



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Mecánica

DETECCIÓN DE VINOS MEDIANTE UNA RED DE  
BIOSENSORES DE PIRROL Y NANOPARTÍCULAS  
DE ORO.

Autor:

Marta Romero García

Tutor:

García Cabezón, Cristina

Departamento de Ciencia de los  
Materiales e Ingeniería de la Metalúrgica

Valladolid, Julio 2016

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

- AGRADECIMIENTOS -

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora, Cristina, toda la dedicación y esfuerzo que ha puesto ayudándome en la realización de este trabajo.

Además, quiero agradecer a todas las personas de ambos laboratorios, en especial a Celia y a Fernando, por ayudarme en la realización de este trabajo y en todas las dudas que se me pudieran plantear.

También, a las compañeras que han estado conmigo, haciendo las horas de trabajo en el laboratorio más amenas.

Y por último a Fernando, nada habría sido posible sin tu apoyo este último año.

Muchas gracias a todos.

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

**INDICE**

RESUMEN (ABSTRACT) .....	9
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	11
<b>CAPÍTULO 1 . JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
1.1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	17
1.3. OBJETIVOS .....	18
1.4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	19
<b>CAPÍTULO 2. ASPECTOS GENERALES.FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>21</b>
2.1. SENSORES QUÍMICOS.....	25
2.1.1. Biosensores.....	27
2.1.1.1. Biosensores enzimáticos .....	28
2.1.1.2. Biosensores de glucosa oxidasa .....	29
2.1.1.3. Biosensores de tirosinasa.....	30
2.2. POLÍMEROS CONDUCTORES .....	31
2.3. NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	33
2.4. LENGUAS ELECTRÓNICAS.....	34
2.4.1. Aplicaciones de la lengua electrónica en el análisis y discriminación de vinos.....	37
2.5. TRATAMIENTO DE DATOS .....	38
2.5.1. Método Kernel .....	39
2.5.2. Análisis en Componentes Principales (PCA) .....	40
2.5.3. Análisis de Factores Paralelos (PARAFAC) .....	41
2.5.4. Método de mínimos cuadrados (PLS) .....	41
2.6. ANTECEDENTES .....	43

<b>CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>47</b>
3.1. INTRODUCCIÓN .....	51
3.2. PREPARACIÓN DE LOS SENSORES .....	51
3.2.1. Material de laboratorio empleado. ....	51
3.2.2. Preparación del sustrato .....	52
3.2.3. Preparación de las disoluciones.....	54
3.3. PREPARACION DE LA CELDA ELECTROQUÍMICA .....	56
3.3.1. Material de laboratorio empleado. ....	56
3.3.2. Deposición de las disoluciones.....	57
3.4. PREPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES .....	60
3.4.1. Material de laboratorio empleado .....	60
3.4.2. Incorporación de las enzimas .....	61
3.5. MEDIDA EN VINOS Y MOSTOS.....	63
3.5.1. Material de laboratorio empleado .....	63
3.5.2. Toma de datos en vinos y mostos .....	64
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
4.1. INTRODUCCIÓN .....	71
4.2. LENGUA ELECTRÓNICA EN MOSTOS.....	71
4.2.1. Influencia del tipo de sustrato .....	72
4.2.2. Influencia de las nanopartículas obtenidas por cogeneración. ....	77
4.2.3. Influencia del tipo de enzima utilizado.....	80
4.2.4. Influencia del medio de ensayo .....	82
4.3. LENGUA ELECTRÓNICA EN VINOS.....	91
4.3.1. Influencia del tipo de sustrato .....	92
4.3.2. Influencia de las nanopartículas obtenidas por cogeneración .....	95
4.3.3. Influencia del tipo de enzima utilizado.....	98
4.3.4. Influencia del medio de ensayo .....	101

4.4.	TRATAMIENTO DE DATOS .....	108
4.4.1.	Introducción .....	108
4.4.2.	Análisis en componentes principales (PCA).....	110
4.4.2.1.	PCA en mostos.....	110
4.4.2.2.	PCA en vinos .....	112
4.4.2.3.	PCA en vinos y mostos .....	113
4.4.3.	Análisis de factores principales (PARAFAC) .....	115
4.4.3.1.	PARAFAC en mostos.....	115
4.4.3.2.	PARAFAC en vinos.....	119
4.4.3.3.	PARAFAC en vinos y mostos. ....	123
4.4.4.	PLS en mostos. ....	127
4.5.	CONCLUSIONES.....	128
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>131</b>

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



**RESUMEN (ABSTRACT)**

En las últimas décadas, la industria de la alimentación centra gran parte de su atención en el control de la calidad de los productos. Por ello se han desarrollado nuevos sistemas que permiten un control exhaustivo de las propiedades de los alimentos.

Por ello en este trabajo se ha desarrollado una red de biosensores o lengua bio(electrónica) para estudiar su capacidad discriminadora en vinos y mostos a partir de su diferente composición. Esta red, está constituida por electrodos de diferentes sustratos, como son platino y acero inoxidable. Estos electrodos se han modificado con pirrol y nanopartículas de oro. Además, se les ha incorporado tirosinasa y glucosa oxidasa, enzimas que proporcionan mayor especificidad a la red.

Cada biosensor refleja señales diferentes tanto en vinos como en mostos, demostrando así la capacidad discriminadora de nuestra red. Además, se ha logrado obtener una lengua bio(electrónica) con una importante selectividad cruzada que permite obtener un alto grado de clasificación.

**Palabras clave:** biosensores, lengua bio(electrónica), nanopartículas de oro, mosto, vino.

For the last decades, food industry has focused its attention on product quality control. As a result, new systems with the ability to control the properties of food products have been developed.

For this reason, this Project develops a biosensor array or bioelectronic tongue, in order to study its ability to discriminate different red wines and musts from their composition. This specific array consists of electrodes with different substrates like Platine and stainless steel. These electrodes have also been modified using pyrrole and gold nanoparticles. Besides, they incorporate two different enzymes, tyrosinase and glucose oxidase, which improve the selectivity of the system.

Each biosensor shows different signals for the red wine and must samples, showing the discriminatory power of the array. Finally, a bioelectronic tongue with good selectivity and high performance has been obtained.

**Keywords:** biosensors, bioelectronic tongue, gold nanoparticles, must, red wine.

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

GOx: Glucosa Oxidasa

Tyr: Tirosinasa

Py: Polipirrol

AuNp´s: Nanopartículas de oro

PCA: Análisis de componentes principales.

PARAFAC: Análisis de factores paralelos.

PLS: Análisis de mínimos cuadrados.

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## Capítulo 1

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

## INDICE

1.1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	17
1.3. OBJETIVOS .....	18
1.4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	19

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



## **1.1. INTRODUCCIÓN**

En esta memoria de trabajo de fin de grado, en primer lugar, se describen las razones para llevar a cabo la realización de este trabajo de investigación sobre una red de biosensores con aplicación en la industria de la alimentación, continuando y perfeccionando los pasados estudios acerca de este tema. A continuación, se detallan los objetivos perseguidos durante el desarrollo de este trabajo. Y para finalizar, se describe la estructura del presente trabajo con los diferentes apartados de que consta.

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

El grupo de investigación UVaSens de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid (UVa), en el cual se ha llevado a cabo este trabajo, lleva a cabo una serie de investigaciones orientadas a la creación y aplicación de redes de sensores y biosensores capaces de analizar y diferenciar muestras complejas en la alimentación. Esta red de sensores y biosensores constituye lo que se denomina lengua electrónica que dispone de un amplio número de campos de aplicación entre los cuales cabe destacar el análisis de vinos. Algunas de estas redes se basan en sensores voltamétricos con selectividad cruzada acoplados a un software de reconocimiento de patrones. Todo ello se consigue gracias a un equipo multidisciplinar en el que participamos tanto ingenieros, como químicos y físicos, debido a la complejidad de los biosensores electrónicos. Este trabajo, por tanto, se integra dentro de esta línea de investigación en cuanto al desarrollo de una red de biosensores que se utilizará para discriminar vinos y mostos.

Este equipo de investigación lleva dedicando mucho esfuerzo al desarrollo de sensores y redes de biosensores (lenguas bio(electrónicas)) para el análisis de vinos. Estas investigaciones, en colaboración con diferentes bodegas, han permitido discriminar y clasificar vinos según la variedad de uva, tipo de crianza, barrica utilizada, etc. En el presente trabajo, dichas investigaciones se han orientado a la construcción de una red de biosensores o lengua bio(electrónica) que, acoplada a un software de reconocimiento de patrones, sea capaz de analizar y discriminar vinos y mostos de ocho variedades diferentes.

Se trata de un trabajo en varias fases, en el que se diseñará un primer sistema capaz de discriminar vinos y mostos. Para ello, se desarrollan diferentes sensores capaces de detectar de modo conjunto los distintos componentes de cada variedad de vino y mostos, y a continuación se utilizará para discriminar entre vinos y mostos procedentes de varias bodegas de Castilla y León, observando diferencias y analogías entre vinos y mostos de la misma variedad.

### **1.3. OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo es desarrollar una red de bio (sensores) capaces de discriminar vinos y mostos procedentes de uvas de diferentes variedades, basándose en su diferente contenido en azúcares y polifenoles.

En primer lugar, se han desarrollado un conjunto de electrodos con dos sustratos diferentes, acero inoxidable y platino para construir unos sensores poliméricos modificados con nanopartículas de oro, de modo que den a los sensores propiedades electroquímicas y electrocatalíticas que mejoren las propiedades de los mismos.

A partir de esta red de sensores poliméricos se han construido biosensores mediante la adición de enzimas como glucosa oxidasa y tirosinasa para mejorar la detección de azúcares y fenoles.

Esta red se aplicará a mostos y vinos de ocho variedades distintas con objeto de analizar las diferencias y similitudes entre los mostos de uva y los vinos desarrollados a partir de estos mostos.


#### **1.4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

Tras mostrar los objetivos y la justificación de la realización de este trabajo, se explica de una manera más profunda y detallada los aspectos teóricos relativos a este trabajo, como son los sensores químicos, biosensores, lengua electrónica y tratamiento de datos. A continuación, se describe la metodología experimental donde se enumera el material empleado, así como el procedimiento llevado a cabo estos meses en el laboratorio para la construcción de nuestra red de biosensores. Se realiza una descripción de las respuestas voltamétricas obtenidas por los distintos sensores en mostos y vinos. Se realiza el estudio estadístico de los datos para obtener las oportunas correlaciones entre en primer término mostos de ocho variedades, en segundo lugar, entre vinos de ocho variedades y finalmente entre mostos y vinos de las diferentes variedades.

Por último, se evalúan los resultados acerca de la capacidad discriminadora de nuestra red de bio(sensores) así como las correlaciones obtenidas con la composición química de los mostos.

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



# **ASPECTOS GENERALES. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES**

## **Capítulo 2**



**INDICE**

2.1. SENSORES QUÍMICOS.....	25
2.1.1. Biosensores.....	27
2.1.1.1. Biosensores enzimáticos .....	28
2.1.1.2. Biosensores de glucosa oxidasa .....	29
2.1.1.3. Biosensores de tirosinasa.....	30
2.2. POLÍMEROS CONDUCTORES .....	31
2.3. NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	33
2.4. LENGUAS ELECTRÓNICAS.....	34
2.4.1. Aplicaciones de la lengua electrónica en el análisis y discriminación de vinos.....	37
2.5. TRATAMIENTO DE DATOS .....	38
2.5.1. Método Kernel .....	39
2.5.2. Análisis en Componentes Principales (PCA) .....	40
2.5.3. Análisis de Factores Paralelos (PARAFAC) .....	41
2.5.4. Método de mínimos cuadrados (PLS) .....	41
2.6. ANTECEDENTES .....	43

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



## 2.1. SENSORES QUÍMICOS

Los sensores químicos suponen hoy en día una alternativa a los métodos analíticos estándar basados en técnicas químicas y bioquímicas. Nos permiten obtener mayor información analítica en unas condiciones no convencionales.

El campo de desarrollo de los sensores químicos es muy amplio. Son utilizados en aplicaciones tales como control de procesos, seguridad, higiene industrial, control de calidad de procesos, seguridad, higiene industrial, control de emisiones, diagnósticos clínicos, alarmas de seguridad en el hogar, etc. Entre las ventajas con las que este tipo de instrumentación cuenta destacan los beneficios económicos y sociales. Esta tecnología nos permite obtener información en tiempo real con un bajo coste y un fácil manejo. Los sensores químicos son dispositivos de pequeñas dimensiones, fiables, selectivos y portátiles. En cuanto a los inconvenientes podemos mencionar las numerosas técnicas de laboratorio necesarias para realizar el pretratamiento de las muestras, lo que conlleva un consumo de tiempo elevado.

En nuestro caso nos centraremos en el uso de los sensores químicos en la industria alimenticia. La calidad de la comida depende del contenido en nutrientes y vitaminas. Los azúcares pueden ser determinados por sensores enzimáticos mediante los cuales las enzimas proporcionan la información del compuesto objetivo. Las enzimas también son capaces de terminar los distintos tipos de ácidos contenidos en los alimentos, así como el etanol y el glicerol el cual es el producto secundario principal en la fermentación del vino.

Los sensores químicos pueden ser definidos como dispositivos autónomos capaces de proporcionar información química en tiempo real acerca de una muestra. Como información química se entiende la concentración de una o más especies químicas en la muestra. Las muestras reciben el nombre de analitos.

No deben ser confundidos con los sensores físicos, dispositivos encargados de determinar magnitudes físicas, como presión, fuerza, velocidad y temperatura entre otras.

Un sensor químico realiza dos funciones: reconocimiento y transducción. Estas funciones están integradas en el mismo dispositivo. En primer lugar, el analito interacciona de una manera más o menos selectiva con el elemento de reconocimiento que muestra afinidad por el analito.

El elemento de reconocimiento se encarga de transformar la información química en una forma de energía que pueda ser medida por el transductor el cual la convierte en una señal de salida útil. [4]

En cuanto al proceso de transducción, se lleva a cabo gracias a la proporcionalidad existente entre la concentración de una película electroactiva determinada y la corriente eléctrica registrada al oxidarse y reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado.

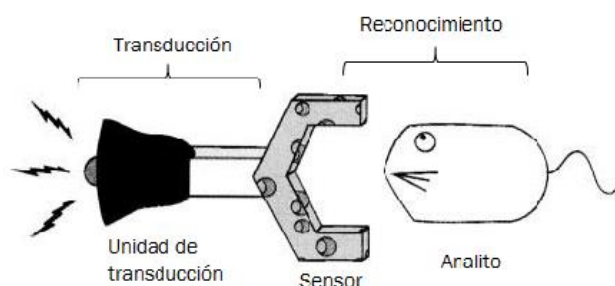


Figura 1. Esquema de un sensor químico.

Existen diferentes tipos de sensores químicos basados en las diferentes técnicas de transducción, como los electroquímicos, ópticos, térmicos, magnéticos, resistivos y gravimétricos.

En el estudio de este trabajo nos centraremos en sensores electroquímicos voltamétricos.

La electroquímica es una técnica empleada en medios líquidos fundamentada en el transporte y distribución de iones entre una capa electroactiva y un conductor sólido (electrodo). Esta técnica requiere el uso de una celda electroquímica formada por tres electrodos, el de trabajo, contraelectrodo y el electrodo de referencia. Estos electrodos estarán sumergidos en distintas disoluciones, que serán disoluciones de pirrol si se está depositando la película o disoluciones con un analito o con el mosto en el caso de estar ensayando el electrodo ya modificado con la película. El contraelectrodo está formado por un filamento de platino, y su utilidad es conducir la corriente desde la fuente de la señal a través de la disolución al electrodo de trabajo. El electrodo de referencia será en este caso un electrodo con electrolito Ag /AgCl. [2]

La técnica empleada en estos sensores para la deposición de las películas de pirrol es la cronopotenciometría. Esta técnica consiste en el estudio del comportamiento del potencial de un electrodo indicador con el tiempo. De este modo, al electrodo donde se depositará la película de pirrol le llega una intensidad de corriente constante ( $I$ ) y se podrá medir la variación de potencial ( $V$ ) en función del tiempo ( $t$ ), generando un gráfico característico de cada ensayo. Con esta técnica se consigue una alta reproducibilidad de los experimentos dado que la velocidad del proceso es siempre constante. Las propiedades del polímero sintetizado son función del potencial al que está sometido el electrodo de trabajo, por este motivo es necesario controlar las condiciones del experimento (disolución y geometría de la celda), para no permitir la aparición de altos potenciales que puedan dar lugar a la descomposición de la película que se está generando. [2]

Para la caracterización de los diferentes vinos se emplea otra técnica electroquímica, la voltametría cíclica. Para la realización de esta técnica se aplica un potencial que va variando linealmente a partir de un potencial inicial. Esta variación se aplica hasta un potencial límite, a partir del cual se regresa al potencial de partida. De este modo el electrodo será sometido a dicho potencial variable y puede sufrir un proceso de oxidación y reducción. Los potenciales de oxidación y reducción cambiar en función de la disolución donde se encuentre sumergido el sensor. [2]

También hay que presentar una especial atención a los biosensores. Se trata de otro tipo de sensores químicos modificados que son de gran interés en este trabajo.

### **2.1.1. Biosensores**

Los biosensores son sensores químicos que incorporan un elemento biológico (ácido nucleico, enzima, tejido, célula) como elemento de reconocimiento asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito.

Como consecuencia de esta unión entre el elemento biológico de reconocimiento y el analito se produce la variación de las propiedades físico-químicas (PH, transferencia de electrones, calor, cambio de potencial, cambio de masa, etc.) las cuales son detectadas por el transductor. [1]

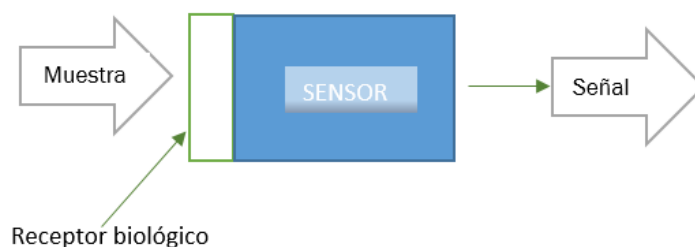


Figura 2. Esquema de funcionamiento de un biosensor

Entre las ventajas que presentan los biosensores comparten todas aquellas que se les atribuyen a los sensores químicos, pero además presentan una mayor sensibilidad y selectividad. De este modo permite el análisis de compuestos en concentraciones muy pequeñas (mg/l) centrándose exclusivamente en la interacción con el analito, sin interferir con otros componentes.

Además, pueden llevar a cabo la determinación de distintos analitos de forma simultánea, lo que hace que una combinación de ellos podría darles ventaja frente a las técnicas de análisis convencionales. [6]

#### 2.1.1.1. Biosensores enzimáticos

Los biosensores enzimáticos son aquellos en los que el elemento biológico receptor es una enzima. Las enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química sin afectar al equilibrio de la misma. [4]

El mecanismo de la catálisis enzimática es el siguiente:

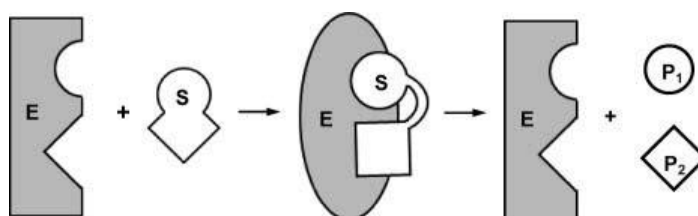


Figura 3. Mecanismo de catalización por enzimas. E es la enzima, S es el sustrato, y P1 y P2 son productos. E-S es el estado intermedio enzima-sustrato.

La aplicación de las enzimas en el diseño del biosensor se basa en aumentar la especificidad por un analito que no se puede detectar de manera directa. Para la fabricación del biosensor enzimático se lleva a cabo la inmovilización de la enzima mediante un proceso en el cual se confina en una región definida del espacio sobre el transductor electroquímico, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad. Es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor ya que según el tipo de técnica empleada dependerá la vida útil y la sensibilidad del mismo. [1]

Durante mucho tiempo la disponibilidad de las enzimas se limitó a las proporcionadas por organismos vivos naturales. Recientemente la ingeniería genética ha desarrollado una amplia variedad de enzimas que son capaces de cumplir con los requisitos específicos.

A continuación, se van a describir los biosensores con las enzimas utilizadas en este trabajo que son la glucosa oxidasa y la tirosinasa.

La combinación de biosensores con enzimas redox (generalmente oxidadas o deshidrogenas) se han empleado para analizar una gran variedad de muestras con contenido en glucosa, urea o compuesto fenólicos que son de gran interés en la discriminación de vinos, clave en nuestro trabajo.

#### 2.1.1.2. Biosensores de glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa es una enzima oxidoreductasa extraída principalmente del *Aspergillus Niger* y *Penicillium amagasakiense*.

Es ampliamente utilizada en la industria alimenticia para determinar y cuantificar la glucosa en gran variedad de productos. Debido a su bajo coste y a una

amplia estabilidad la convierte en una enzima muy apropiada para el desarrollo de biosensores. [4]

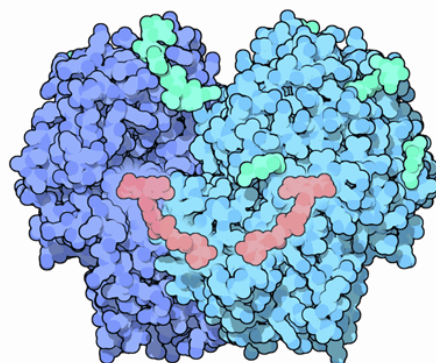
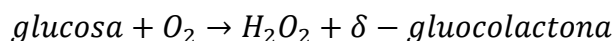


Figura 4. Esquema de la estructura de la glucosa oxidasa

En un medio con PH neutro (PH7) la glucosa oxidasa se encuentra en un 63,6 % como  $\beta$ -D-glucopiranososa y un 36,4 %  $\alpha$ -D-glucopiranososa. La glucosa oxidasa se une específicamente a la  $\beta$ -D-glucopiranososa y no interacciona con  $\alpha$ -D-glucopiranososa. Esto último no le impide ser capaz de oxidar toda la glucosa en la solución dado que sólo la  $\beta$ -D-glucopiranososa es altamente específica.

Para catalizar la oxidación de la glucosa presente en la solución, la glucosa oxidasa utiliza el oxígeno molecular para dar lugar a la formación de  $\delta$  glucolactona y peróxido de hidrógeno.



Donde la glucosa es el sustrato, el oxígeno es el cofactor y la glucosa oxidasa la enzima que cataliza la oxidación.

La enzima para actuar como catalizador requiere un cofactor del grupo prostético FAD, flavín adenín dinucleótido. El FAD se utiliza en las reacciones de oxidación-reducción biológicas como aceptor /donador de electrones intermedio. En la reacción catalizadora de la glucosa oxidasa, en primer lugar, el FAD se comporta como aceptor de electrones.

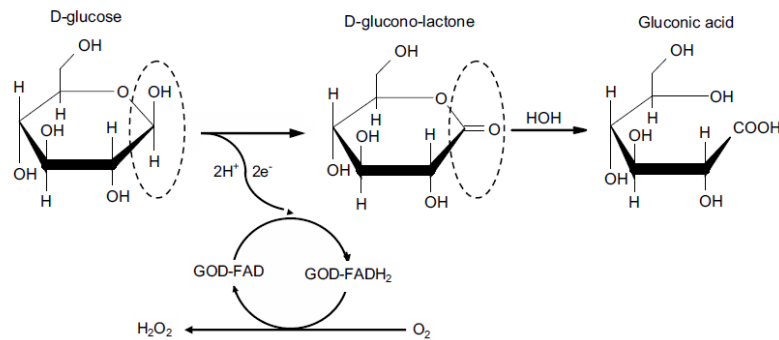


Figura 5. Reacción redox catalizada por GOX.

