.

Tabla 10. Resultados obtenidos del análisis por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-1).

Parámetro Químico	RMSEC	R_C^2	RMSEP	R_P^2	Nº Variables
Grasas	0,0549	0,9381	0,0610	0,9266	2
Proteínas	0,0106	0,9800	0,0113	0,9778	1
Lactosa	0,0280	0,9503	0,0295	0,9471	1
ESM	0,0241	0,9286	0,0262	0,9187	2
Cel. Cruda y medic.	67390	0,9998	110360	0,9995	3
Punto Crioscópico.	0,0014	0,9630	0,0016	0,9555	3
Acidez	0,0576	0,9952	0,0644	0,9943	3

Capítulo 5:

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se han logrado en este Trabajo de Fin de Grado son:

- Con el sistema de lengua potenciométrica empleado se ha logrado la detección de sales (sabor salado), ácidos (sabor ácido), azúcares (sabor dulce), bases (sabor amargo) y el glutamato monosódico (sabor umami), se ha conseguido diferenciar entre los cinco sabores básicos.
- El sistema de lengua potenciométrica diferencia entre las diferentes concentraciones de disoluciones patrón y por ello se han podido obtener rectas de calibrado y de ellas se ha calculado la sensibilidad de los sensores.
- Se ha desarrollado una lengua biopotenciométrica mediante la utilización de la enzima β -galactosidasa. Con este nuevo sistema de lengua biopotenciométrica se midió de nuevo las disoluciones patrón de galactosa, y comparando los datos obtenidos con los medidos anteriormente con el sistema de lengua potenciométrica, se demostró que mejora la sensibilidad algunos de los sensores a las disoluciones de diferente concentración de galactosa medidas.
- Utilizando la lengua potenciométrica se han realizado medidas en muestras de leches diferentes y después se ha empleado el análisis de componentes principales (PCA) para el tratamiento de datos. Se han obtenido los siguientes resultados:
 - En primer lugar, la lengua electrónica es capaz de discriminar entre las muestras de leche de vaca sin pasteurizar (cruda) y pasteurizadas. El sistema diferenció entre los tipos de leche y entre los diferentes productores.
 - La lengua electrónica es capaz de discriminar entre las muestras de leches adulteradas y sin adulterar, sin pasteurizar (cruda) y leches pasteurizadas, para la leche de vaca y la leche de cabra.



- La lengua electrónica es capaz de discriminar una muestra de leche de cabra adulterada con leche de vaca de leches de cabra y de vaca obteniéndose una clara diferencia entre las medidas de las muestras.
- En cuanto al análisis PLS realizado con las muestras de leche de vaca de los ganaderos 1 y 2 y la leche con restos de medicación, se obtuvieron buenas correlaciones entre los datos obtenidos por el sistema de lengua potenciométrica y los datos químicos (Grasa, Proteínas, Células somáticas; ESM, Punto crioscópico y la acidez) aportados por el LILCYL S.A.

Finalmente se ha demostrado que la lengua electrónica se puede utilizar para el análisis de leche, además de que es un sistema portátil, barato y rápido que puede emplearse para análisis en procesos industriales.

En cuanto a una posible línea de investigación futura, sería de interés para la implementación de las lenguas potenciométricas en la industria, la mejora de los sensores con el uso de diferentes enzimas o nanopartículas que hagan más selectivos los sensores que forma la red.

BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ruiz, Á. L., & Velo, D. B. (2016). *La leche composición y características*. Sevilla: Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- [2] FEN, & FINUT. (2015). *La leche como vehículo de salud para la población*. Fundación Española de Nutrición y Fundación Iberoamericana de Nutrición.
- [3] López, G. R. (2008). *Estudio de la leche*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica .
- [4] Beatriz Robles, C. e. (2019). *Cómo comprar leche y lácteos*. Obtenido de WebConsultas Healthcare, S.A: <https://www.webconsultas.com/dieta-y-nutricion/higiene-alimentaria/que-es-la-leche-y-tipos-de-leche-existent> Consultado mayo de 2019
- [5] Villalba, M. Á. (17 de Febrero de 2016). *Todo lo que debes saber sobre la leche*. Obtenido de Natural Castelló: <https://www.naturalcastello.com/tipos-leche-composicion-nutrientes/> Consultado mayo de 2019
- [6] Chamizo, F. J. (24 de Febrero de 2019). *Tipos de leche y diferencias: ¿Y usted, qué leche quiere?* Obtenido de As S.A.: https://as.com/ocio/2014/04/15/salud/1397565350_247412.html Consultado mayo de 2019
- [7] El sector lácteo en España. (2019). Obtenido de FeNIL: <http://fenil.org/sector-industrial-lacteo/> Consultado mayo de 2019
- [8] Sainz, H., Sanz, A., Vera, D., Cerdeño, V. J., & Fernández, J. (2018/2019). *Alimentación en España*. Mercasa. Madrid: MIC.
- [9] (17 de enero de 2008). *Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y regist*. Real Decreto, Ministerio de la Presidencia, Ministerio de la Presidencia, España. doi:BOE-A-2008-823
- [10] Mallqui, L. A. (2014). *Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos*. Huancayo, Perú. Ed. Libros y editoriales, TEIA.
- [11] Ruiz, Á. L., Velo, D. B., Muñoz, J. J., & Luque, J. M. (2015). *Determinaciones en Leche, Analíticas*. Consejería de Agricultura y Pesca, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Córdoba. www.juntadeandalucia.es/ Consultado mayo de 2019