Al emplear esta enzima, el biosensor aumenta su selectividad dando más importancia a los azúcares presentes en la disolución que al resto de componentes. [1], [5]

### 2.1.1.3. Biosensores de tirosinasa

La tirosinasa también conocida como monofenol monooxidasa se encarga de catalizar la reacción de oxidación de los fenoles. En dichas reacciones se emplea oxígeno que es reducido a agua ( $H_2O$ ) o a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

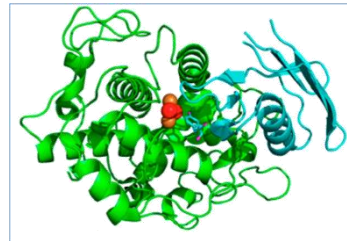


Figura 6. Enzima tirosinasa en un modelo 3D

La inmovilización de la enzima permite obtener respuestas rápidas, estables y sensibles a diferentes compuestos fenólicos. Por otra parte, considerando la importancia que tienen los compuestos fenólicos, debido a su poder antioxidante, en vinos, principalmente en vinos tintos, se trata de una enzima muy apropiada para emplear en nuestra red de biosensores. [7]

## 2.2. POLÍMEROS CONDUCTORES

Un polímero es la macromolécula resultante de la repetición de unidades monoméricas unidas entre sí mediante enlaces covalente a lo largo de la cadena. Las propiedades físico-químicas y mecánicas del polímero estarán determinadas por la naturaleza del monómero y el tipo de enlace covalente entre ellos. [2]

En este trabajo se va a hablar fundamentalmente del polipirrol, polímero conductor empleado en nuestra red de biosensores para la detección de vinos, pero existen más polímeros conductores como la polianilina que son de gran interés y amplían las aplicaciones de los sensores en la industria tecnológica.

El interés industrial de estos polímeros reside en su combinación única de características: electrónicas, ópticas y magnéticas, así como su buena estabilidad medioambiental, fácil síntesis y alta conductividad. Debido a esto los polímeros conductores y en nuestro caso, el polipirrol, a menudo se emplea en biosensores, sensores de gas, cables, microactuadores, materiales electrónicos, baterías, membranas, etc. [10]

El polipirrol se obtiene en su forma conductora por oxidación electroquímica o química del pirrol.

El pirrol es un compuesto orgánico, heterocíclico aromático, formado por un anillo de cinco miembros siguiendo la fórmula  $C_4H_5N$ . A temperatura ambiente se presenta como un líquido incoloro con una densidad de 0,97 mg/l. Tiene una baja solubilidad en agua, pero se puede mezclar con la mayoría de disolventes orgánicos. [2]

En la polimerización se emplea un oxidante que puede ser  $(NH_4)_2S_2O_8$  o  $Fe_2(SO_4)_3$ , lo que neutraliza eléctricamente la carga parcial de la cadena del polipirrol.[9] Esto es debido a la estructura química del pirrol y en general de todos los polímeros orgánicos. Este tipo de polímeros utilizan enlaces dobles y sencillos alternos en sus cadenas, que les permiten conducir la electricidad a través del desplazamiento de cargas que pueden atravesar la cadena polimérica. Aunque las estructuras de estos polímeros tienen la propiedad de poseer orbitales electrónicos  $\pi$  extendidos sobre toda la estructura, es decir, los electrones de estos niveles tienen libertad de movimiento, esto no es suficiente para que un polímero pueda conducir la corriente eléctrica. Para ello es necesario provocar una distorsión de la cadena.

Esta alteración consiste en extraer electrones (oxidación) o insertar electrones (reducción) en la cadena, mediante un proceso de dopado. [2]

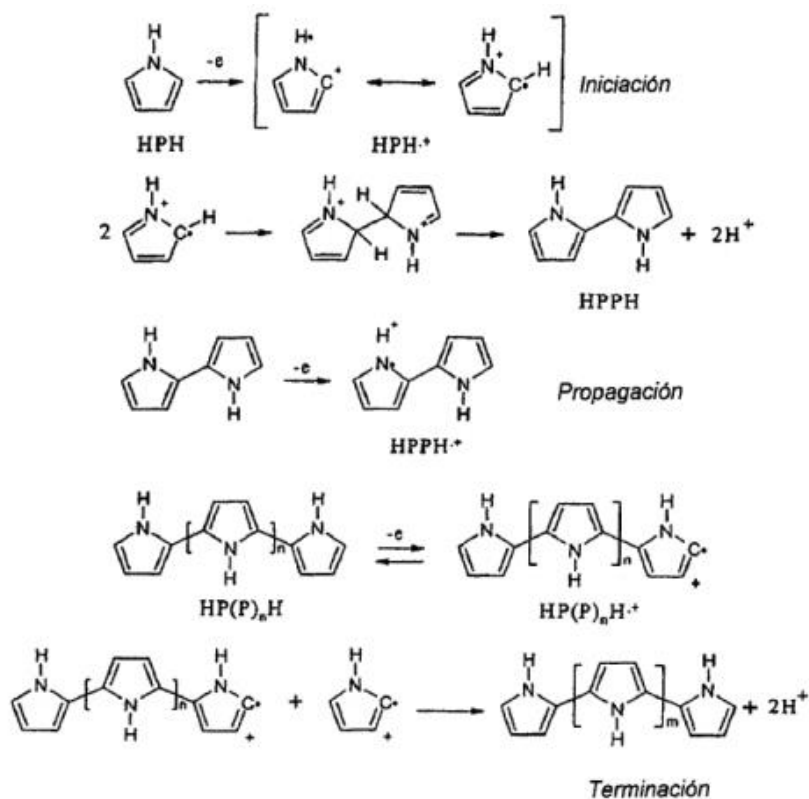


Figura 7. Mecanismo de polimerización del pirrol para dar lugar al polipirrol.

A los polímeros dopados se les conoce como polímeros conjugados.

Se han realizado numerosos estudios sobre los dopantes empleados para mejorar la conductividad del polipirrol. Estas investigaciones se han centrado en dopantes como ácidos o sales. Los ácidos empleados han sido el ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido carbónico ( $H_2C_2O_4$ ) y ácido acético ( $CH_3COOH$ ) y en cuanto a las sales, MBSA, HBSA, DBSA, y NSA. Cuando se empleaban sales como dopantes la conductividad del polipirrol aumentaba en mayor medida que cuando se empleaban ácidos. [9] [10]



Aditivo /Dopante	Conductividad (S/cm)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1.96E-02
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.26E-06
H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	3.09E-08
CH <sub>3</sub> COOH	8.81E-09
MBSA	16
HBSA	11
DBSA	2
NSA	18

Tabla 1. Conductividades para los diferentes dopantes del polipirrol. [9] [10]

Para los posteriores ensayos en mostos y vinos en los que se centra este trabajo se va a emplear el DBSA, aunque presenta una conductividad menor que el resto de sales, su solubilidad es mejor y su coste es reducido frente a las otras.

### 2.3. NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de metales nobles, especialmente las de oro, han despertado un gran interés debido a las interesantes propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas de estos materiales.

De las múltiples aplicaciones de las nanopartículas de oro cabe destacar su empleo para la preparación de sensores y biosensores electroquímicos. En el caso de los biosensores, las nanopartículas de oro se acoplan con los elementos de reconocimiento, permitiendo construir fases sensoras con propiedades mejoradas.

Estas nanopartículas metálicas catalizan los procesos redox que participan en reacciones bioquímicas útiles desde el punto de vista analítico, y que además pueden monitorizarse empleando técnicas electroquímicas. [11]

En el caso de los biosensores las nanopartículas de oro proporcionan una superficie estable para la inmovilización de las enzimas. La enzima inmovilizada permite obtener respuestas rápidas, estables y sensibles a diferentes compuestos fenólicos. Teniendo en cuenta, la importancia nutricional de los compuestos fenólicos debido a su poder antioxidante en los vinos, nos resulta de gran utilidad la introducción de las nanopartículas de oro en los biosensores para la detección de vinos. [7]

## 2.4. LENGUAS ELECTRÓNICAS

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevos sistemas que permiten llevar a cabo un análisis exhaustivo de los productos de la industria de la alimentación. Esto es debido a las exigencias de la industria alimentaria en relación a la calidad de los alimentos y en la necesidad de desarrollar sistemas automatizados que nos permitan medir el sabor y el aroma de forma rápida y precisa.

Dentro de estos sistemas se encuentran las lenguas electrónicas, asunto de estudio en este trabajo, las cuales nos permiten clasificar distintos sabores, detectar productos que alteren la calidad del alimento, productos contaminantes, impurezas y sustancias tóxicas. Como ejemplo, en el campo de la industria vinícola, una lengua electrónica puede discriminar entre varios vinos de una misma variedad, año o denominación de origen.

Anteriormente existían metodologías que proporcionaban precisión en la exactitud y fiabilidad, pero eran destructivas, requerían mucho tiempo y de equipos muy caros, y no eran adecuadas para realizar experimentos in situ. Para superar estos inconvenientes se desarrollaron las lenguas electrónicas, herramientas rápidas y fáciles de usar para determinar la calidad de los alimentos, así como para obtener información global de una muestra líquida con una elevada estabilidad y sensibilidad cruzada, es decir, con capacidad de reproducibilidad a diferentes especies de una muestra líquida compleja de distinta naturaleza, en vez de un compuesto químico específico.

Las lenguas electrónicas se pueden definir como dispositivos formados por una red de sensores acoplados a un sistema de reconocimiento de patrones utilizado para caracterizar muestras complejas y utilizadas como instrumentos analíticos que reproducen artificialmente la sensación del sabor.

Para explicar el funcionamiento de las lenguas electrónicas se puede establecer un cierto paralelismo entre el sistema gustativo humano y las lenguas electrónicas. En el sistema gustativo, las sustancias que producen el sabor son recibidas por las papilas gustativas de la lengua. Esta información genera una señal eléctrica que se transmite a lo largo de la fibra nerviosa al cerebro. Una vez que el cerebro recibe todas las señales eléctricas relativas a las diferentes sustancias químicas presentes, éste las transforma mediante complejos sistemas de reconocimiento, en un sabor concreto. La frecuencia con que se repiten los impulsos indica la intensidad del sabor.

Para ver cómo funciona una lengua electrónica hablaremos de los componentes por los que está formada, como son: (I) la muestra a analizar, (II) conjunto de sensores químicos con selectividad diferente, (III) instrumentación para la obtención de la señal, y (IV) software con el algoritmo apropiado para procesar la señal y obtener los resultados. Los sensores realizan el papel de las papilas gustativas interaccionando con las sustancias responsables del gusto y la interacción da lugar a una señal. La suma de estas señales para todos los componentes de una muestra y para cada sensor da lugar a una huella que es característica de cada sustancia. Con esta red de sensores no se requiere especificidad a una especie, sino al conjunto de una serie de sustancias presentes en una cantidad determinada. Estas señales de las que hablamos, se envían a un ordenador que mediante un software de reconocimiento de patrones hace el papel de cerebro. Existen diferentes métodos de reconocimiento de patrones, como PCA (Análisis en Componentes Principales), PLS (Ajuste por mínimos cuadrados), PARAFAC, etc. Algunos de estos métodos se describirán en el siguiente apartado ya que han sido los empleados para el reconocimiento de señales de la lengua electrónica formada por nuestra red de sensores. [1,12]

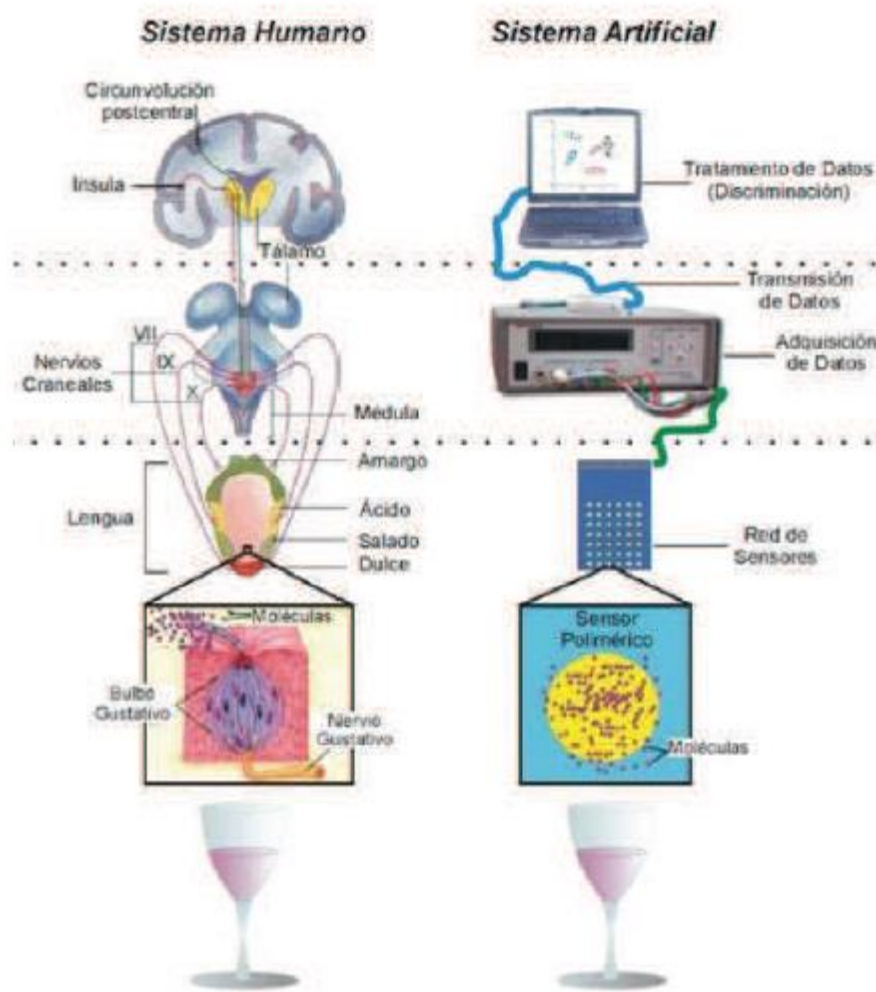


Figura 8. Paralelismo del sistema gustativo humano y de las lenguas electrónicas.

En este trabajo podemos hablar de lenguas bioelectrónicas, debido a que nuestra red está formada por biosensores que combinan la especificidad de la reacción enzima-sustrato, con la habilidad de la detección simultánea de una gran cantidad de compuestos, proporcionando una amplia información de una muestra en una sola etapa. [1]

### **2.4.1. Aplicaciones de la lengua electrónica en el análisis y discriminación de vinos.**

Dentro de las múltiples aplicaciones que presentan las lenguas electrónicas o bioelectrónicas dentro de la industria de la alimentación, algunas de ellas, anteriormente citadas, nos centraremos en el objeto de estudio de este trabajo, el análisis y discriminación de mostos y vinos.

El vino es una sustancia compuesta por unos componentes químicos que son de gran interés, como pueden ser los antioxidantes y los compuestos fenólicos. Estos componentes se han visto relacionados con el hecho de la disminución de enfermedades cardiovasculares en personas que incluyen el vino como producto esencial de su dieta.

Debido a la relación existente en el caso de los vinos entre la capacidad antioxidante de los vinos y el contenido en fenoles, uno de los métodos para evaluar esta capacidad es el índice Folín, así como evaluar el poder reductor de los vinos. Pero no sólo existe este método, sino que durante mucho tiempo se han llevado a cabo estudios experimentales donde se ha estudiado la capacidad antioxidante de los vinos. Todos ellos se han desarrollado a nivel de laboratorio y requieren pretratamientos complejos que conllevan un elevado consumo de tiempo. Las lenguas electrónicas representan una alternativa útil para la determinación de la capacidad antioxidante de los vinos mediante procedimientos sencillos y en un tiempo reducido. [13]

Pero no sólo se han empleado lenguas electrónicas para la determinación de antioxidantes y compuestos fenólicos, sino que también se han desarrollado estudios satisfactorios sobre la influencia del envejecimiento de las propiedades del vino tras su almacenamiento en barricas de roble. Para este estudio experimental se empleó una red de biosensores modificados con polipirrol dopado con DBSA para mejorar su estabilidad y mejorar su especificidad. La técnica electroquímica empleada fue la voltametría cíclica y se pudo apreciar la diferencia entre las diferentes señales obtenidas para las diferentes edades de los vinos, así como en los ciclos obtenidos se observan los picos característicos de los polifenoles. [14].

Esta lengua electrónica no sólo se emplea para la discriminación de vino y mostos a partir de su contenido en antioxidante y polifenoles, sino que también se van a establecer correlaciones matemáticas con la composición química de los mostos estudiados, ampliando así el campo de aplicación de las lenguas electrónicas.

## 2.5. TRATAMIENTO DE DATOS

Uno de los aspectos más críticos de las lenguas electrónicas es el posterior tratamiento de los datos necesario para obtener información de las medidas realizadas con la lengua electrónica. Para ello se utilizan métodos de análisis multivariantes que recogen toda la información que se obtiene de los sensores, seleccionan la que puede ser más significativa y, mediante algoritmos para reconocimiento de patrones, interpretan la señal de todos los sensores. Algunos de los métodos más utilizados son las redes neuronales (Artificial Neural Networks, ANN), el análisis en componentes principales (Principal Component Analysis, PCA), los mínimos cuadrados (Partial Least Squares, PLS), el análisis en factores paralelos (Parafac) etc. Todos estos métodos tienen características distintas en cuanto al tratamiento de datos. Aun así, con los resultados obtenidos se pueden establecer clasificaciones de cada muestra. [12]

El análisis multivariante se aplica cuando el número de variables para construir un modelo de respuesta es demasiado extenso, de manera que parte de estas variables no contienen información significativa. [3]

Cuando se recoge la información de una muestra de datos, lo más frecuente es tomar el mayor número posible de variables. Sin embargo, si tomamos demasiadas variables sobre un conjunto de datos existirán numerosos coeficientes de correlación por lo que sería realmente difícil visualizar relaciones entre las variables. Otro problema que se presenta es la fuerte correlación que muchas veces se presenta entre las variables: si tomamos demasiadas variables, lo normal es que estén relacionadas o que midan lo mismo bajo distintos puntos de vista. Se hace necesario, pues, reducir el número de variables por alguno de los múltiples métodos existentes de análisis multivariante. [16]

En este trabajo se han empleado tres de ellos, PCA y Parafac para el correcto funcionamiento de nuestra lengua electrónica en relación a la discriminación de vino y mostos y PLS para establecer correlaciones entre las señales obtenidas para los mostos y su composición química proporcionada por la Estación Enológica de Castilla y León.

### 2.5.1. Método Kernel

Para una correcta aplicación de los métodos multivariantes es recomendable tratar los datos obtenidos de las señales.

Como se ha dicho el análisis multivariante permite conservar la mayor información posible relativa a las muestras por lo que en nuestro caso era conveniente seleccionar un proceso que nos permitiese procesar todos los puntos que conforman la curva voltamétrica. Para ello se han empleado funciones matemáticas denominadas Kernels. Estas funciones son capaces de capturar todas las características dinámicas de la curva y la respuesta global que esto conlleva.

El método está basado en la implantación de un programa que realiza un pre-tratamiento de datos, seleccionando los parámetros que servirán de entrada para el PCA y el Parafac. Estos coeficientes representativos son obtenidos mediante el cálculo del producto de cada una de estas funciones kernel (figura 9), similares a las típicas curvas con forma de campana, pero unitarias, y la curva objeto de estudio obteniéndose un número de parámetros de parámetros característicos.

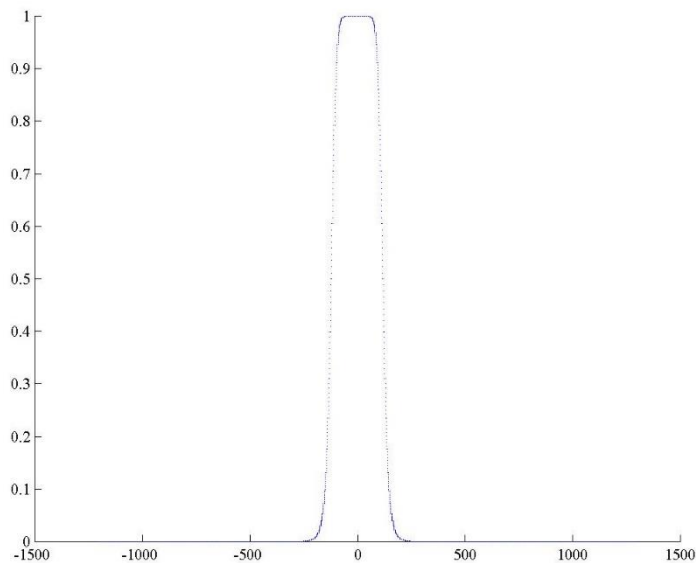


Figura 9. Función Kernel.

### **2.5.2. Análisis en Componentes Principales (PCA)**

El Análisis de Componentes Principales es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. [15]

Estas técnicas fueron inicialmente desarrolladas por Pearson a finales del siglo XIX y posteriormente fueron estudiadas por Hottelling en los años 30 del siglo XX. Sin embargo, hasta la aparición de los ordenadores no se empezaron a popularizar.

Para estudiar las relaciones que se presentan entre  $p$  variables correlacionadas (que miden información común), el conjunto original de variables se puede transformar en un conjunto de nuevas variables incorreladas entre sí (que no tenga repetición o redundancia en la información llamado conjunto de componentes principales. Las nuevas variables, también denominadas componentes, son combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra.

El análisis de componentes principales es una técnica matemática que no requiere la suposición de normalidad multivariante de los datos, aunque si esto último se cumple se puede dar una interpretación más profunda de dichos componentes. [16]

Un aspecto clave de la PCA es la interpretación de las componentes ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales. La elección de las componentes se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; la segunda componente debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por la primera, y así sucesivamente. Una vez seleccionados las componentes principales, se representan en forma de matriz. Cada elemento de ésta representa las correlaciones entre las variables y las componentes principales). Las componentes principales se calculan de manera que la primera componente principal (PC1) explique el máximo de varianza de los datos y que la segunda componente principal (PC2) sea la siguiente que explique el máximo de varianza y así sucesivamente.

Mediante la suma de estas varianzas obtendríamos la varianza total del sistema y podríamos ver cómo de efectivo ha sido. La matriz tendrá tantas columnas como componentes principales y tantas filas como variables.



A continuación, se procede a la representación de las muestras en los ejes formados por las componentes principales donde se puede identificar muestras con características similares por su proximidad.

### **2.5.3. Análisis de Factores Paralelos (PARAFAC)**

El análisis en Factores Paralelos es muy similar al análisis en Componentes Principales.

En este caso, las variables se agrupan en una matriz tridimensional y posteriormente se procede a su representación. El empleo de una matriz tridimensional hace que la red de sensores no se tome como un conjunto, si no que hace que los sensores ganen en especificidad.

Previo a esto, también se selecciona el número de componentes principales que se quiere estudiar, pero en esta ocasión se determinan a partir del gráfico obtenido en la aplicación de Parafac “*core consistency*”.

La representación es muy similar a PCA. Las muestras aparecerán representadas en unos ejes según las componentes que hayamos seleccionado y podemos identificar muestras similares en relación a su proximidad.

Al igual que ocurría con PCA también se han llevado a cabo estudios estadísticos en muestras de mostos con PARAFAC obteniendo unos resultados aceptables en relación a la capacidad discriminativa de las lenguas electrónicas. Cada biosensor de la red de biosensores mostraba una respuesta diferente en función de la variedad de mosto analizada. [18]

### **2.5.4. Método de mínimos cuadrados (PLS)**

El método de mínimos cuadrados nos sirve para establecer una correlación entre los resultados obtenidos por nuestra red de biosensores y la composición química de los mostos proporcionada por la estación enológica de Castilla y León.

En relación a esto se han llevado a cabo estudios sobre el empleo de esta técnica para correlacionar los datos químicos de los principales componentes de muestras de mostos con las señales obtenidas por los biosensores. El método de mínimos cuadrados muestra las correlaciones existentes entre los datos voltamétricos y el contenido en polifenoles medido por métodos químicos.

De la misma forma, PLS muestra la existencia de una correlación con los parámetros relacionados con el contenido en azúcar. De esto se deduce que el uso de las lenguas bio(electrónicas) basadas en redes de sensores modificados con polímeros conductores y enzimas ofrecen ventajas frente a los sensores individuales.

Mediante PLS se obtienen modelos predictivos de clasificación sometidos a “cross-validation” a través del método de exclusión. Las correlaciones muestran altos coeficientes de correlación y errores muy bajos como se aprecia en la tabla número 2. [18]

Parámetros	R <sup>2</sup> (a)	RMSEC <sup>(b)</sup>	R <sup>2</sup> (c)	RMSEC <sup>(d)</sup>	Número de Componentes
Azúcar	0.941	4.45005	0.839	7.31293	4
Grado de Brix	0.972	0.00176	0.865	0.00291	4
Grado 16.8	0.941	0.26438	0.840	0.43420	4
PTI	0.961	1.02511	0.845	2.04940	5
Polifenoles	0.965	1.91428	0.921	3.0353	5

Tabla 2. Correlaciones obtenidas para las diferentes componentes de los mostos donde (a) es el coeficiente cuadrático de calibrado

## 2.6. ANTECEDENTES

Para el desarrollo de la red de biosensores de polipirrol se tuvieron en cuenta diferentes variables que afectarán al comportamiento electroquímico del sensor. En trabajos anteriores realizados en el grupo de UVaSens determinaron las variables óptimas para la fabricación de estos sensores llegando a conclusiones que nos han servido como punto de partida de este trabajo y que se resumen a continuación.

Las variables de estudio fueron:

- Técnica de deposición utilizada: cronopotenciometría y cronoamperimetría
- Tiempos de deposición: 60, 120, 300, 800 seg.
- Sustrato: platino y acero inoxidable.
- Dopantes:  $H_2SO_4$ , DBSA, Y DSA-
- Técnica de adición de las nanopartículas: atrapamiento y cogeneración.
- Concentración de nanopartículas: diluidas al 50 % y al 75 %.

La primera de las conclusiones obtenidas fue la elección de la técnica de cronopotenciometría ya que es la técnica mediante la cual las diferencias entre las distintas electrodeposiciones tanto en platino como en acero inoxidable son mínimas dado por tanto electrodos muy reproducibles. El tiempo seleccionado para cada electrodeposición es de 300 segundos, consiguiendo así capas de polipirrol gruesas y de gran adherencia. Como ya se ha comentado con anterioridad el polipirrol necesita la adición de agentes dopantes para que se comporte como un polímero conductor. Se realizaron ensayos con  $H_2SO_4$ , DBSA Y DSA, dejando evidencia que los que mostraban resultados más parecidos tanto en platino como en inoxidable eran DBSA y DSA. Se concluyó emplear DBSA por su menor precio.

En relación a la técnica de adición de las nanopartículas se observó que mediante el método de cogeneración se obtiene mayor concentración de nanopartículas en la matriz de polipirrol. A la vez, conlleva una mayor facilidad en la preparación de las disoluciones. Para la determinación de la concentración de estas nanopartículas se realizaron ensayos con dos concentraciones diferentes de ácido cloroáurico en una disolución de pirrol. Los resultados obtenidos en cuanto a potencial fueron muy similares por lo que se optó por mezclar a partes iguales, reduciendo así el consumo de ácido cloroáurico.

En el anterior proyecto también se llevó a cabo un estudio sobre el comportamiento electroquímico de los sensores mediante voltametría cíclica utilizando una disolución de KCL 0,1 M como electrolito y en segundo lugar con una disolución de buffer fosfato 0,1M, con la cual se llevó a cabo un estudio cinético. Estos ensayos también nos servirán para corroborar algunas de las conclusiones anteriormente citadas y las cuáles emplearemos en la experimentación de este trabajo.

Tanto en la voltametría cíclica de KCl y la de buffer fosfato se observó que el primer ciclo presentaba un registro muy diferente al resto. Los ciclos comenzaban a asemejarse a partir del quinto ciclo. Esto nos servirá de guía para estudiar las diferentes respuestas obtenidas por los sensores en los vinos, considerando que a partir del quinto ciclo obtendremos mayor información para describir el comportamiento del sensor.

Tras las voltametrías cíclicas realizadas con KCL 0,1 M se llegó a la conclusión que los electrodos de inoxidables se ven deteriorados por la presencia de cloruros después de varios usos. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el acero inoxidable tiene tendencia a presentar corrosión por picaduras en medio con cloruros. En relación a la deposición de las nanopartículas de oro, las obtenidas por atrapamiento presentan los picos de oxidación y reducción a densidades de corriente muy bajas, por lo que ésta técnica queda completamente descartada.

La estabilidad de los electrodos en buffer fosfato es mucho mejor que en cloruro potásico en el caso de utilizar acero inoxidable como sustrato. La voltametría cíclica con KCL nos confirmó las mejores respuestas obtenidas con cronopotenciometría. Con cronoamperimetría, los voltamogramas presentaban menores intensidades, así como se observaba una mayor separación entre los picos anódicos y catódicos y cierta irreproducibilidad. Con la técnica de cronopotenciometría se aprecia un efecto catalítico neto de las nanopartículas, algo que también se demuestra en el caso de buffer fosfato. El estudio cinético con buffer fosfato nos descartó por completo el uso de la cronoamperimetría, dando lugar a resultados mucho más irreproducibles con diferencias en las intensidades y en las posiciones de los picos en las respuestas dadas por sensores con idénticas condiciones.

Para la determinación de los límites de detección mediante la voltametría cíclica se estudió la respuesta de los sensores con catecol y con ácido cafeico, diluidos en buffer fosfato, ya que se demostró que resulta mucho más conveniente que en KCl. Estos compuestos fenólicos están presentes en la mayoría de las uvas y tienen importancia en las características organolépticas y maduración de las mismas.

Para el cálculo de estos límites de detección se hizo necesario restringir el rango de medida de potenciales ya que las altas intensidades de corriente registradas asociadas a los picos de oxidación y reducción del polipirrol impedían observar los picos de oxidación y reducción del catecol. Los experimentos se realizaron en el rango entre -0,1 V hasta +0.8 con lo que la respuesta del polaron-bipolarón no se observa y esto nos permitirá estudiar la respuesta del sensor específica frente al analito catecol. Los límites de detección del ácido cafeico son del mismo orden de magnitud que los del catecol del orden de micromolar, y claramente inferiores a las cantidades en las que comúnmente aparecen estos compuestos fenólicos en las muestras de las uvas.

En nuestro trabajo nos interesa ampliar el rango de potencial de barrido para no perder información ya que los sensores se van a utilizar para detectar muestras complejas. Por tanto, se trató de subsanar los inconvenientes descritos con la incorporación de las enzimas, como se describirá a continuación.

Para aumentar la selectividad para la detección de antioxidantes se emplean enzimas. Para ello se utiliza la tirosinasa como enzima para la detección de fenoles, y la glucosa oxidasa para la detección de azúcares. Para verificar esta conclusión se desarrollaron ensayos empleando sensores con enzimas y sin ellas. Con el empleo de la tirosinasa se observó que no es necesario reducir el rango de potenciales para observar los picos redox del catecol, los cuales no se ven interferidos por los del polipirrol, y que además las intensidades son mucho más elevadas.

Con la incorporación de la glucosa oxidasa, se observa una disminución del pico de reducción, aunque de forma muy leve, debido a que es necesario una cantidad muy elevada de glucosa para que se observe con claridad. Para determinar la clara importancia de las enzimas a la hora de discriminar las diferentes variedades de vinos en un trabajo previo se realizó un estudio de los sensores sin enzimas en cinco variedades distintas y se comprobó que las señales obtenidas eran muy similares y su capacidad discriminatoria muy baja.

Con todos estos antecedentes realizados para la discriminación de mostos, a continuación, se va a estudiar cómo podemos también emplear estos sensores para la detección de vinos y mostos.

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



# PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

## Capítulo 3

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



**INDICE**

3.1. INTRODUCCIÓN .....	51
3.2. PREPARACIÓN DE LOS SENSORES .....	51
3.2.1. Material de laboratorio empleado. ....	51
3.2.2. Preparación del sustrato .....	52
3.2.3. Preparación de las disoluciones.....	54
3.3. PREPARACION DE LA CELDA ELECTROQUÍMICA .....	56
3.3.1. Material de laboratorio empleado. ....	56
3.3.2. Deposición de las disoluciones.....	57
3.4. PREPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES .....	60
3.4.1. Material de laboratorio empleado .....	60
3.4.2. Incorporación de las enzimas .....	61
3.5. MEDIDA EN VINOS Y MOSTOS.....	63
3.5.1. Material de laboratorio empleado .....	63
3.5.2. Toma de datos en vinos y mostos .....	64

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

Este capítulo trata sobre la metodología llevada a cabo para la preparación de la red de biosensores destinada a la detección de vinos y mostos de ocho variedades distintas.

Se describirá cómo se han elaborado los sensores, así como se ha llevado a cabo la deposición de las disoluciones de pirrol y las nanopartículas de oro y como se han incorporado las enzimas a dichos sensores.

También se explicará cómo se han empleado los sensores en los diferentes vinos para la obtención de los resultados concluyentes.

### **3.2. PREPARACIÓN DE LOS SENSORES**

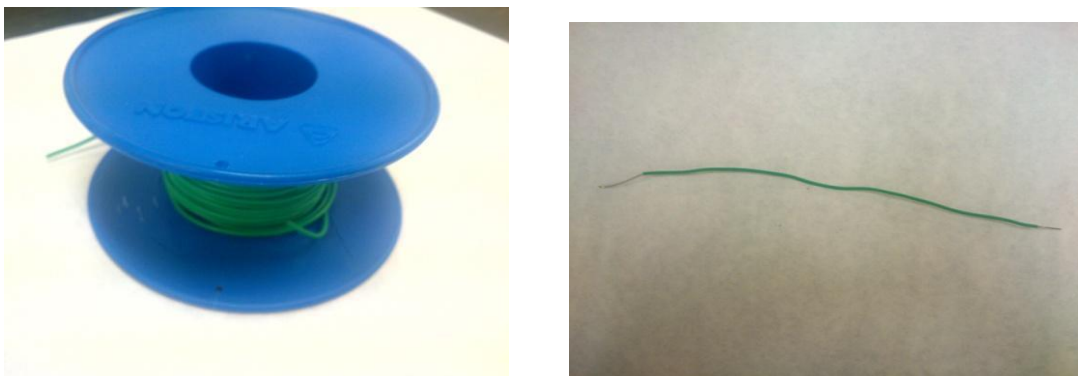
#### **3.2.1. Material de laboratorio empleado.**

- ❖ Vasos de precipitados.
- ❖ Matraces de 25 ml y 10 ml.
- ❖ Vidrios de reloj.
- ❖ Espátulas.
- ❖ Pipetas.
- ❖ Probeta.
- ❖ Balanza de precisión.
- ❖ Soplete

### 3.2.2. Preparación del sustrato

Los sensores se han realizado a partir de dos materiales diferentes, platino y acero inoxidable. El electrodo en una estructura tubular cilíndrica en ambos casos.

Para los sensores de acero inoxidable, cortamos un hilo de 140 mm de este material, tipo AISI 316L. La preparación de los electrodos de platino resulta más laboriosa. En primer lugar, cortamos un hilo de platino de una longitud en torno a 10 mm. A continuación, mediante un soplete y con la ayuda de cobre como material de aporte soldados a ese hilo de platino un hilo de cobre de longitud mayor, en torno a 130 mm constituyendo así un hilo formado por platino y cobre de 140 mm.



*Figura 10. Cable de cobre de 1,5 mm de diámetro*

A continuación, el hilo preparado se introduce un tubo de vidrio de 100 mm de longitud y 2 mm de diámetro interno. Para preparar estos tubos, partimos de un tubo de vidrio de gran longitud que cortamos al tamaño deseado y lijamos los extremos.

Para evitar que el hilo de platino o de acero inoxidable quede suelto dentro del tubo de vidrio preparamos una mezcla de 1:1 de Nural A y B que actuará como cementante. Para llevarlo a cabo, realizamos una mezcla homogénea de estas resinas y la introducimos por un extremo del tubo de vidrio. Presionamos al hilo de platino y al de acero inoxidable de modo que quede centrado y al ras del extremo del tubo de vidrio. De esta forma el electrodo quedará sellado, se consigue que las disoluciones de polipirrol se depositen sólo en la superficie circular del extremo del hilo y que cuando los electrodos entran en contacto con las muestras, éstas no afecten a todo el hilo.

Para garantizar un buen sellado, los electrodos se introducen en el horno durante 6 horas a 70°C.



Figura 11. Electroodos de platino y acero inoxidable sellados con Nural.

Una vez que tenemos los electrodos sellados, tenemos que eliminar la parte de Nural sobrante hasta que el hilo de platino y acero inoxidable alcancen la superficie. Para ello hacemos pasar los electrodos por tres procesos de desbaste y dos procesos de pulido. En los procesos de desbaste empleamos paños de carbono /silicio de diferentes tamaños de grano. En primer lugar, empezamos con un paño de 600, luego 800 y por último 1000. Con estos procesos de desbaste conseguimos eliminar el Nural sobrante. Para que la superficie donde se deposite el polipirrol quede libre de imperfecciones realizamos dos pulidos posteriores, uno mediante una lija de 4000 donde la superficie circular tanto del hilo de platino como del hilo de inoxidable debe quedar a la superficie en el extremo del tubo de vidrio, y otro mediante un paño con una suspensión de sílice. Tras la realización de este último pulido no debe transcurrir mucho tiempo, entre este proceso y la deposición del polipirrol, ya que de esta forma la deposición se realizará de una forma más correcta. Por último, los electrodos se limpian por inmersión parcial en agua desionizada en un baño de ultrasonidos durante unos minutos.



Figura 12. Pulidora empleada en este trabajo para el pulido de los electrodos.

### 3.2.3. Preparación de las disoluciones

Se preparan dos disoluciones diferentes:

- Disolución de polipirrol

Esta disolución contendrá una concentración de polipirrol diluido en agua desionizada, y una concentración de dopante que proporcionará al polipirrol la suficiente conductividad para su deposición. Como dopante se empleará DBSA 0,1 M.

En primer lugar, pesamos en un vidrio de reloj 1,7424 g de DBSA los cuales se introducen en un vaso de precipitados con 20 ml de agua desionizada para su disolución. El DBSA es difícil de disolver por lo que para agilizar este proceso introducimos el vaso de precipitados con la disolución de DBSA en un agitador con ultrasonidos hasta que esté completamente disuelto.



Figura 13. Dispositivo de ultrasonidos.

A continuación, mediante una pipeta se introducen 0,750 ml de polipirrol en un matraz de 25 ml. A este matraz se añade la disolución de DBSA y completamos con agua desionizada hasta los 25 ml. De este modo se ha conseguido una disolución de 25 ml de pirrol 0,2 M y DBSA 0,1 M.



Figura 14. Frasco de 25 ml de pirrol al 98 %, marca ALDRICH.

- Disolución de cloruro de oro

Esta disolución contendrá una cantidad de oro suficiente para la adición de nanopartículas de oro a la disolución de polipirrol.

Para la preparación de esta disolución tenemos que introducir en un vaso de precipitados de 5 ml, 0,004 g de cloruro de oro. Para ello nos ayudamos de una balanza analítica de precisión. Se debe controlar que las cantidades sean correctas, ya que una mala elección de las mismas puede provocar una mala deposición de la disolución en los electrodos y como consecuencia una mala medición de las muestras. A continuación, disolveremos el cloruro de oro con ayuda de agua desionizada hasta completar 10 ml en un matraz.

Una vez que tenemos ambas disoluciones, es conveniente mezclar una cantidad conveniente de ambas para que sea posible comparar el efecto de una disolución en la que intervienen las nanopartículas de oro con otra en la que no están presentes, teniendo en ambas la misma concentración de dopante y pirrol. Para ello, mezclamos 10 ml de la disolución de pirrol con 10 ml de agua desionizada en una probeta. Esta será la disolución que no contenga nanopartículas de oro. Por otro lado, mezclamos 10 ml de la disolución de pirrol con 10 ml de la disolución de cloruro de oro. De este modo obtenemos dos disoluciones del mismo volumen con la misma concentración de pirrol y dopante. Las disoluciones que se obtienen son disolución de 20 ml con una concentración de pirrol 0,2 M Y DBSA 0,1 M.

Posteriormente, estas disoluciones se colocarán en la celda electroquímica para realizar la deposición en los electrodos.

### 3.3. PREPARACION DE LA CELDA ELECTROQUÍMICA

#### 3.3.1. Material de laboratorio empleado.

Para llevar a cabo la deposición de las disoluciones en los electrodos hemos empleado el siguiente material de laboratorio:

- ❖ Guantes de latex.
- ❖ Probetas.
- ❖ Cápsulas de eppendorf.
- ❖ Celda electroquímica
- ❖ Mechero
- ❖ Potenciostato PARSAT 2273

La celda electroquímica está constituida por una serie de elementos:

- ❖ **Electrodo de trabajo:** como electrodos de trabajo se han empleado los biosensores preparados como se ha indicado en los apartados anteriores. Este electrodo se coloca en la parte central del sistema. El electrodo de trabajo se sumergirá aproximadamente un centímetro en la disolución.
- ❖ **Electrodo de referencia:** como electrodo de referencia se ha usado el electrodo  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$  3M (*figura 15*). Este electrodo debe estar correctamente limpio, para ello siempre que se usa se lava el extremo con agua desionizada. La disposición del mismo en el sistema es a la izquierda.



*Figura 15. Electrodo de referencia  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$  3 M*



- **Contraelectrodo:** como contraelectrodo se ha usado un hilo de platino (*figura 16*). Al igual que ocurría con el electrodo de referencia es necesario purificarlo, para ello se quema el extremo que va a estar en contacto con la disolución con un mechero y se introduce en una disolución de ácido sulfúrico. A continuación, se lava con agua desionizada. La disposición del contraelectrodo es a la derecha de la celda electroquímica.



*Figura 16. Contraelectrodo de platino.*

### **3.3.2. Deposición de las disoluciones**

Las disoluciones que introduciremos en la celda electroquímica son las resultantes de mezclar 10 ml de la disolución de polipirrol con 10 ml de agua desionizada, y por otro lado la resultante de mezcla 10 ml de la disolución de polipirrol y 10 ml de disolución de cloruro de oro. Para llevar esto a cabo y proceder a la deposición se emplea un conjunto de dos celdas electroquímicas, una de menor tamaño que la otra. En la de menor tamaño se añadirá la disolución. Esta celda se introducirá en la de mayor tamaño, que es la que irá al soporte que va conectado al potencióstato. Los electrodos deben estar separados al menos un centímetro entre sí. De esta forma no habrá contacto con ellos y la disolución se depositará correctamente.



Figura 17. Disposición de los electrodos en el interior de la celda electroquímica.

El potenciostato empleado es el Potenciostato-Galvonstato PARSAT 2273 de Princeton Applied Reserach en el cual se muestra en la figura. Se trata de un equipo conectado a un ordenador LG y controlado con el software POWERSUITE empleado en la deposición a través del cual se selecciona el tipo de experiencia voltamétrica a realizar, las condiciones en las que se quiere llevar a cabo, así como el control del inicio y final del mismo.



Figura 18. Potenciostato – Galvanostato PARSAT 2273 de Princeton Applied Research

Una vez conectados los electrodos al potenciostato se establecerán las condiciones de deposición mediante el programa informático POWERSUITE



Figura 19. Software Electrochemistry PowerSuite Princeton Applied Research.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la deposición se va a realizar mediante un ensayo de cronopotenciometría bajo las siguientes condiciones:

- Tiempo de deposición: 300 s.
- Velocidad de barrido: 100mV/s
- Intensidad: 0,2 mA

Una vez finalizado el ensayo, procedemos a extraer el electrodo de trabajo de la celda electroquímica y verificamos que la deposición se ha llevado a cabo de forma correcta. Para ello, en primer lugar, limpiamos el electrodo con agua desionizada y comprobamos mediante inspección visual el extremo del hilo introducido en el tubo de vidrio se ha teñido de un color negro.



*Figura 20. Electrodo de platino donde se puede observar en la parte superior la película de polipirrol deposita de color negro.*

### **3.4. PREPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES**

Sobre la base de los electrodos anteriormente preparados se procederá a la adicción de las enzimas para aumentar su especificidad. Como se ha comentado en apartados anteriores de este trabajo, las enzimas que añadiremos serán tirosinasa y glucosa oxidasa.

#### **3.4.1. Material de laboratorio empleado**

- ❖ Micropipeta Pluripet
- ❖ Cápsulas de Eppendorf.
- ❖ Parafilm
- ❖ Tijeras
- ❖ Vaso de precipitados.
- ❖ Cronómetro.



Figura 21. Micropipeta Pluripet

### 3.4.2. Incorporación de las enzimas

Para la incorporación de las enzimas llevamos a cabo los siguientes pasos:

1. El electrodo es limpiado con una disolución de buffer fostafo 0,01 M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) durante dos minutos. Para ello introducimos el extremo del electrodo de trabajo en la disolución contenida en un vaso de precipitados.
2. Mediante una micropipeta Pluripet depositamos un gota de 5 microlitos de la disolución de enzima (5 mg/l) sobre la película de polipirrol del electrodo.
3. Se deja secar al aire durante quince minutos. Para ayudar en este proceso de secado, y que la adicción de la enzima se realice correctamente sin derramarse nada por el tubo de vidrio, empleamos un soporte especial de forma que los electrodos se mantienen de forma vertical.



Figura 22. Soporte para el mantenimiento vertical de los electrodos.

4. Se añade una segunda gota de la misma enzima y se vuelve a dejar secar durante quince minutos en el soporte habilitado para ello.
5. Una vez que la adición de la enzima se ha llevado a cabo introducimos los electrodos en una disolución de glutaraldehído durante veinte min. Este sirve para crear enlaces entre las enzimas y aumentar su estabilidad.
6. Dejamos secar los electrodos durante quince minutos.
7. Humedecemos el extremo de los electrodos durante treinta segundos en una disolución de buffer fosfato.
8. Por último, se guardan en una nevera a cuatro grados, para conservar la enzima frente al calor. Para garantizar un buen funcionamiento de la red de biosensores es conveniente que no transcurra mucho tiempo desde la adición de las enzimas y la medida de las muestras.

De este modo, se ha conformado la red de sensores que emplearemos para la medida de los mostos y vinos. Se ha obtenido una red de 8 biosensores:

- InoxidableAuGox
- InoxidableAuTyr
- InoxidablePyGox
- InoxidablePyTyr
- PlatinoAuGox
- PlatinoAuTyr
- PlatinoPyGox
- PlatinoPyTyr

### **3.5. MEDIDA EN VINOS Y MOSTOS**

Por último, se va a llevar a cabo la medida en vinos y mostos para obtener unos resultados concluyentes que son el objeto de estudio de este trabajo.

Cada uno de los biosensores se ensayará en ocho variedades de mostos y vinos diferentes utilizando voltametría cíclica como técnica de análisis. Las ocho variedades de mostos y vinos son: Cabernet (C), Garnacha (G), Juan García (JG), Mencía Regadío (MR), Mencía Secano (MS), Prieto Picudo (PP), Tempranillo (T) y Rufete (R), proporcionadas por las diferentes de bodegas de Castilla y León. Para ello se han fabricado 64 sensores con objeto de estudiar el comportamiento de los mismos en las diferentes variedades de vinos y mostos.