- [12] PANREAC QUIMICA, S. (s.f.). *Métodos Oficiales de Análisis, Leche y productos lácteos*. Centre Telemàtica Editorial.
- [13] *Calidad de la leche*. Córdoba: Universidad de Córdoba. http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02_17_37_10a_leche.pdf Consultado mayo de 2019
- [14] (2019). *Código del Sector de Productos Lácteos*. Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado. Madrid: Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado.
- [15] (1985). *Orden de 27 de junio de 1985 por la que se establece el pago de la leche en función de su composición y su calidad higiénica*. Documento BOE, Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- [16] Lindeberg, J.; (1996). Capillary electrophoresis in food analysis. *Food Chemistry*, 55, (1), 73-94.
- [17] (1991). *Real Decreto 1533/1991, de 18 de octubre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos*. Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno. Agencia estatal Boletín Oficial del Estado.
- [18] Fuentes, A., Fresno, M. J., Santander, H., Valenzuela, S., & Gutiérrez, M. F. (2010). Sensopercepción Gustativa: Una Revisión. *Int. J. Odontostomat*, 161-168.
- [19] Podrażka, M., Bączyńska, E., Kundys, M., Jelen, P. S., & Witkowska Nery, E. (2017). Electronic Tongue—A Tool for All Tastes? Ed. *biosensors*. 8.3-1-24.
- [20] Dias, L., Peres, A., Veloso, A., Reis, F., Vilas-Boas, M., & Machado, A. (2009). An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209-217
- [21] Rodríguez Méndez, M.L. *Electronic Noses and Tongues in the Food Industry*; Ed:Elsevier Inc: Amsterdam, The Netherlands, 2016.
- [22] Rodríguez Méndez, M.L.; De Saja, J.A.; González Anton, R.; García Hernández ,C.; Medina Plaza, C.; García Cabezón, C.; Martín Pedrosa, F. (2016) *Electronic noses and tongues in wine industry*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4:81..
- [23] Salvo Comino, C.; García Hernández ,C.; García Cabezón, C.; Rodríguez Méndez, M.L. (2018) *Discrimination of Milks with a Multisensor System Based on Layer-by-Layer Films*. *Sensors*,18,2716.
- [24] Vivancos Bono, J. L.. *Lenguas electrónicas. Una tecnología Innovadora para el análisis de alimentos*. Universidad Politécnica de Valencia, Instituto



Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Valencia.
<http://iqma.webs.upv.es/vinos/PRESENTACION%20LENGUAS%20ELECTRONICAS.pdf> Consultado junio de 2019

[25] Cattrall, R. W. (1997). *Chemical Sensors*. Oxford: Oxford Science Publications.

[26] Labrador Montero, R. H. (2009). *Diseño y caracterización de sensores químicos en estado sólido. aplicación de modelos teóricos para el estudio de interferencias*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

[27] Pividori, M. I. (2008). *Química Bioanalítica. La Química Analítica en la era de la genómica, proteómica y celómica*. Santa Fe, Argentina.

[28] Janata, J. (2009). *Principles of chemical Sensors* (Segunda Edición ed.). USA: Springer.

[29] Mohsen M. Zareh. *Plasticizers and Their Role in Membrane Selective Electrodes. Recent Advances in Plasticizers Edited by Dr Mohammad Luqman. Ed Intech, 2012.*

[30] Gutiérrez, M.; Alegret, S.; del Valle, M. (2008) *Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples. Science Direct Biosensors Bioelectronics* 23 795-802.

[31] Aguilera, T., Lozano, J., Paredes, J. A., Álvarez, F. J., & Suárez, J. I. (2012). Electronic Nose Based on Independent Component Analysis Combined with Partial Least Squares and Artificial Neural Networks for Wine Prediction. *Sensors*, 12, 8055-8072.

[32] Medina Plaza, C.; García Hernández, C.; De Saja, J.A.; Fernández Escudero, J.A.; Barajas, E.; Medrano, García Cabezón, C.; Martín Pedrosa, F.; Rodríguez Mendez, M.L. The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes. *LWT Food Sci. Technol.* 2015, 62, 940-947.