#### **3.5.1. Material de laboratorio empleado**

- ❖ Probeta.
- ❖ Parafilm.
- ❖ Tijeras.
- ❖ Celda electroquímica
- ❖ Potenciostato PARSAT 2273

Para la medida en mostos y vinos la celda electroquímica empleada es similar a la anteriormente empleada para la deposición de las enzimas. La disposición de los electrodos en la misma si difiere de la situación anterior. El electrodo de referencia se situará en la parte central del sistema y el electrodo de trabajo se ubicará en la parte derecha. El contraelectrodo mantiene su posición en la parte izquierda. Tampoco se empleará dos celdas de diferentes tamaños. Únicamente usaremos la celda de mayor tamaño.



*Figura 23. Celda de mayor tamaño.*

### **3.5.2. Toma de datos en vinos y mostos**

Tanto los mostos como los vinos se encuentran refrigerados para garantizar su conservación, por lo que un tiempo antes de la realización de los ensayos debemos sacarlos para que alcancen una temperatura ambiente



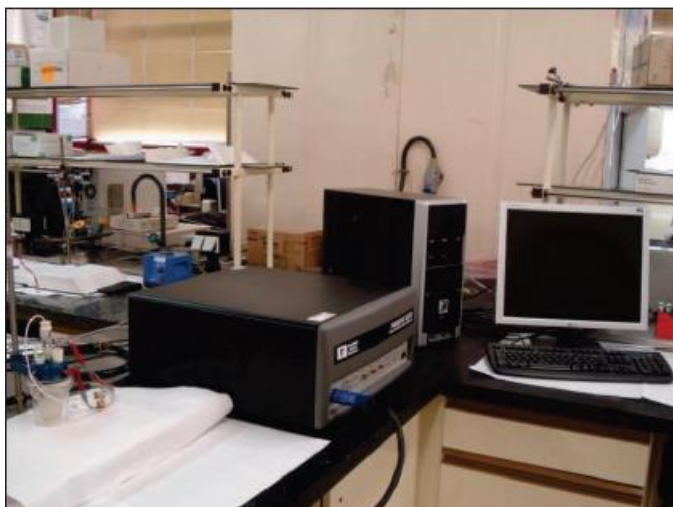
*Figura 24. Muestras de los diferentes vinos y mostos utilizados.*

Para aumentar la capacidad iónica de los mostos y vinos preparamos una disolución de 20 ml formada por 10 ml de la muestra de vino / mosto y 10 ml de KCL 0,3 M. La mezcla la realizamos en una probeta tapada con un parafilm de modo que la mezcla se realice de forma correcta y no derramemos nada. Dicha solución se introducirá en la celda electroquímica de mayor tamaño.

Una vez que tengamos los electrodos dispuestos de forma correcta en el interior de la celda electroquímicos procederemos a colocarla en el soporte adecuado y conectar el potencióstato.



El software empleado es el mismo que en el caso de las deposiciones, POWERSUITE, pero en este caso el ensayo realizado se trata de una voltametría cíclica con 10 ciclos comprendidos entre -1 V y 0.8 V.



*Figura 25. Montaje experimental*

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Capítulo 4**

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

**INDICE**

4.1.	INTRODUCCIÓN .....	71
4.2.	LENGUA ELECTRÓNICA EN MOSTOS.....	71
4.2.1.	Influencia del tipo de sustrato .....	72
4.2.2.	Influencia de las nanopartículas obtenidas por cogeneración. ....	77
4.2.3.	Influencia del tipo de enzima utilizado.....	80
4.2.4.	Influencia del medio de ensayo .....	82
4.3.	LENGUA ELECTRÓNICA EN VINOS.....	91
4.3.1.	Influencia del tipo de sustrato .....	92
4.3.2.	Influencia de las nanopartículas obtenidas por cogeneración .....	95
4.3.3.	Influencia del tipo de enzima utilizado.....	98
4.3.4.	Influencia del medio de ensayo .....	101
4.4.	TRATAMIENTO DE DATOS .....	108
4.4.1.	Introducción .....	108
4.4.2.	Análisis en componentes principales (PCA).....	110
4.4.2.1.	PCA en mostos.....	110
4.4.2.2.	PCA en vinos .....	112
4.4.2.3.	PCA en vinos y mostos .....	113
4.4.3.	Análisis de factores principales (PARAFAC) .....	115
4.4.3.1.	PARAFAC en mostos.....	115
4.4.3.2.	PARAFAC en vinos.....	119
4.4.3.3.	PARAFAC en vinos y mostos. ....	123
4.4.4.	PLS en mostos. ....	127
4.5.	CONCLUSIONES.....	128

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

#### **4.1. INTRODUCCIÓN**

En este capítulo se muestran los resultados experimentales obtenidos para el desarrollo de este trabajo. Como se ha comentado, su objetivo es desarrollar una red de sensores y biosensores que sean capaces de discriminar tanto vinos como mostos con diferentes características, y, por consiguiente, con diferentes composiciones químicas, así como encontrar una relación entre ambos.

En primer lugar, las diferentes variedades de vinos y mostos mostrarán una señal electroquímica diferente en función del contenido en azúcares y polifenoles de cada sustancia. Para ello se reflejará la respuesta de tanto los diferentes vinos y mostos a los diferentes sensores empleados.

Por lo que mediante los diferentes ensayos en y su posterior análisis estadístico se comprobará si esta red de biosensores es capaz de discriminar y de encontrar una relación entre mostos y vinos.

#### **4.2. LENGUA ELECTRÓNICA EN MOSTOS**

A continuación, se muestran algunos ejemplos de los voltamogramas obtenidos en los diferentes sensores que forman parte de nuestra lengua electrónica que demuestran que la respuesta a cada uno de los de los mostos es característica y por tanto constituye una verdadera huella digital. Con este análisis pretendemos demostrar que los sensores poseen selectividad cruzada, de tal modo que con ellos podemos fabricar una verdadera lengua electrónica. Analizamos en cada uno de los correspondientes apartados el efecto del sustrato, del modificador electrocatalítico y del enzima utilizado en la fabricación de los sensores. Finalmente se analiza la diferente respuesta de los sensores ante los diferentes mostos demostrando su capacidad discriminatoria.

#### 4.2.1. Influencia del tipo de sustrato

En la figura se observa un ejemplo de la diferente respuesta voltamétrica de un mismo tipo de sensor en el que se ha utilizado un mismo modificador y un mismo enzima medido en el mismo medio y en el que varía el tipo de sustrato empleado en la fabricación del electrodo.

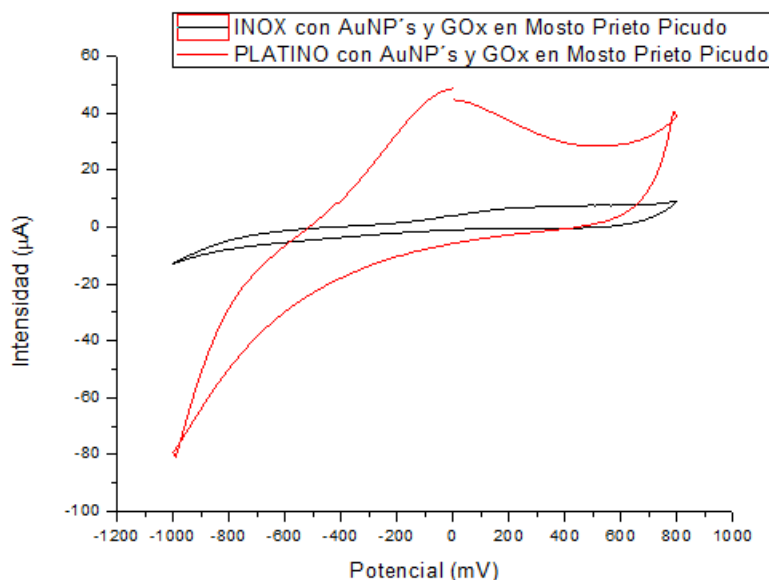


Figura 26. Respuesta voltamétrica de los sensores de platino e inoxidable modificados con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en la variedad de mosto Prieto Picudo.

Los picos que aparecen tanto en uno como en otro sensor se centran en la rama de oxidación, pero aparecen para los dos sustratos a potenciales diferentes, en el caso del platino a potenciales más negativos y además la intensidad de los picos es superior. En la figura se observa un ejemplo para electrodos modificados con nanopartículas de oro utilizados en mosto de la variedad Prieto Picudo.

Estas mismas observaciones pueden hacerse a partir del voltamograma registrado para este mismo sensor en la variedad de Garnacha, aunque en este caso los potenciales de los picos de oxidación son más parecidos y las mayores diferencias son en intensidad.



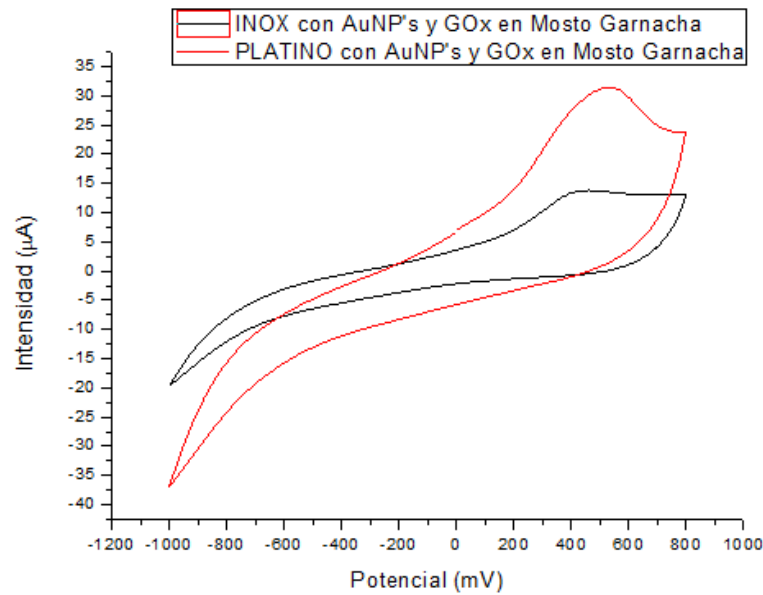


Figura 27. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino modificados con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en la variedad de mosto Garnacha.

A diferencia de lo que se observaba en el caso de los vinos la respuesta a algunas otras variedades se observa que los sensores de inoxidable tienen intensidades de corriente muy similares o incluso superiores a las observadas en el caso de los sensores de platino. La figura corresponde a los sensores frente a la variedad de Mencía Regadío. La respuesta en cuanto a potenciales sigue siendo diferente.

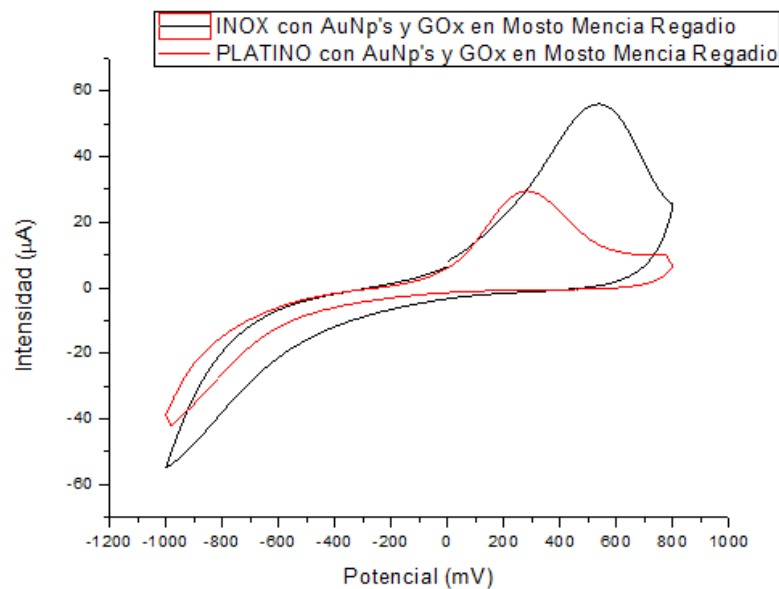


Figura 28. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino modificados con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en la variedad de mosto Mencía Regadío.

Este mismo comportamiento se observa también en los sensores con tirosinasa, aunque en este caso las diferencias tanto de intensidad como de potencial son menos significativas. La figura corresponde a los voltamogramas registradas es el mismo caso que el detectado en otro tipo de vino, la figura adjunta corresponde a la denominación Mencía Secano.

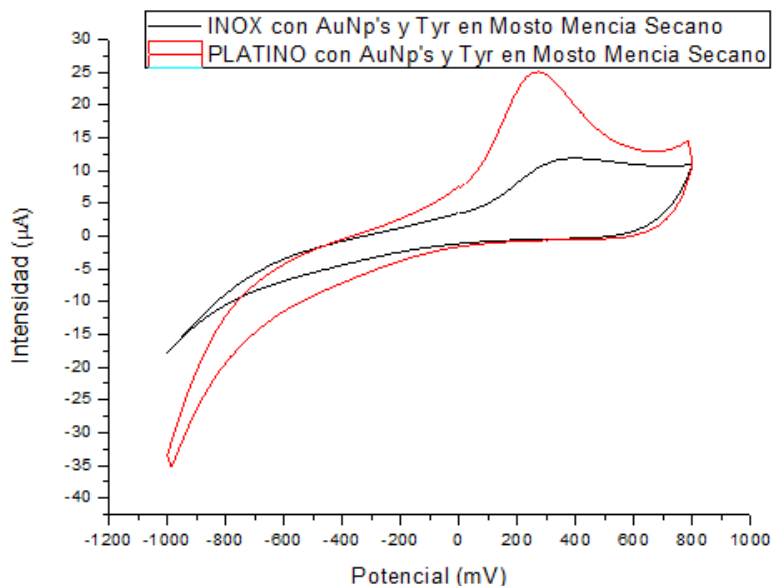


Figura 29. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino modificados con nanopartículas de oro y tirosinasa en la variedad de mosto Mencía Regadío.

Para otras variedades se observa que las intensidades son muy similares o incluso también ligeramente superiores para los sensores fabricados sobre sustrato de inoxidable. La figura 30 corresponde a la respuesta de ambos sensores ante el mosto de la variedad Rufete.

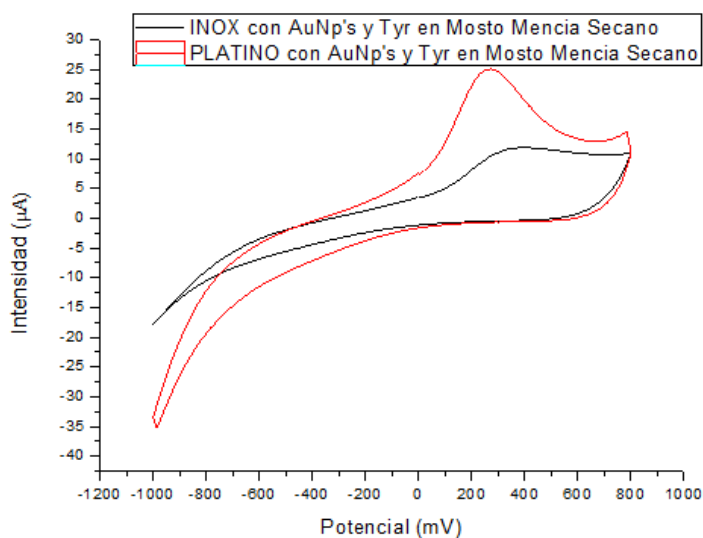


Figura 30. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino modificados con nanopartículas de oro y tirosinasa en la variedad de mosto Rufete.

En el caso de sensores sin nanopartículas de oro se observa un efecto similar al comentado anteriormente. Los potenciales a los que aparecen los picos de oxidación son claramente diferentes en función del sustrato, pero las intensidades son mayores o menores para cada sustrato en función de la variedad analizada. Por ejemplo, la figura corresponde a sensores con GOX ensayados en Mencía Secano donde se observa que las intensidades más altas corresponden a los sensores realizados con platino.

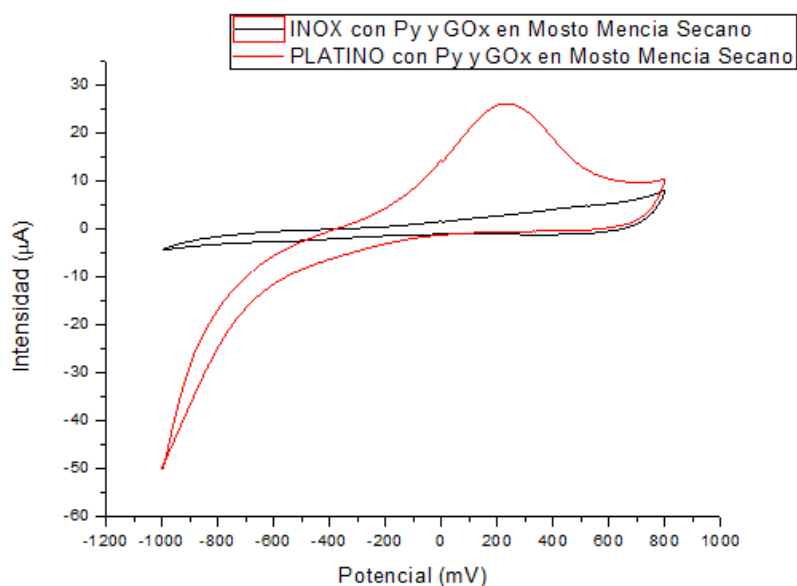


Figura 31. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino con polipirrol sin nanopartículas de oro y modificados con glucosa oxidasa en el mosto Mencía Secano.

Mientras que en la figura 32 se observan los voltamogramas registrados con el mismo tipo de sensores para la variedad Rufete en los que las intensidades más altas se registran para los sensores de pirrol sobre acero inoxidable.

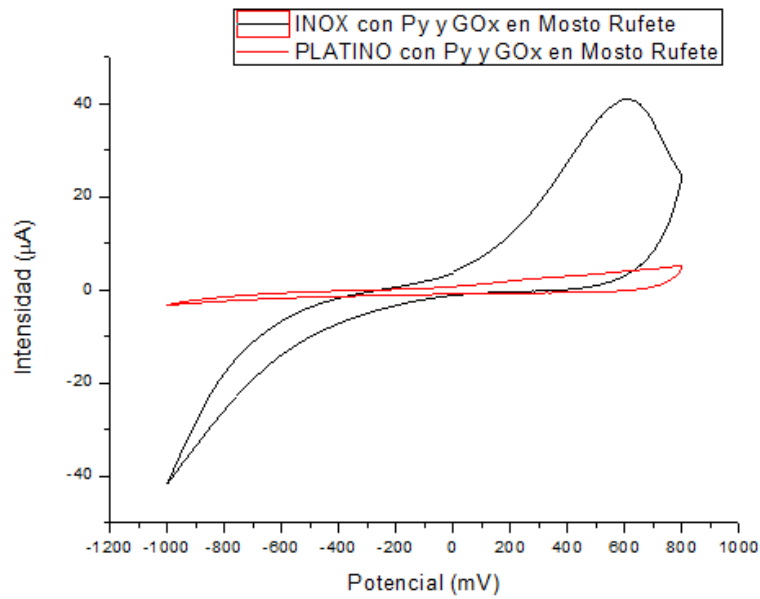


Figura 32. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino con polipirrol sin nanopartículas de oro modificados con glucosa oxidasa en la variedad de mosto Rufete.

En el caso de sensores con Tyrosinasa el efecto del sustrato es idéntico al comentado usualmente las intensidades registradas en sensores de platino son más elevadas, aunque en algunos casos las diferencias son mínimas. La figura correspondiente a sensores utilizados en la variedad Rufete. Los sensores sobre platino tienen los picos mejor definidos y están ligeramente desplazados a potenciales menores lo que indica mejor actividad electrocatalíticas.

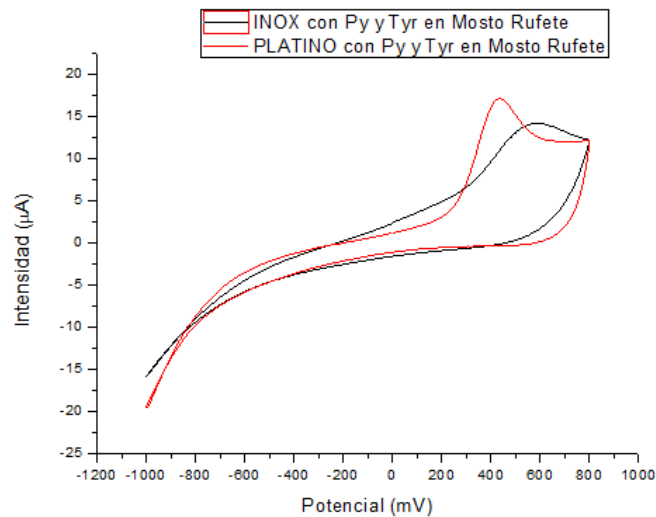


Figura 33. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino con polipirrol sin nanopartículas de oro modificados con tirosinasa en la variedad de mosto Rufete.

#### 4.2.2. Influencia de las nanopartículas de oro obtenidas por cogeneración.

En este apartado analizamos el diferente comportamiento electroquímico de los sensores con y sin nanopartículas de oro ante las diferentes variedades de mostos analizadas. Para ello analizaremos su efecto en los dos sustratos, esto es, platino y acero inoxidable.

La figura corresponde a los voltamogramas obtenidos sobre sustrato de acero inoxidable en los que se ha utilizado como enzima tirosinasa para la detección de mosto de la variedad Tempranillo.

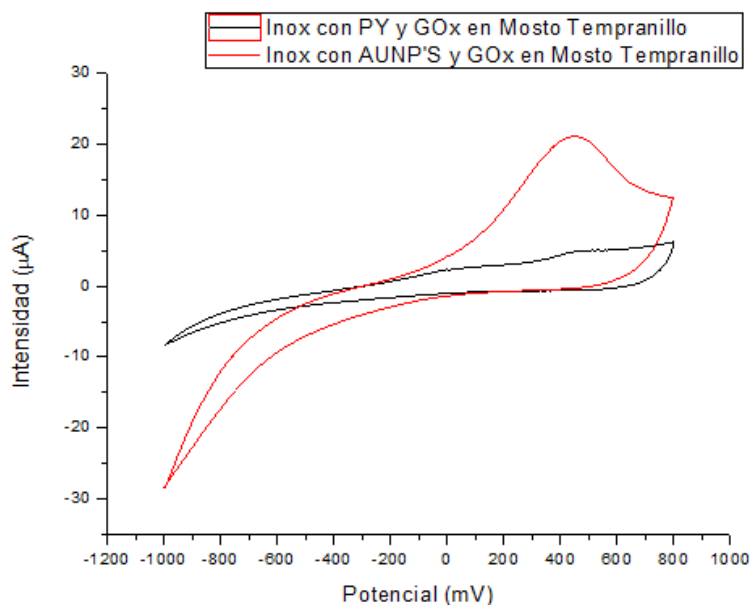


Figura 34. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable modificados con glucosa oxidasa con y sin nanopartículas de oro en la variedad de mosto Tempranillo.

Observamos que en el caso del sustrato de acero inoxidable el uso de nanopartículas de oro tiene un efecto altamente beneficioso. No sólo hay un aumento claro de intensidad, sino que también se observa una mejora en la definición de los picos y un claro desplazamiento de los mismos hacia potenciales positivos, como también se había observado en el caso del análisis de vinos. Todo ello demuestra claramente el efecto electrocatalítico de las nanopartículas de oro.

Este efecto ocurre también cuando se utiliza glucosa oxidasa como enzima. La figura adjunta corresponde a los voltamogramas registrados con y sin nanopartículas para la misma variedad de mosto tipo Tempranillo.

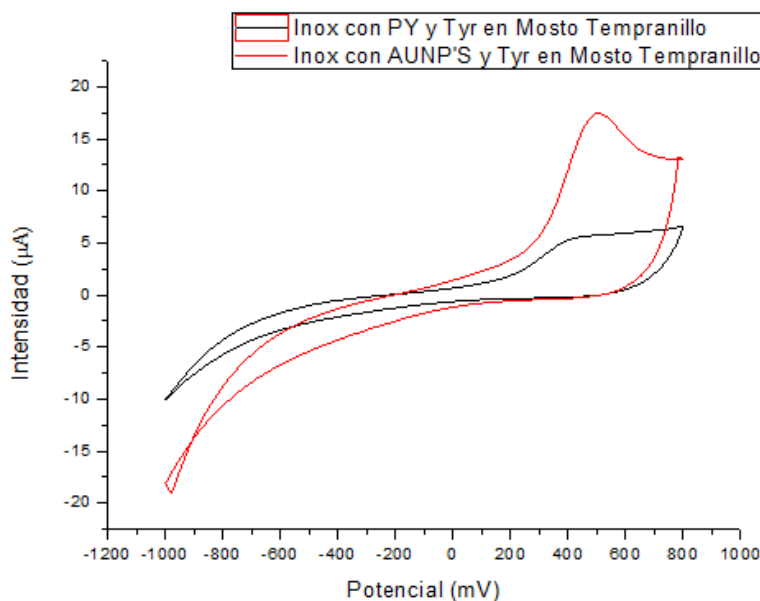


Figura 35. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable modificados con tirosinasa con y sin nanopartículas de oro en la variedad de mosto Tempranillo.

Como en los casos anteriores la presencia de nanopartículas de oro en la capa de pirrol depositada sobre acero inoxidable hace que el pico de oxidación se desplace a valores menos negativos y por tanto sea visible en el rango de escala. También se aprecia el comentado aumento de intensidad a la vez que mejora la reversibilidad. Se observa que también la reducción es claramente más intensa con nanopartículas de oro.

En el caso de los sensores de platino, también se observa que la presencia de nanopartículas de oro mejora sustancialmente el comportamiento del sensor, aunque el efecto no es tan notable como en el caso de sustratos de acero inoxidable. La figura corresponde a un sensor de platino modificado con glucosa oxidasa con y sin nanopartículas de oro utilizados en la variedad Prieto Picudo.

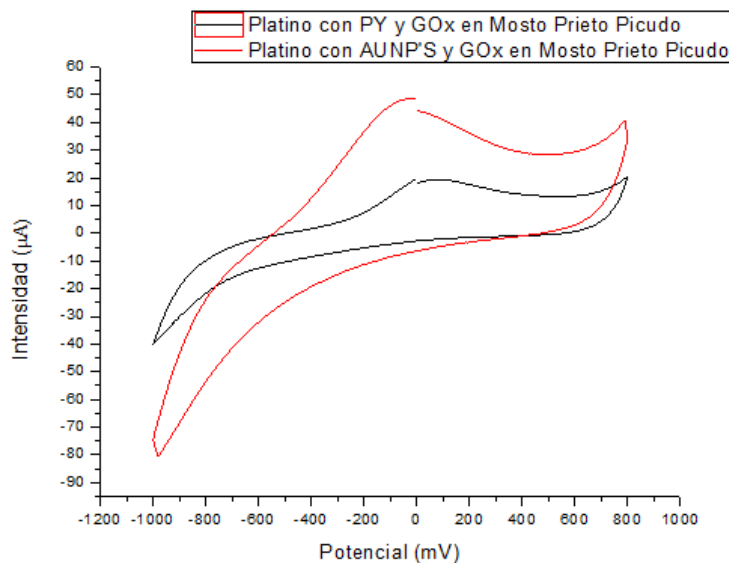


Figura 37. Respuesta voltamétrica de los sensores de platino modificados con glucosa oxidasa con y sin nanopartículas de oro en la variedad de mosto Prieto Picudo.

Como en el caso de sustrato de inoxidable se observa también un importante aumento de intensidad y desplazamiento en la posición de los picos con nanopartículas de oro hacia potenciales menores confirmando el efecto electrocatalítico de las nanopartículas.

El mismo efecto puede observarse en sensores con tirosinasa sobre la variedad de Mencía Secano. Con las nanopartículas de oro hay un importante incremento de intensidad en los picos de oxidación y reducción. También se observa mejor definición de los picos.

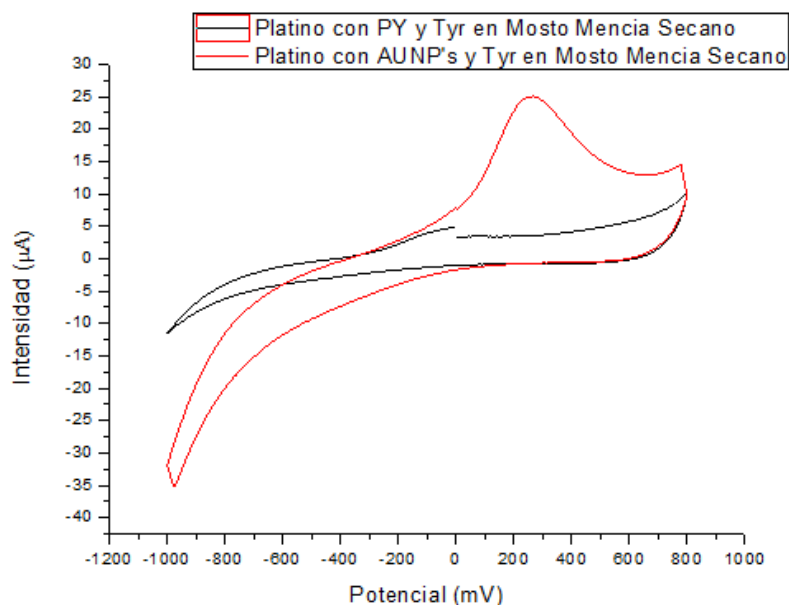


Figura 38. Respuesta voltamétrica de los sensores de platino modificados con tirosinasa con y sin nanopartículas de oro en la variedad de mosto Mencía Regadío.

### 4.2.3. Influencia del tipo de enzima utilizado

Como también se ha observado en el análisis de vinos, en general, la morfología del voltamograma en el caso de mostos, se observa claramente diferente en función del tipo de enzima utilizado. Cuando se utiliza como enzima tirosinasa que como ya se ha comentado es específica para fenoles se observan picos de oxidación desplazados hacia potenciales claramente más positivos

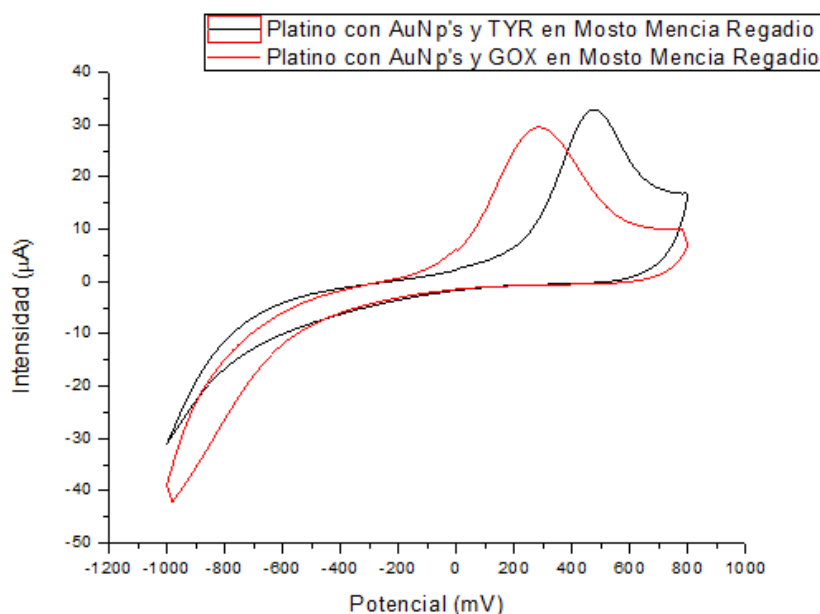


Figura 39. Respuesta voltamétrica de los sensores de platino con nanopartículas de oro modificados con tirosinasa y glucosa oxidasa en la variedad de mosto Mencía Regadío.

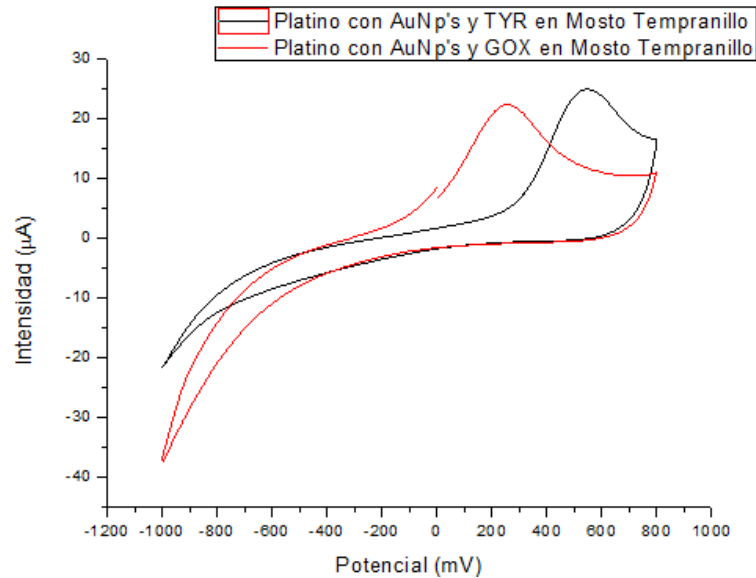
La figura 39 corresponde a un sustrato de platino con pirrol modificado con nanopartículas de oro con los dos tipos de enzima utilizados sobre la variedad Mencía Regadío.

Los picos de oxidación correspondientes a fenoles a los que son sensibles los sensores con tirosinasa suelen aparecer a potenciales superiores a 0.6 y tal y como vemos en la figura estos aparecen mejor definidos cuando se utiliza tirosinasa.

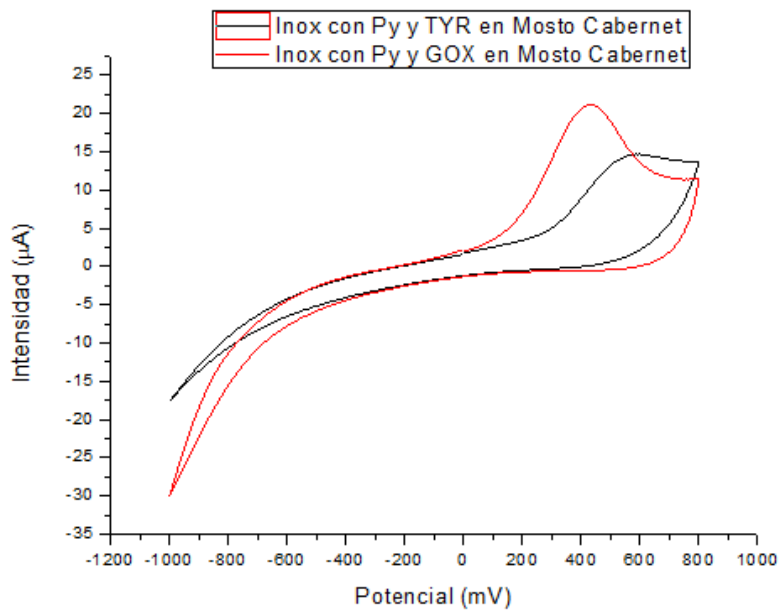
En el caso de la glucosa oxidasa para esta variedad se observan también picos de oxidación definidos, pero a potenciales menos positivos con tirosinasa. Para esta variedad las intensidades son ligeramente superiores cuando se utiliza GOX como enzima. En cualquier caso, la respuesta del sensor es distinta en función del tipo de enzima depositado sobre el mismo.

En el caso del mismo tipo de sensor, pero sin nanopartículas de oro se observa el mismo efecto, pero solo que las intensidades son ligeramente más bajas.





En la figura 41 se observa un efecto parecido cuando se utiliza como sustrato el acero inoxidable. La figura corresponde a un sensor de polipirrol con glucosa oxidasa y con tirosinasa ensayados en la variedad Cabernet.



Observamos que en este caso el sensor con tirosinasa permite observar claramente un pico de oxidación a potenciales positivos que corresponde a los fenoles. Como en el caso de los electrodos con platino también en este caso se puede apreciar intensidades más altas con el enzima de glucosa oxidasa.

Cuando el electrodo de inoxidable se modifica con nanopartículas se sigue observando el desplazamiento del pico de oxidación a potenciales más negativos con el uso de enzima GOx, pero las diferencias son si cabe mucho más significativas y las intensidades son claramente superiores. En la figura 42 se observa el comportamiento frente a la variedad de Mencía Secano.

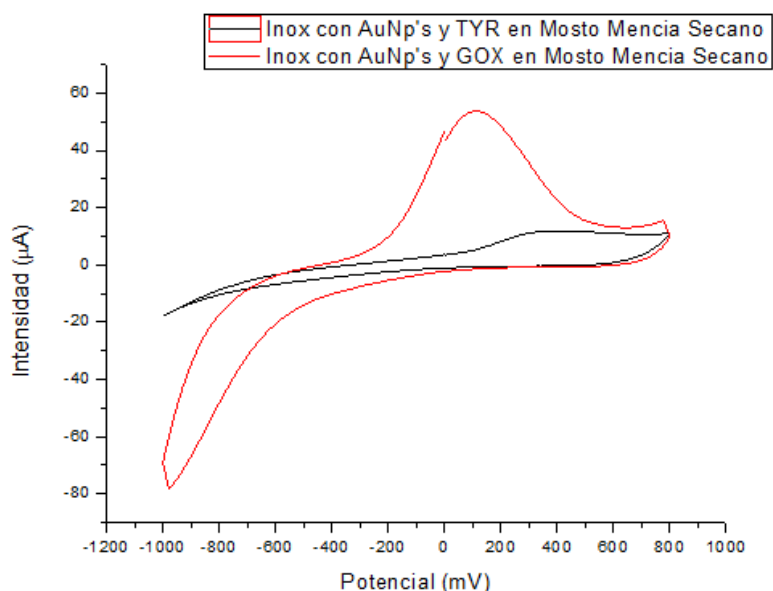


Figura 42. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable con nanopartículas de oro y modificados con tirosinasa y glucosa oxidasa en la variedad de mosto Mencía Secano.

#### 4.2.4. Influencia del medio de ensayo

A continuación, hemos seleccionado la respuesta de alguno de nuestros sensores ante las diferentes variedades de mostos con objeto de observar las diferencias y semejanzas encontradas.

La figura 43 corresponde a la respuesta del biosensor de polipirrol modificado con nanopartículas de oro sobre sustrato de acero inoxidable con glucosa oxidasa como enzima.

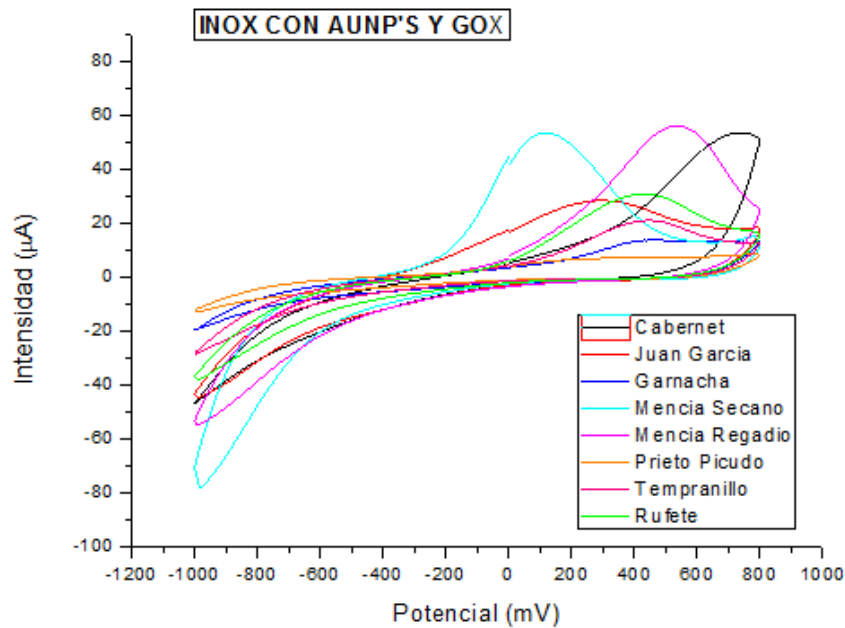


Figura 43. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las diferentes variedades de mostos.

Vemos como a pesar de que en todas las variedades la respuesta en el barrido de reducción es similar vemos que, en lo referente a la oxidación, podemos apreciar, en cuanto a la posición de los picos y la intensidad, diferencias y similitudes entre las diferentes variedades que son más fáciles de discernir cuando se analizan por separado.

La figura 44 corresponde a tres variedades distintas de mosto: Rufete, Tempranillo y Prieto Picudo que dan voltamogramas parecidos especialmente en la zona de oxidación, con picos a potenciales muy positivos y de baja intensidad.

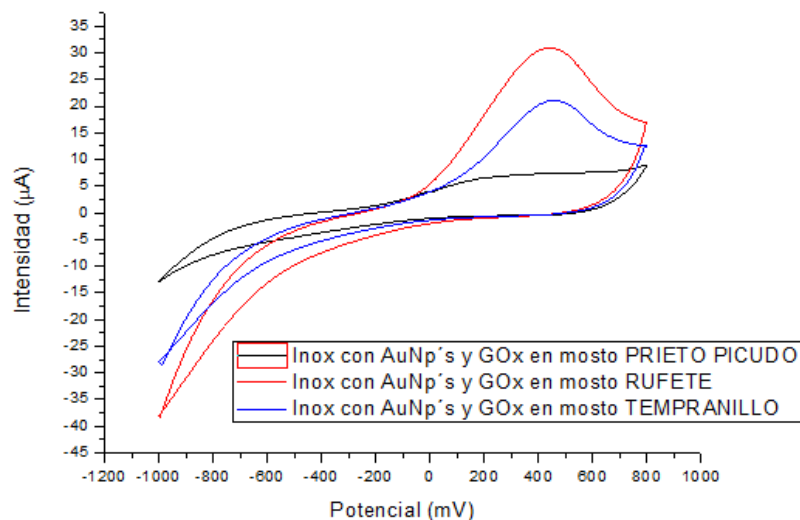


Figura 44. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las variedades de mosto Prieto Picudo, Rufete, y Tempranillo.

Vemos que la respuesta es similar en el caso de mostos de otras variedades como Garnacha, y Mencía Regadío con picos de oxidación muy desplazados a potenciales positivos, aunque con intensidades claramente superiores a las observadas en las variedades anteriores. Sin embargo, podemos observar que en el caso de la variedad de Mencía Secano los picos de oxidación aparecen desplazados a potenciales menos negativos.

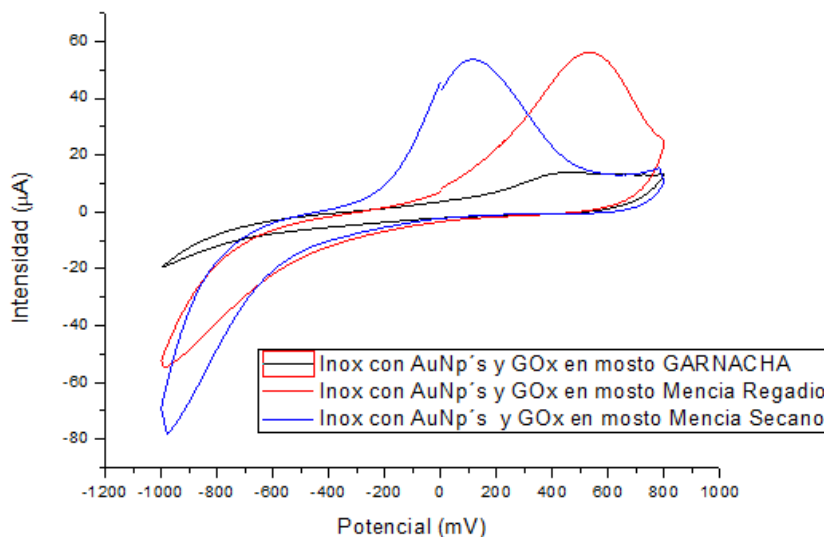


Figura 45. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las variedades de mosto Garnacha, Mencía Regadío y Mencía Secano

La respuesta del mismo tipo de biosensor con oro y con glucosa oxidasa como enzima, pero sobre sustrato de platino es claramente diferente a la comentada anteriormente tal y como se aprecia en la figura 46.

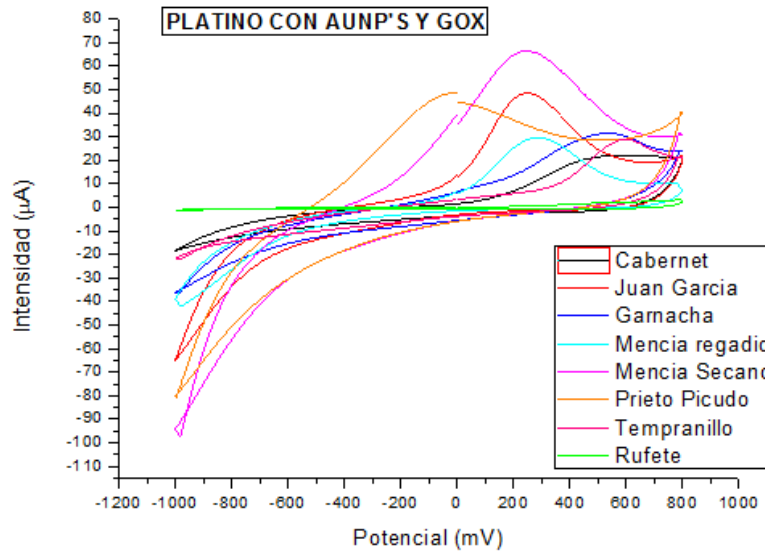


Figura 46. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las diferentes variedades de mosto.

También observamos que cada variedad presenta una respuesta característica y en este caso los picos están mejor definidos, son más intensos y es posible establecer diferencias más claras entre los diferentes tipos de mostos.

Como en el sensor anterior también hay variedades que presentan picos de oxidación menos intensos y desplazados a potenciales más negativos, es el caso de variedades como Cabernet, Rufete y Tempranillo. En la figura 47 también podemos observar que la respuesta en el barrido de oxidación aumenta de intensidad y se desplaza a potenciales más negativos en algunas variedades como Mencia Secano.

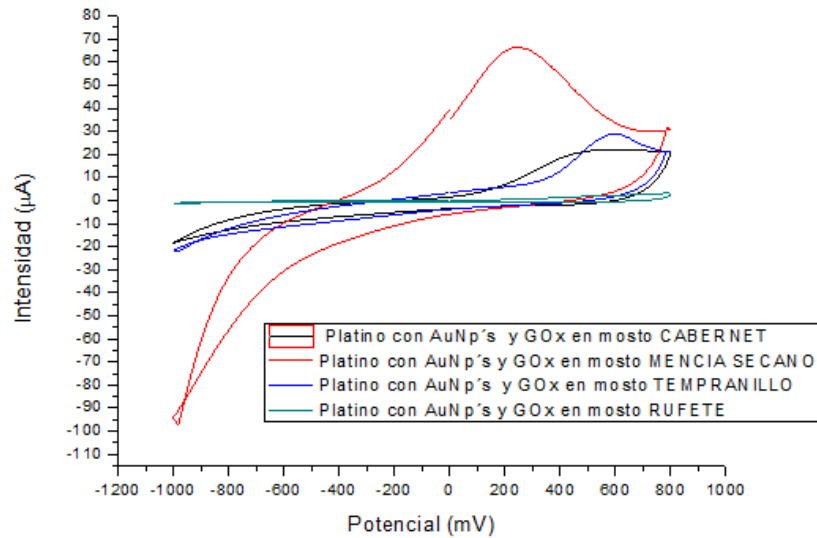


Figura 47. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las variedades de mosto Cabernet, Mencía Secano, Tempranillo y Rufete.

Este desplazamiento es todavía más evidente para la variedad de Mencía Regadío tal y como se observa en la figura. También se aprecia una importante diferencia de intensidad en el pico de oxidación. Finalmente, la variedad de Prieto Picudo es la que presenta el pico de oxidación más desplazado a valores incluso negativos.

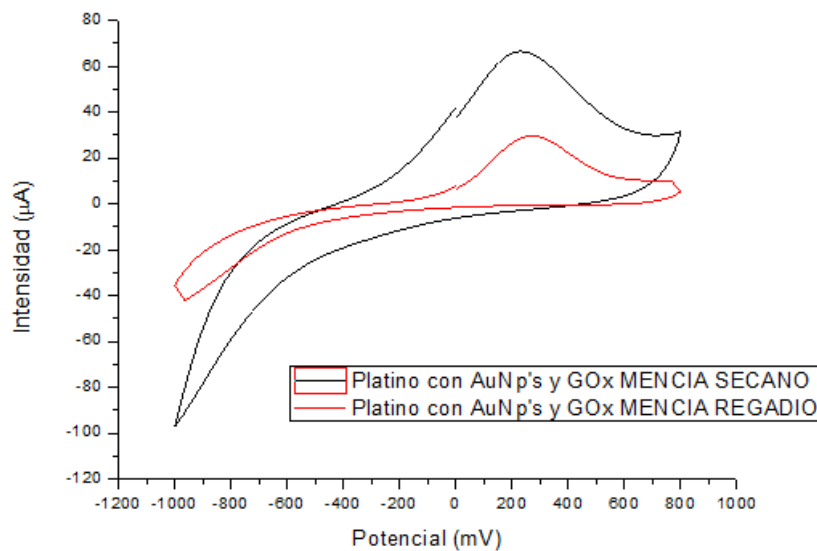


Figura 48. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las variedades de mosto Mencía Secano y Mencía Regadío.

En el caso de sensores fabricados con enzima tipo tirosina también se observan respuestas diferentes en función del tipo de sensor para cada una de las ocho variedades de mostos en estudio. La figura 49 muestra como ejemplo la respuesta del sensor de polipirrol sobre sustrato de acero inoxidable con esta enzima.

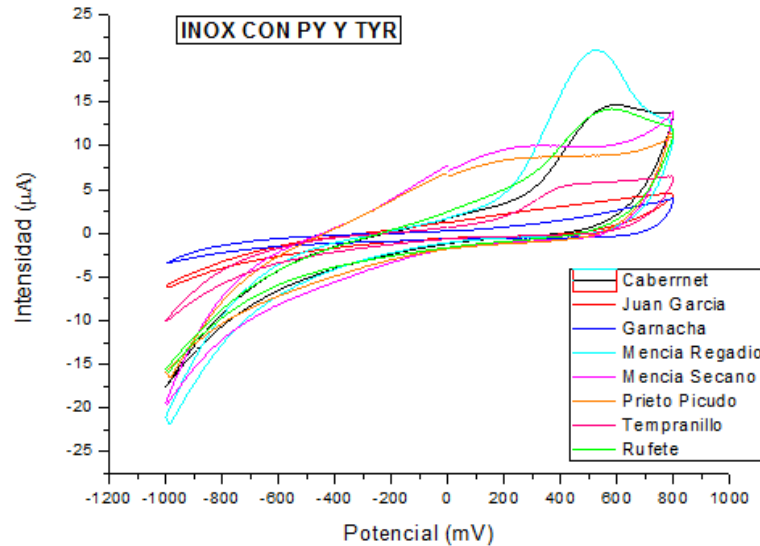


Figura 49. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino con polipirrol y tirosinasa en las diferentes variedades de mosto.

Vemos como en este caso la respuesta es claramente diferente de la observada con enzima de glucosa oxidasa, los picos de oxidación se concentran en la zona de potenciales negativos para todas las variedades.

A pesar de que la morfología es similar podemos observar diferencias en las respuestas voltamétricas del sensor ante los diferentes mostos, especialmente en lo relativo a la intensidad de corriente. En la figura 50 podemos apreciar como la intensidad de corriente es claramente diferente para tres variedades: Cabernet, Juan García y Mencia Regadio.

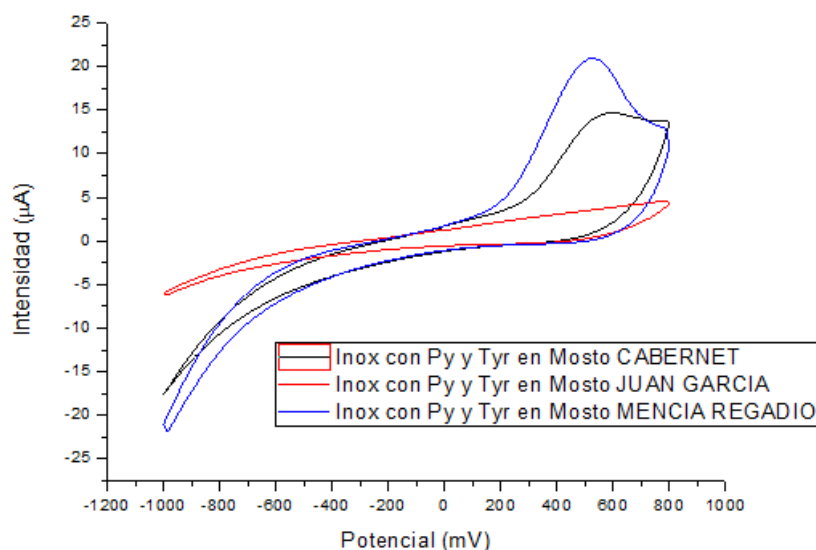


Figura 50. Respuesta voltamétrica del sensor de inoxidable con polipirrol y tirosinasa en las variedades de mosto Cabernet, Juan García y Mencía Regadío.

También podemos apreciar como las variedades de Cabernet y Rufete dan respuesta muy similar lo que podría ser indicativo de su similitud en el contenido de polifenoles.

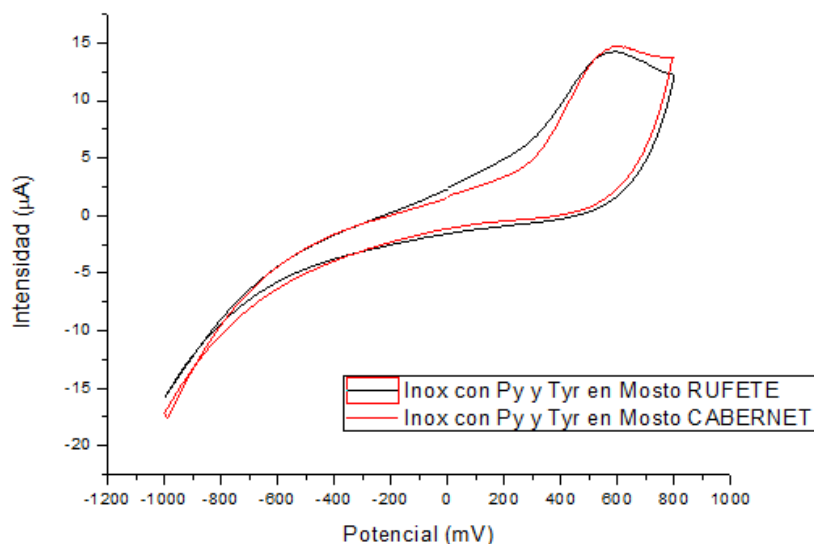


Figura 51. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable con polipirrol y tirosinasa en las variedades de mosto Rufete y Cabernet.

Finalmente podemos observar como las variedades de Mencía Secano y Prieto Picudo dan una respuesta similar entre sí y totalmente diferente del resto con picos más anchos, peor definidos y desplazados a potenciales menos negativos en comparación con otras variedades, ello podría ser indicativo de un menor índice de polifenoles.



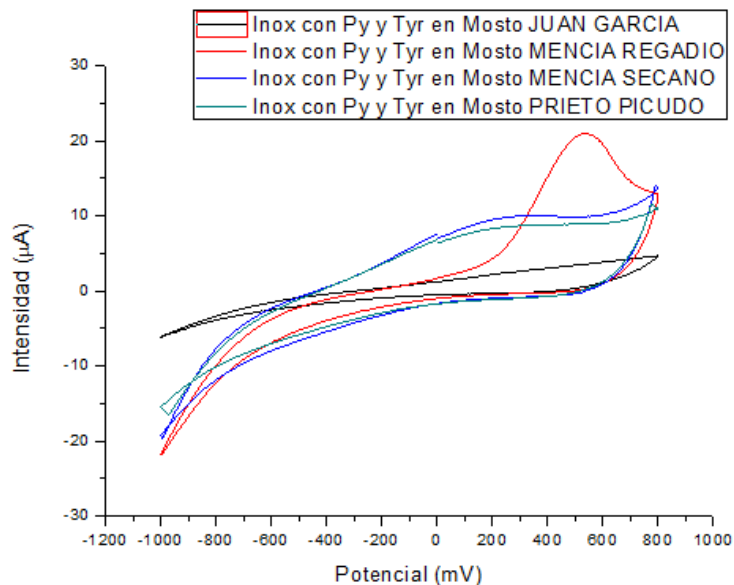


Figura 52. Respuesta voltamétrica del sensor de inoxidable con polipirrol y tirosinasa en las variedades de mosto Juan García, Mencía Regadío, Mencía Secano y Prieto Picudo.

El análisis de la respuesta de otros biosensores de tirosinasa con otro sustrato indica resultados muy parecidos a los expuestos. A modo de ejemplo en la figura podemos observar la respuesta de biosensor de platino frente a las variedades de Cabernet, Juan García y Garnacha, que veíamos anteriormente agrupados. También en este caso el pico de oxidación se encuentra en un rango de potenciales similar y la intensidad del pico crece a lo largo de la secuencia Juan García, Garnacha y Cabernet tal y como se observaba con sustrato de acero inoxidable.

También resulta destacable la respuesta claramente diferente del sensor ante la variedad de mosto de Prieto Picudo como también se observaba en el caso del sensor de inoxidable.

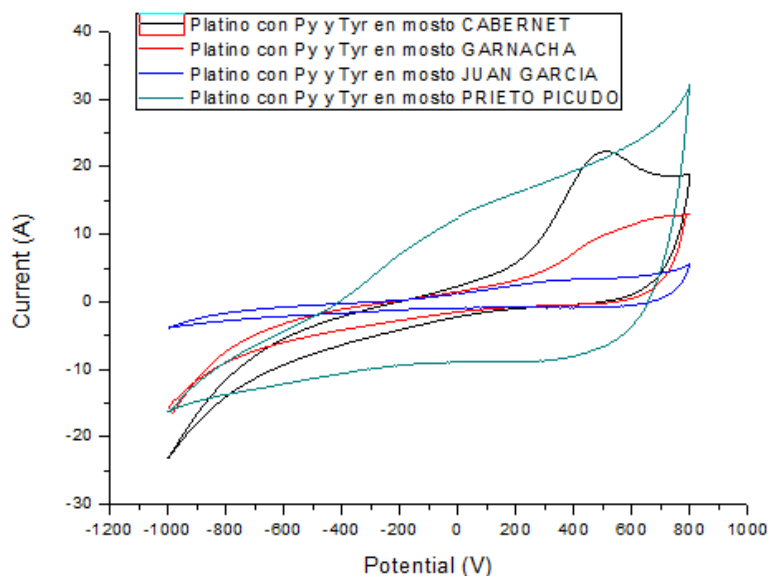


Figura 53. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino con polipirrol y tirosinasa en las variedades de mosto Cabernet, Garnacha, Juan García y Prieto Picudo.

Con respecto a los biosensores de tirosinasa con nanopartículas de oro se observa un comportamiento similar de las diferentes variedades si bien es destacable un ligero incremento de la intensidad de corriente y un ligero desplazamiento de los picos a potenciales menores tal y como podemos apreciar en la figura 54 correspondiente a un sensor de platino modificado con nanopartículas de oro ensayado en Juan García, Cabernet y Mencía Regadío.

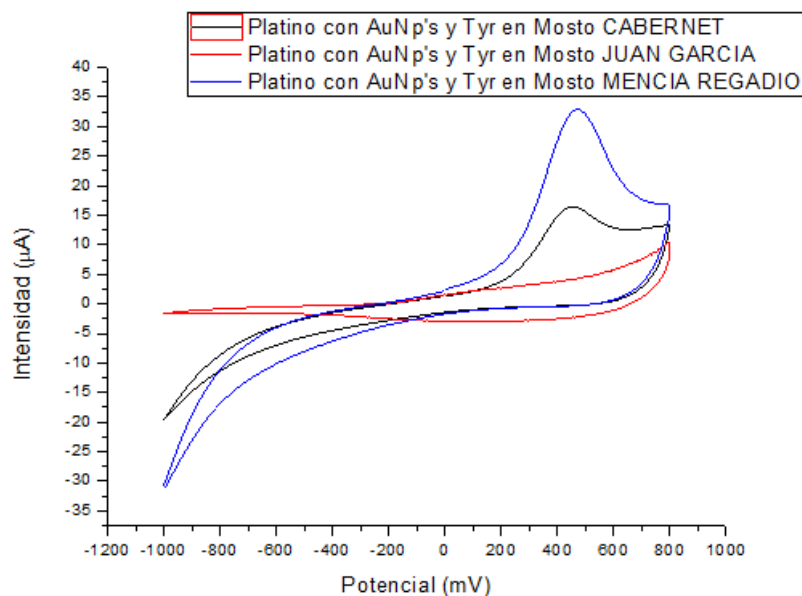


Figura 54. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino modificado con nanopartículas de oro y tirosinasa en las variedades de mosto Cabernet, Juan García y Mencía Secano.

Igualmente, las variedades de Mencía Secano y Prieto Picudo son las que presentan voltamogramas más diferentes que el resto como ya se constató con los sensores descritos anteriormente.

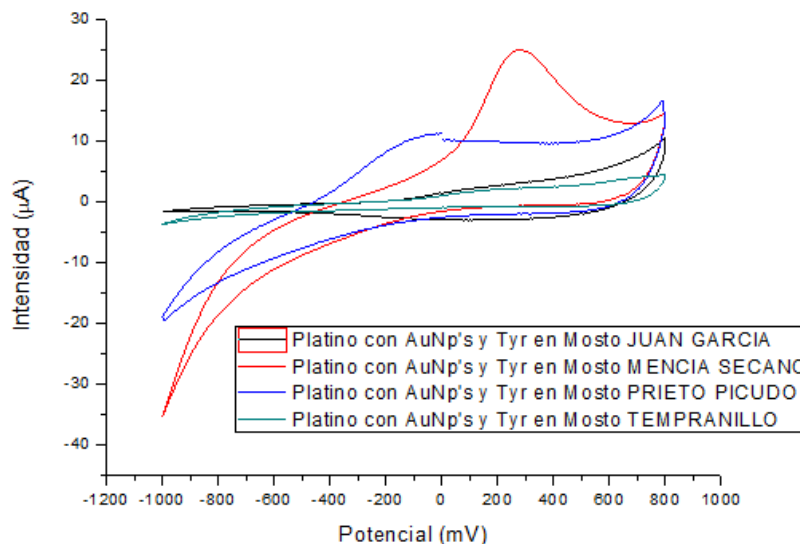


Figura 55. Respuesta voltamétrica del sensor de platino modificado con nanopartículas de oro y tirosinasa en las variedades de mosto Juan García, Mencía Secano, Prieto Picudo y Tempranillo.

### 4.3. LENGUA ELECTRÓNICA EN VINOS

A continuación, realizaremos un estudio similar al llevado a cabo en el caso de los mostos. Se muestran algunos ejemplos de los voltamogramas obtenidos en los diferentes sensores que forman parte de nuestra lengua electrónica que demuestran que la respuesta a cada uno de los vinos es característica de cada uno de ellos y constituye una verdadera huella digital con lo que trataremos de demostrar que los sensores poseen selectividad cruzada, de tal modo que con ellos podemos fabricar una verdadera lengua electrónica. Analizamos en cada uno de los correspondientes apartados el efecto del sustrato, del modificador electrocatalítico y del enzima utilizado en la fabricación de los sensores. Finalmente se analiza la diferente respuesta de los sensores ante los diferentes vinos demostrando su capacidad discriminadora.

#### 4.3.1. Influencia del tipo de sustrato

En la figura 56 se observa un ejemplo de la diferente respuesta voltamétrica de un mismo tipo de sensor en el que se ha utilizado un mismo modificador y una misma enzima mediada en el mismo medio y en el que varía el tipo de sustrato empleado en la fabricación del electrodo.

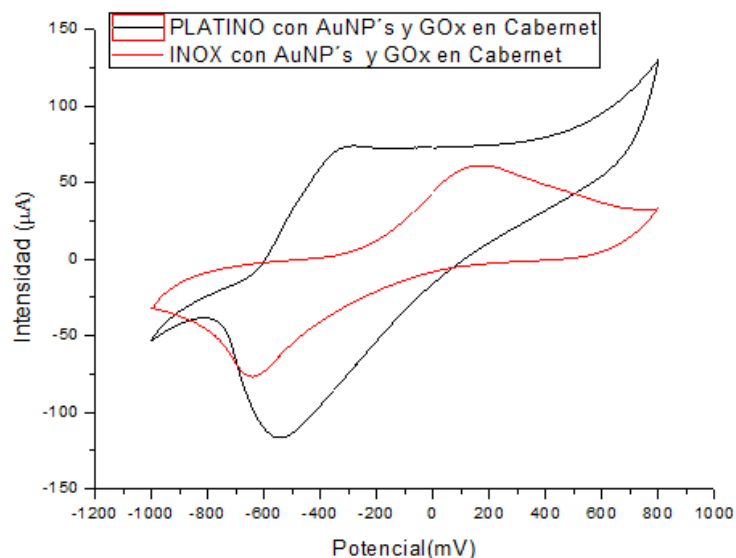


Figura 56. Respuesta voltamétrica de los sensores de platino e inoxidable modificados con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en el vino Cabernet.

Los picos aparecen a potenciales diferentes en función del tipo de sustrato, en el caso del platino la intensidad de los picos aumenta y mejora claramente la reversibilidad. En la figura se observa un ejemplo para los electrodos modificados en vino Cabernet. Estas mismas observaciones pueden hacerse a partir del voltamograma registrado para este mismo sensor en vino Tempranillo.

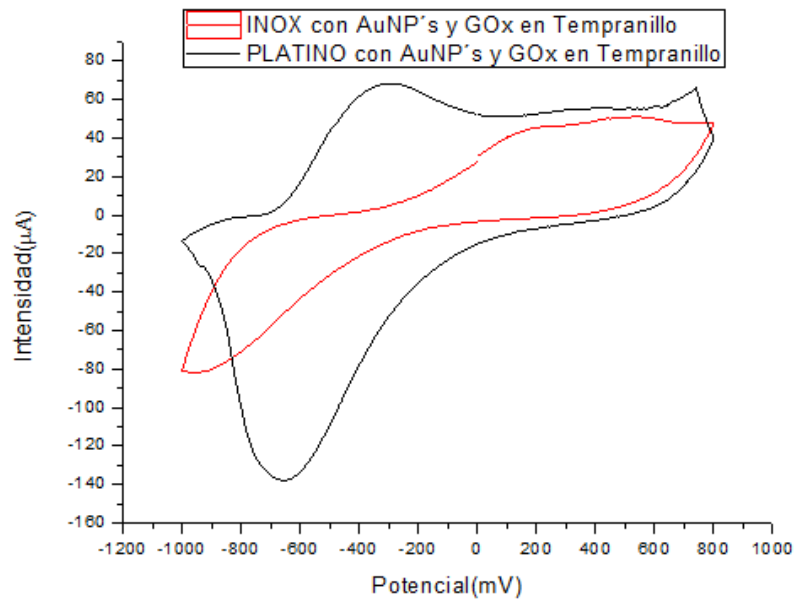


Figura 57. Respuesta voltamétrica de los sensores inoxidable y platino modificados con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en vino Tempranillo.

En otros casos se observa incluso que para el sustrato de inoxidable el rango de trabajo no permite ver el pico de reducción como en el caso de la detección del vino Mencía Secano mientras que con el electrodo de platino se observa claramente además del incremento de la intensidad y la mejora de la reversibilidad.

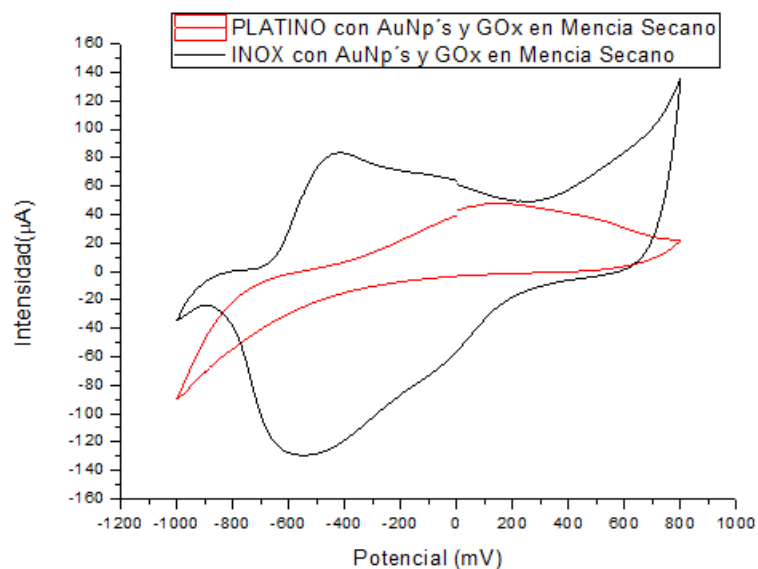


Figura 58. Respuesta voltamétrica de los sensores inoxidable y platino modificados con nanopartículas de oro con glucosa oxidasa en vino Mencía Secano.

Este es el mismo caso que el detectado en otro tipo de vino, la figura adjunta corresponde a la denominación Prieto Picudo.

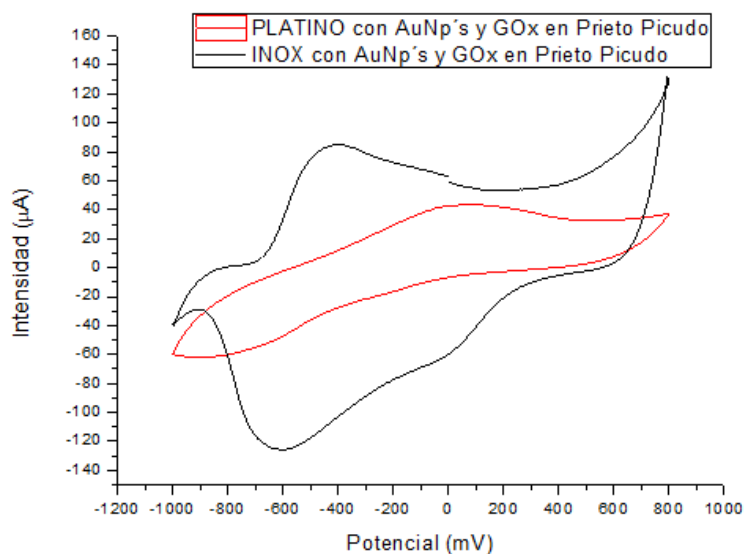


Figura 59. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable y platino modificados con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en el vino Prieto Picudo.

En el caso de sensores sin nanopartículas de oro se observa un efecto similar. La figura corresponde a sensores con GOX ensayados en Mencía Secano.

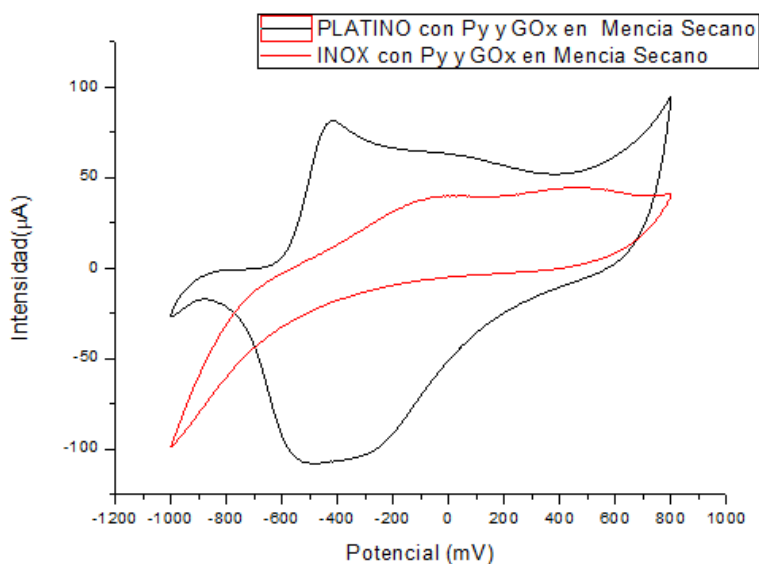


Figura 60. Respuesta voltamétrica de los sensores platino e inoxidable modificados con polipirrol y glucosa oxidasa en el vino Mencía Secano.

Podemos observar también como las intensidades son claramente inferiores en el caso de sustrato de inoxidable a la vez que los picos están mucho peor definidos. Para este vino igualmente el sustrato de inoxidable tan sólo muestra pico de oxidación.

En el caso de sensores con tirosinasa el efecto del sustrato es idéntico al comentado tal y como podemos observar en la figura correspondiente a sensores utilizados en la variedad Mencía Regadío.

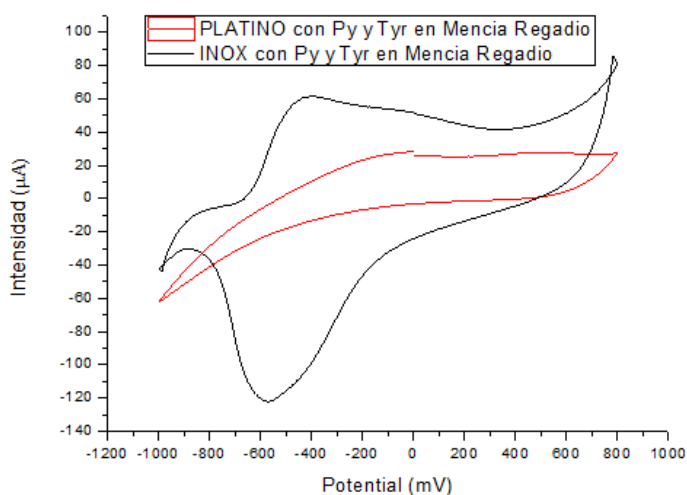


Figura 61. Respuesta voltamétrica de los sensores platino e inoxidable modificados con polipirrol y tirosinasa en vino Mencía Regadío.

#### 4.3.2. Influencia de las nanopartículas de oro obtenidas por cogeneración

En este apartado analizamos el diferente comportamiento electroquímico de los sensores con y sin nanopartículas de oro. Veremos su efecto en los dos sustratos.

La figura 62 corresponde a los voltamogramas obtenidos sobre sustrato de acero inoxidable en los que se ha utilizado como enzima tirosinasa para la detección de vino Mencía Regadío.

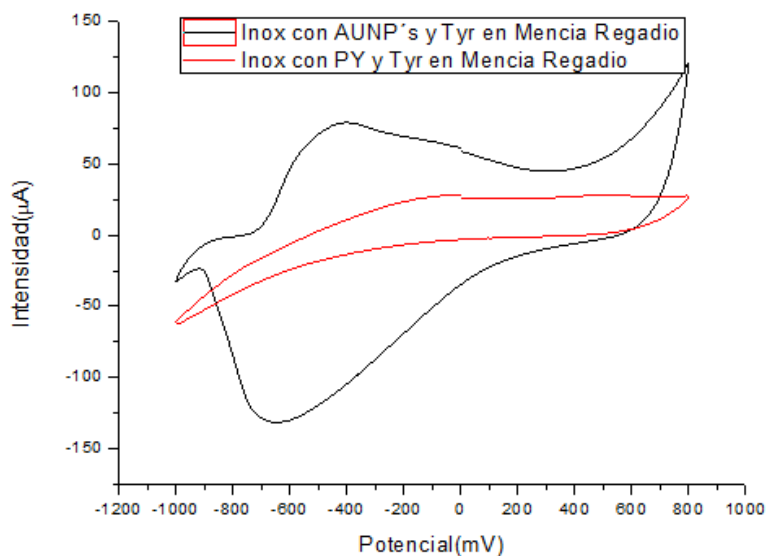


Figura 62. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable con tirosinasa con y sin nanopartículas de oro en el vino Mencía Regadio.

Observamos que el caso del sustrato de acero inoxidable el uso de las nanopartículas de oro tiene un efecto altamente beneficioso. No sólo hay un aumento claro de intensidad, sino que también se observa una mejora en la definición de los picos y un claro desplazamiento de los mismos hacia potenciales positivos. Todo ello demuestra claramente el efecto electrocatalítico de las nanopartículas de oro.

Este efecto ocurre también cuando se utiliza glucosa oxidasa como enzima. La figura adjunta corresponde a los voltamogramas registrados con y sin nanopartículas en la variedad Rufete.

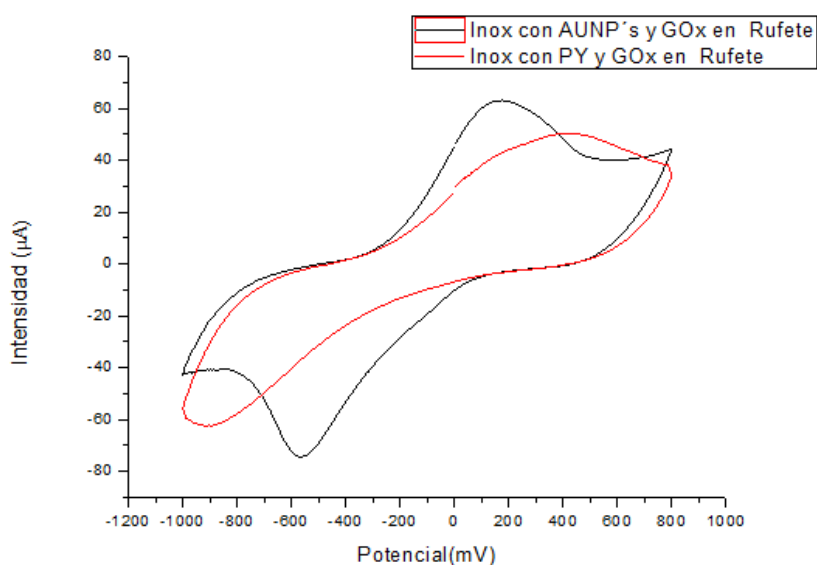


Figura 63. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable con glucosa oxidada con y sin nanopartículas de oro en el vino Rufete.



Como en el caso anterior la presencia de nanopartículas en la capa de pirrol depositada sobre acero inoxidable hace que el pico de reducción se desplace a valores menos negativos y por tanto sea visible en el rango de escala. También se aprecia el comentado aumento de la intensidad a la vez que mejora la reversibilidad.

En el caso de los sensores de platino, también se observa que en general la presencia de nanopartículas mejora el comportamiento del sensor, aunque el efecto no es tan notable como en el caso de sustratos de acero inoxidable. La figura corresponde a un sensor de platino modificado con glucosa oxidasa con y sin nanopartículas de oro utilizadas en la variedad Cabernet.

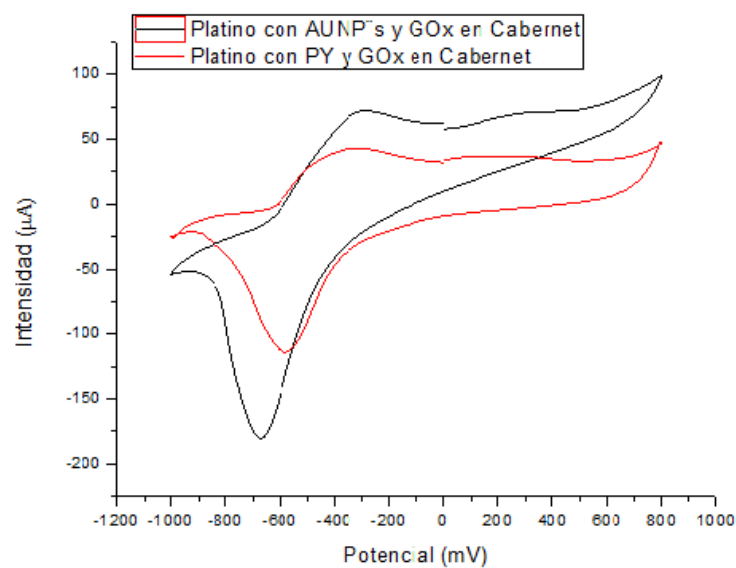


Figura 64. Respuesta voltamétrica de los sensores de platino modificados con glucosa oxidasa con y sin nanopartículas de oro en vino Cabernet

Como en el caso de sustrato de inoxidable aquí se observa también un importante aumento de intensidad, aunque la posición de los picos y la definición es similar con y sin nanopartículas de oro.

El mismo efecto puede observarse en sensores con tirosinasa sobre la variedad Mencía Regadío. Con las nanopartículas de oro hay un ligero incremento de intensidad en los picos de oxidación y reducción.

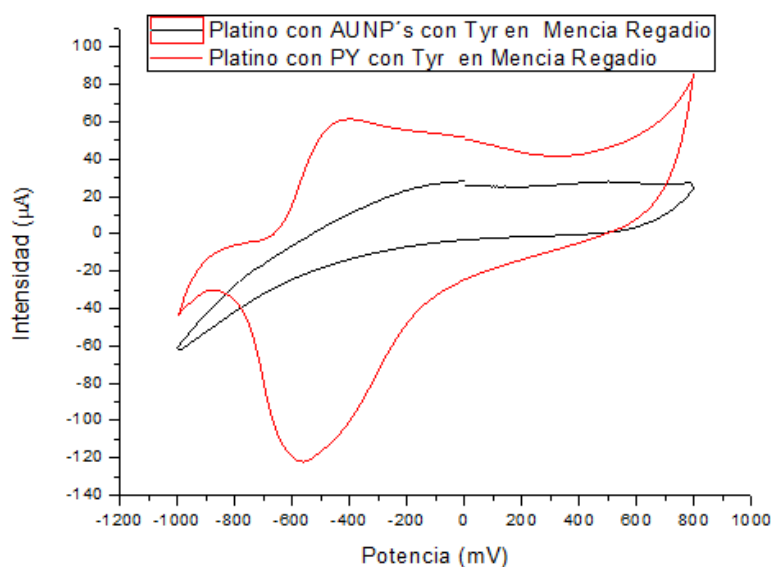


Figura 65. Respuesta voltamétrica de los sensores de Platino modificados con Tyrosinasa con y sin nanopartículas de oro en vino Mencía Regadío.

#### 4.3.3. Influencia del tipo de enzima utilizado.

En general la morfología del voltagrama se observa claramente diferente en función del tipo de enzima utilizado. Cuando se utiliza como enzima tirosinasa que como ya se ha comentado es específica para fenoles se observa en primer término un mayor número de picos de oxidación correspondientes a potenciales positivos.

La figura 66 corresponde a un sustrato de platino con pirrol modificado con nanopartículas de oro con los dos tipos de enzima utilizados sobre la variedad de Rufete.

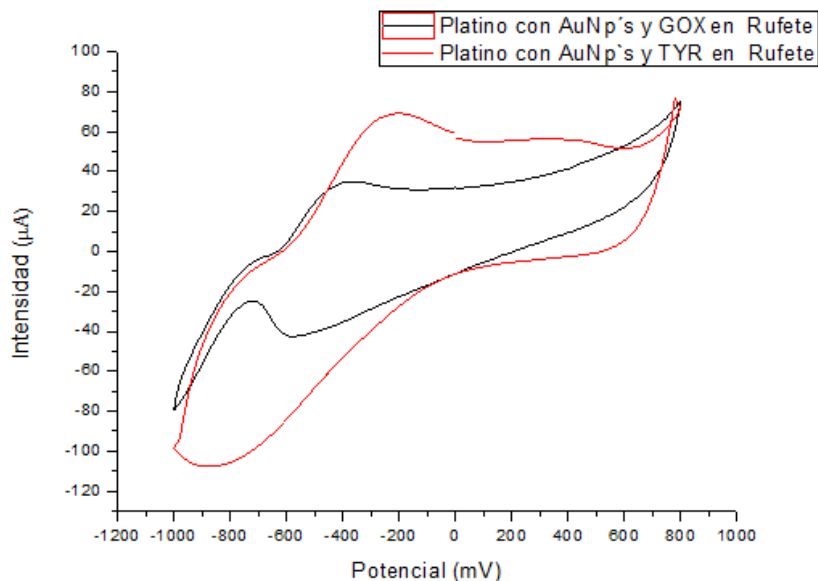


Figura 66. Respuesta voltamétrica de sensores de platino modificados con nanopartículas de oro con glucosa oxidasa y tirosinasa en el vino Rufete.

Los picos de oxidación correspondientes a fenoles suelen aparecer a potenciales superiores a 0.5 y tal y como vemos en la figura estos aparecen mejor definidos cuando se utiliza tirosinasa. También vemos que a lo largo de todo el barrido de intensidades son superiores cuando se utiliza este enzima. En el caso de la glucosa oxidasa para esta variedad se observan también picos de oxidación definidos, pero a potenciales más negativos que con tirosinasa y en el caso de reducción los picos con Glucosa Oxidasa son menos intensos, pero aparecen a potenciales menos negativos. En cualquier caso, la respuesta del sensor es distinta en función del tipo de enzima depositado sobre el mismo.

En la figura 67 se observa un efecto parecido cuando se utiliza como sustrato el acero inoxidable. La figura corresponde a un sensor de polipirrol con glucosa oxidasa y con tirosinasa ensayados en la variedad Prieto Picudo.

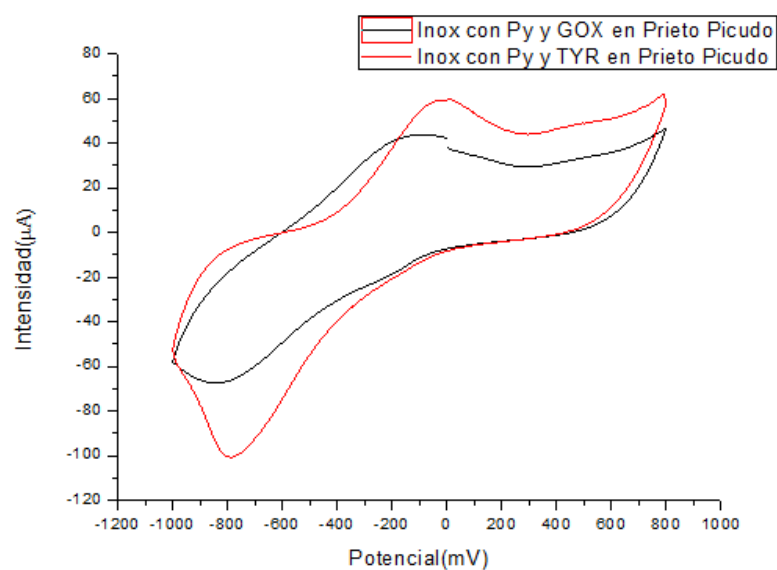


Figura 67. Respuesta voltamétrica de los sensores de inoxidable con polipirrol modificados con tirosinasa y glucosa oxidasa en vino Prieto Picudo.

Observamos que en el caso del sensor con tirosinasa permite observar claramente dos picos bien definidos, uno a potencial de 0 voltios y otro a potenciales más anódicos que es donde, como hemos dicho, suelen aparecer los picos de oxidación de los fenoles. Como en el caso de los electrodos con platino también en este caso se puede apreciar intensidades tanto en oxidación como en reducción más alta con tirosinasa.

#### 4.3.4. Influencia del medio de ensayo

A continuación, hemos seleccionado la respuesta de alguno de los sensores ante las diferentes variedades de vinos ensayados con objeto de observar las diferencias y semejanzas encontradas.

La figura 68 correspondiente a la respuesta del biosensor de polipirrol modificado con nanopartículas de oro sobre sustrato de acero inoxidable con glucosa oxidada como enzima.

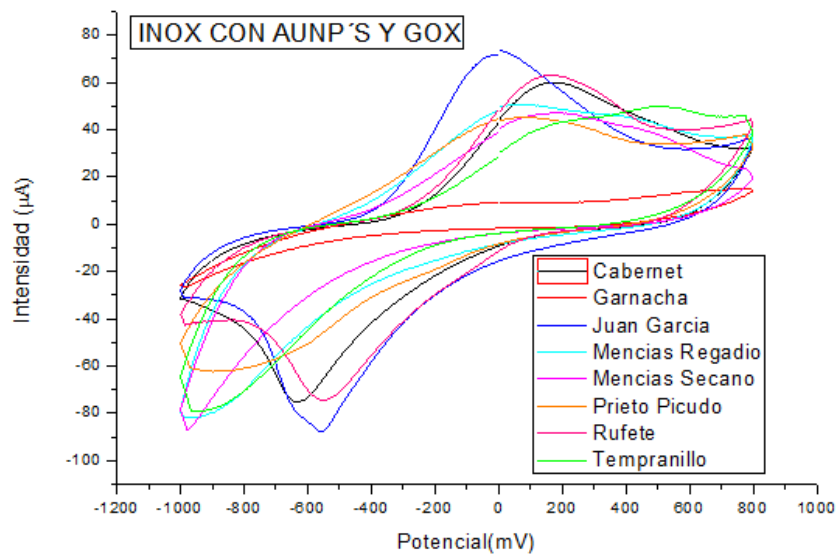


Figura 68. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las diferentes variedades de vino.

Vemos como a pesar de que en todas las variedades la respuesta es similar en cuanto a la posición de los picos y la intensidad de los mismos, la respuesta como veremos es claramente diferente de la observada en otro biosensor, podemos apreciar diferencias y similitudes entre las diferentes variedades que son más fáciles de discernir cuando se analizan por separado.

La figura 69 corresponde a dos variedades similares, la de Mencía Secano y la de Mencía Regadío. Los voltamogramas son parecidos especialmente en la zona de oxidación, lo cual se repite en otros biosensores.

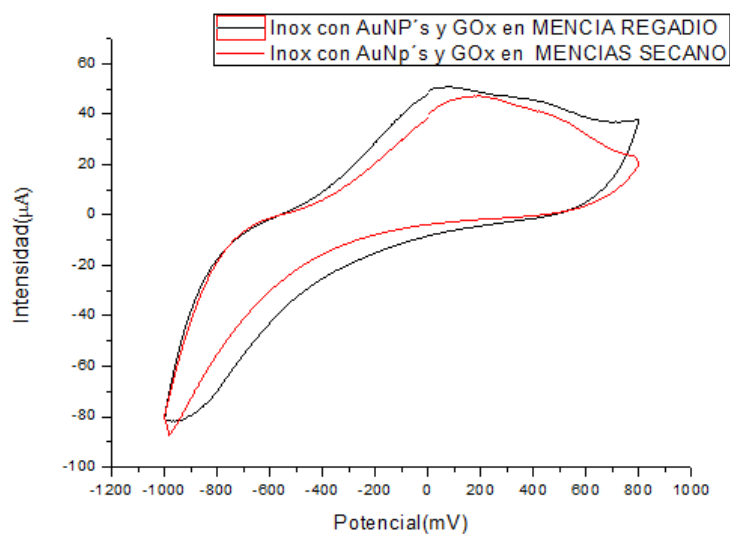


Figura 69. Respuesta voltamétrica del biosensor de Inoxidable modificado con nanopartículas de oro y Glucosa Oxidasa en las variedades de vino Mencía Regadio y Mencía Secano

Vemos que la respuesta es totalmente diferente a los que presentan las variedades de Rufete, Juan García y Cabernet. Observamos que la morfología coincide, aunque los picos de oxidación aparecen desplazados a potenciales diferentes en función de la variedad, en la reducción las diferencias son incluso menores.

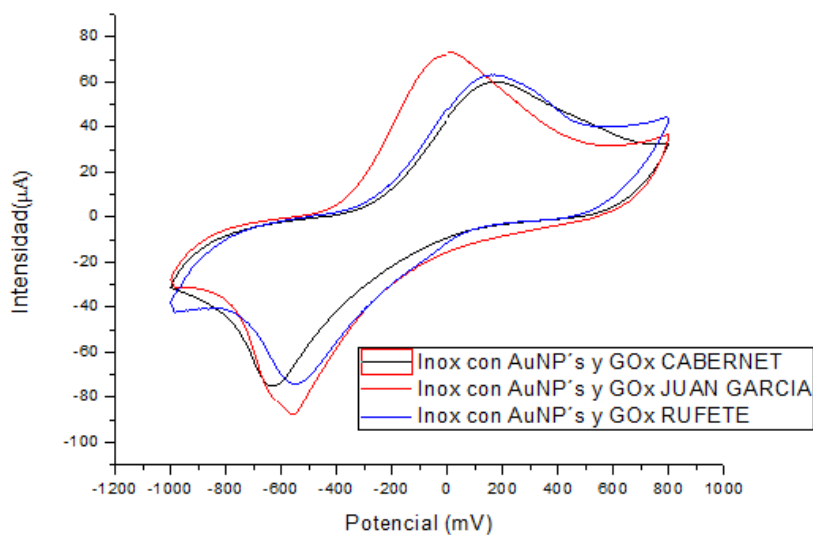


Figura 70. Respuesta voltamétrica del biosensor de Inoxidable modificado con nanopartículas de oro y Glucosa Oxidasa en las variedades de vino Cabernet, Juan García y Rufete.

El resto de variedades tienen voltamogramas con picos menos definidos para este sensor. La figura 71 corresponde a la variedad de Garnacha y comparamos la respuesta con la de vino Cabernet analizada anteriormente.

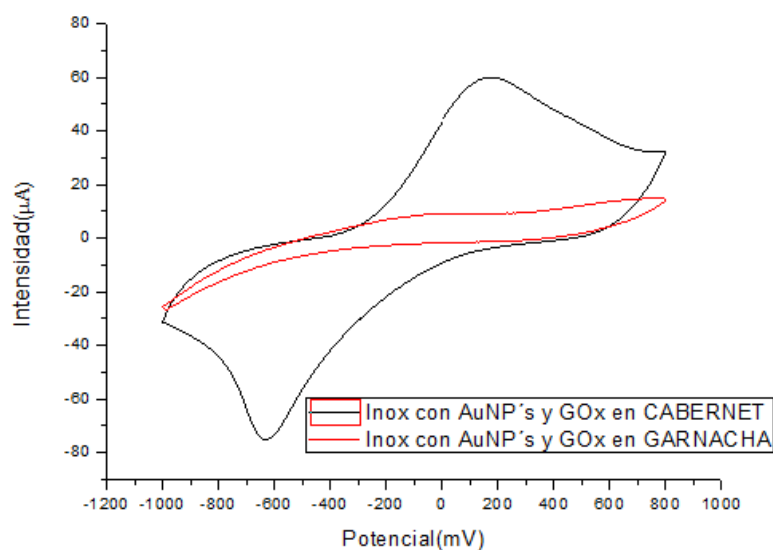


Figura 71. Respuesta del biosensor de Inoxidable modificado con nanopartículas de oro y Glucosa Oxidasa en las variedades Cabernet y Garnacha.

En el caso de las variedades de Prieto Picudo y Tempranillo las intensidades son claramente superiores en la variedad Garnacha. En ambos casos se observan picos de oxidación anchos y desplazados a potenciales más positivos en la variedad Tempranillo.

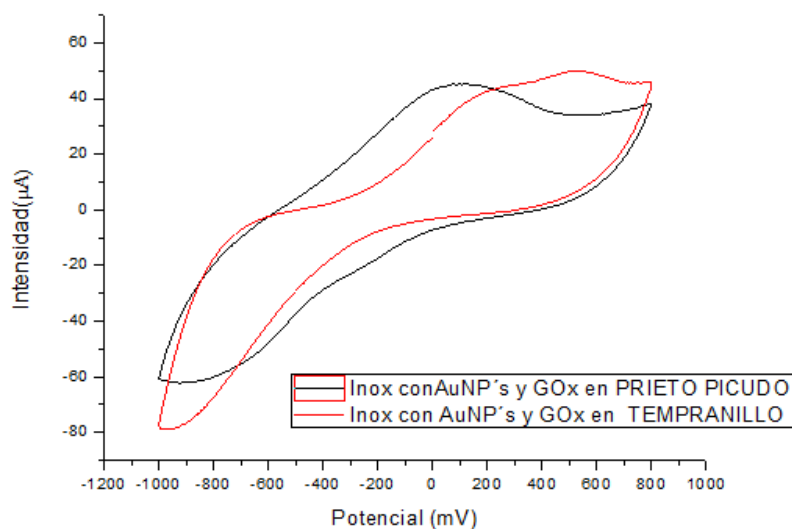


Figura 72. Respuesta voltamétrica del biosensor Inoxidable modificado con nanopartículas de oro y Glucosa Oxidasas en las variedades de Prieto Picudo y Tempranillo.

La respuesta del mismo tipo de biosensor con oro y con glucosa oxidasa como enzima, pero sobre sustrato de platino es claramente diferente a la comentada anteriormente tal y como se aprecia en la figura.

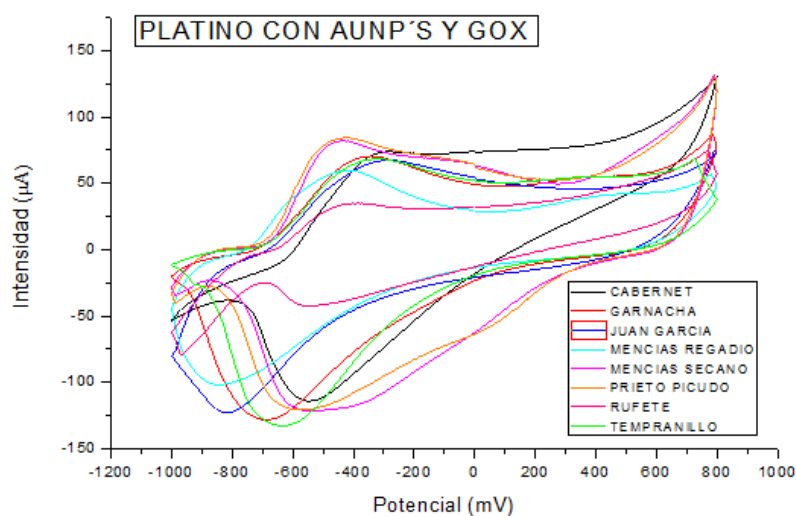


Figura 73. Respuesta del biosensor de platino modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las diferentes variedades de vinos.

También observamos que en cada variedad presenta una respuesta característica, aunque sí que es posible establecer algunas analogías entre ellas.

Como en el sensor anterior también se vuelve a constar la similitud entre las variedades de Mencía Secano y Mencía Regadio. En este caso, el sensor también nos da una respuesta similar en la variedad Garnacha, aunque los picos se desplazan ligeramente a potenciales más positivos.

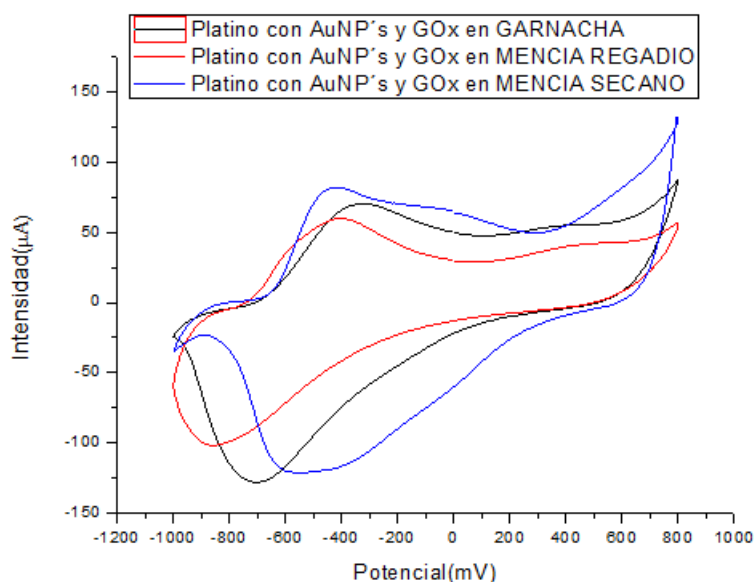


Figura 74. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las variedades de vino Garnacha, Mencía Regadio, y Mencía Secano.



En la figura 75 hemos agrupado la respuesta ante otras tres tipos de variedades: Rufete, Tempranillo y Prieto Picudo. En todos los casos se observan picos bien definidos en el mismo rango de potencial, pero vemos que el potencial de cada uno de ellos, así como las intensidades relativas son claramente diferentes.

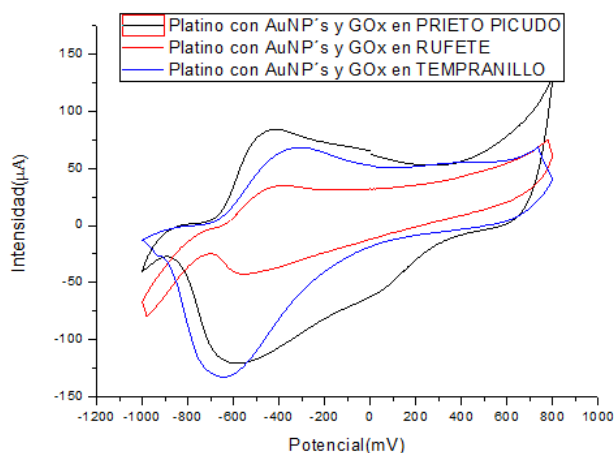


Figura 75. Respuesta voltamétrica del biosensor de platino modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las variedades de Prieto Picudo, Rufete y Tempranillo

Finalmente, en el caso de los biosensores con tirosinasa se observa que además de los picos a potenciales aparecen picos a potenciales más positivos, que en función de la variedad llegan a ser incluso más intensos que los observados a potenciales negativos, y que podrían correlacionarse con el índice de polifenoles de cada variedad de vino.

La figura 76 muestra como ejemplo la respuesta del sensor de polipirrol con nanopartículas de oro sobre sustrato de acero inoxidable con esta enzima.

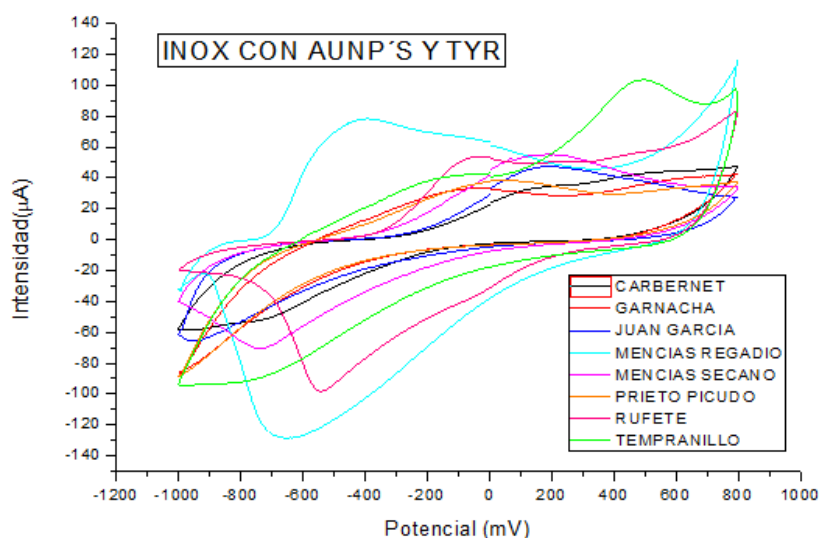


Figura 76. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y tirosinasa en las distintas variedades de vinos.

Vemos como en este caso la respuesta es claramente diferente de la observada con enzima de glucosa oxidasa y en este caso las variedades de Mencía Secano y Mencía Regadío que, con esta última enzima, daban señales similares, dan respuestas claramente diferentes cuando se usa tirosinasa como enzima específico.

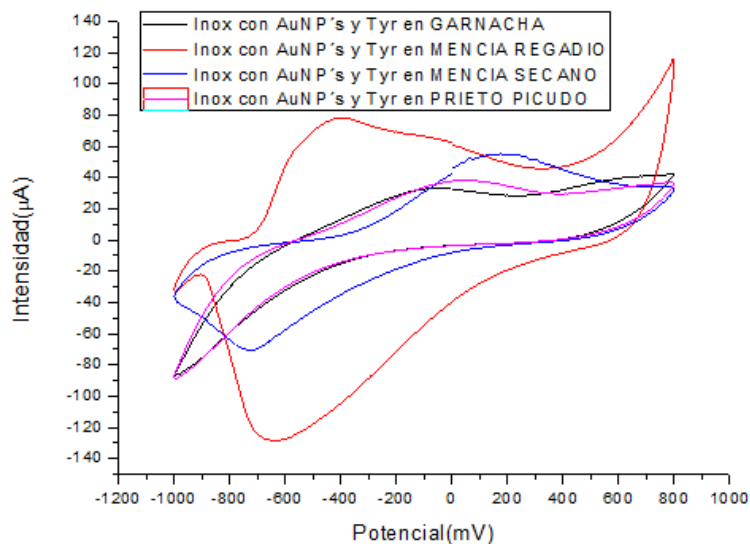


Figura 77. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y glucosa oxidasa en las variedades de vino Garnacha, Mencía Regadío, Mencía Secano y Prieto Picudo.

También podemos apreciar como las variedades de Garnacha y Prieto Picudo dan respuesta muy similar lo que podría ser indicativo de su similitud en el contenido de polifenoles.

Las variedades de Cabernet, Garnacha y Juan García también presentan similitudes tal y como apreciamos en la figura. Vemos que en todos los casos es la rama de oxidación la que da mayor información y aparecen picos definidos a potenciales más positivos.

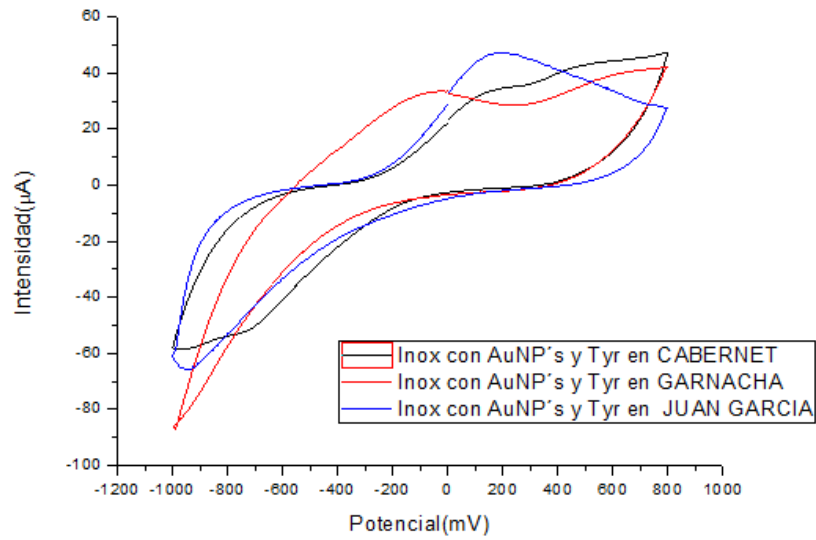


Figura 78. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y tirosinasa en las variedades de Cabernet, Garnacha y Juan Garcia.

Finalmente podemos observar como la variedad de Tempranillo es la que da picos de oxidación más intensos en esta zona del voltamograma en comparación con otras variedades, ello podría ser indicativo de un mayor índice de polifenoles.

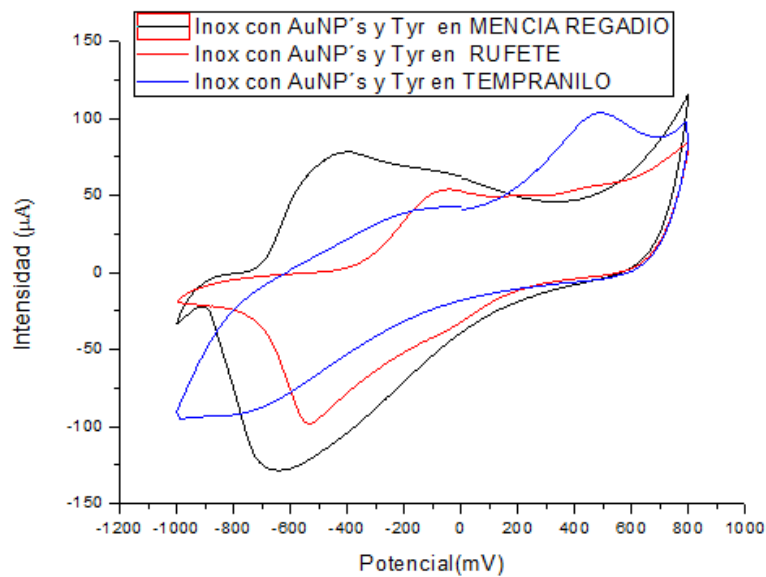


Figura 79. Respuesta voltamétrica del biosensor de inoxidable modificado con nanopartículas de oro y tirosinasa en las variedades de vino Mencía Regadío, Rufete y Tempranillo.

Como resumen del análisis anterior podemos decir que cada uno de los ocho tipos de sensores utilizados muestran señales diferentes antes las ocho diferentes variedades de vino analizado con lo que como en el caso de los mostos podemos concluir que nuestros sensores son discriminatorios, pero presentan alta selectividad cruzada lo que resulta imprescindible para su uso en el dispositivo de lengua electrónica que analizaremos en el siguiente apartado.

## **4.4. TRATAMIENTO DE DATOS**

### **4.4.1. Introducción**

Como se ha mencionado en el apartado anterior, cada biosensor presenta una respuesta electroquímica particular frente a cada una de las diferentes variedades de vinos y mostos. Esto es consecuencia de las interacciones que tienen lugar entre los diferentes biosensores y los múltiples compuestos de las muestras estudiadas. Estas diferencias son evidenciadas principalmente por cambios en la posición de los picos y en variaciones en sus intensidades relativas. Por esto, los datos recogidos por las señales electroquímicas de la red de biosensores pueden ser utilizados para diferenciar y clasificar los vinos y mostos estudiando sólo los datos más característicos sin necesidad de analizar sus componentes particulares, esto es de forma global sin tener que recurrir a análisis químicos individuales de cada uno de los compuestos los que integran.

La capacidad distintiva de nuestra lengua bio(electrónica) ha sido analizada y visualizada mediante métodos matemáticos, como el método de Análisis de Componentes Principales o PCA y el método de análisis de factores paralelos o PARAFAC. Se trata de un método muy conocido y utilizado para el procesamiento de conjuntos de datos multivariantes (que miden varias variables de cada muestra) obtenidos en las medidas experimentales realizadas. En este trabajo se ha considerado conveniente aplicar y detallar los resultados obtenidos con ambos métodos ya que ambos proporcionan información algo diferente de gran interés.

Utilizamos las señales de la voltametría cíclica como fuente de datos para los tratamientos estadísticos. Se han tomado cuatro repeticiones de cada medida. Se ha seleccionado la rama de oxidación para el estudio, ya que era esta con la que se obtenían mejores resultados. A esta parte de las señales se les aplicó el método Kernel cogiendo diez funciones Kernel.

De este modo las curvas quedan totalmente representadas con diez parámetros y además si trabajamos con muchos parámetros por curva, el coste computacional sería muy alto y el proceso de tratamiento de datos perdería rapidez innecesariamente. Los diez valores obtenidos de cada voltamograma fueron escalados entre los valores máximos y mínimos para descartar el efecto del rango de corriente. Se estandariza la variable a media cero y varianza unidad. De no ser así, si una variable tuviera una varianza mucho más grande, entonces sería esta variable la que controlaría la primera componente principal. La estandarización evita que todas las variables tengan el mismo peso.

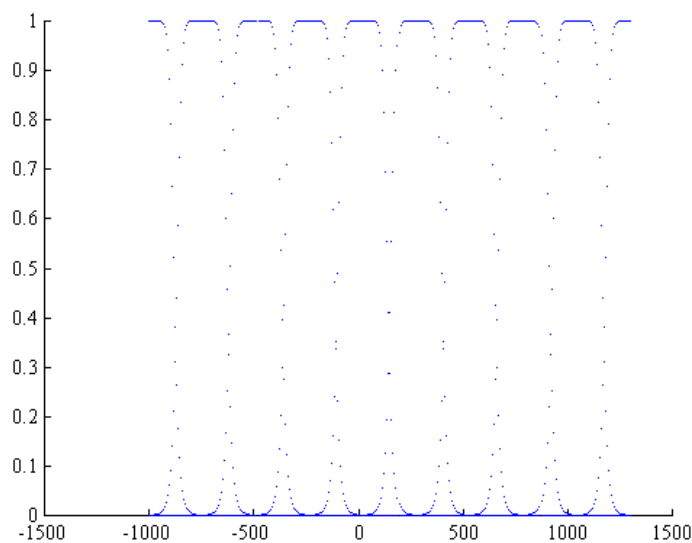


Figura 80. Dibujo de 10 funciones Kernel.

Por último, tratamos los datos con el programa Matlab y aplicando el análisis tanto en componentes principales como en factores paralelos a una matriz de datos se tienen los resultados para los sensores.

#### **4.4.2. Análisis en componentes principales (PCA)**

##### **4.4.2.1. PCA en mostos**

En primer lugar, vamos a evaluar la capacidad de nuestra red de biosensores para discriminar entre distintos tipos de mostos. Se llevaron a cabo cuatro repeticiones de cada medición. La figura... ilustra el gráfico de los resultados obtenidos de la PCA en vinos. En ella aparecen los datos representados en las tres componentes PC1, PC2 y PC3. Las diferentes variedades de mostos quedan reflejadas con un número, que corresponde con la misma variedad que en el caso de los vinos.

1. Mosto Cabernet.
2. Mosto Garnacha.
3. Mosto Juan García.
4. Mosto Mencía Regadío.
5. Mosto Mencía Secano.
6. Mosto Prieto Picudo.
7. Mosto Tempranillo.
8. Mosto Rufete.

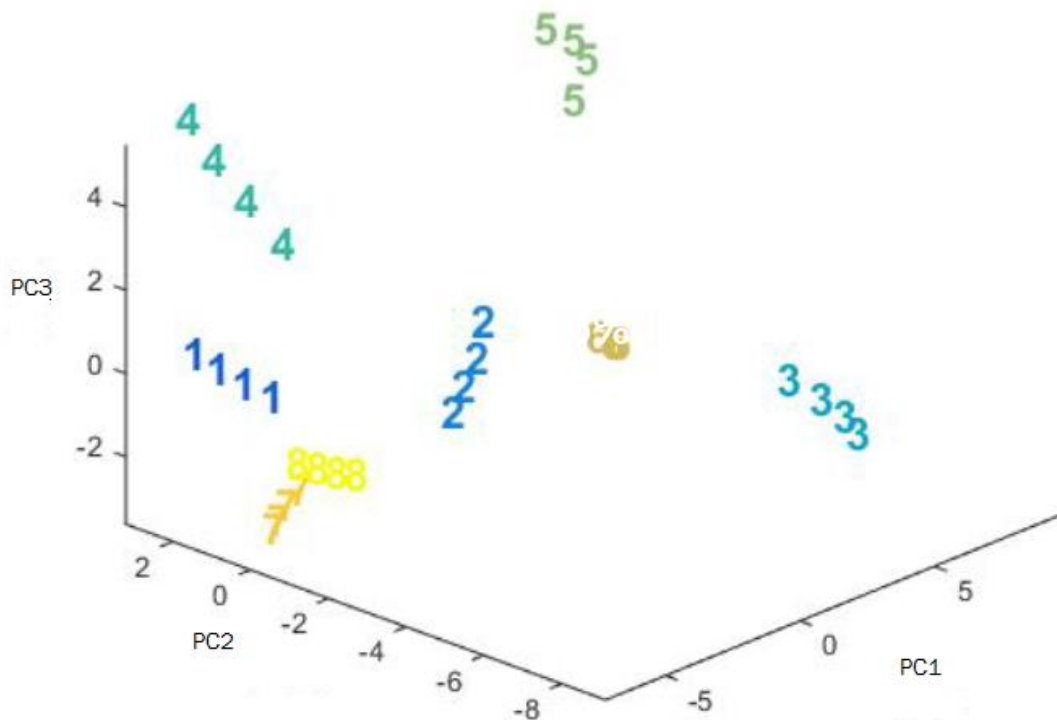


Figura 81. PCA en 3D a partir de los registros obtenidos de la red de biosensores en las diferentes variedades de mostos.

Podemos observar cómo las repeticiones aparecen un poco dispersas, aunque esta dispersión no es significativa ya que no impide discriminar entre los ocho mostos. Los diferentes números que reflejan las diferentes variedades de mostos aparecen representados alejados uno de otros, pudiendo concluir de esta manera que nuestra red de biosensores es capaz de discriminar las diferentes variedades de mostos. Se aprecia cómo las variedades 7 (Tempranillo) y 8 (Rufete) aparecen más próximas, pero tampoco muy alejada de la variedad 1 (Cabernet). La variedad 5 y 3 aparecen las más alejadas del resto, por lo que podemos decir que presentan unas características más dispares al resto de las variedades estudiadas.

Para este análisis la primera componente principal (PC1) aporta 40,9645 % de la variación que hay en la muestra, la segunda componente (PC2) el 15,1321 % y la tercera componente (PC3) el 10,6271 % de la variación. Las tres componentes mencionadas aportan 67,7233 %. Este valor es relativamente elevado como para concluir que nuestra red de biosensores es capaz de discriminar las diferentes variedades de mostos.

#### 4.4.2.2. PCA en vinos

A continuación, realizaremos un estudio similar al de los mostos para estudiar la capacidad discriminadora de nuestra red de biosensores en vinos. Al igual que en el caso de los mostos, para cada vino existen cuatro números que corresponden a las cuatro repeticiones elaboradas. La equivalencia número - vino es la siguiente:

1. Carbenet
2. Garnacha
3. Juan García
4. Mencía Regadío
5. Mencía Secano
6. Prieto Picudo
7. Tempranillo
8. Rufete.

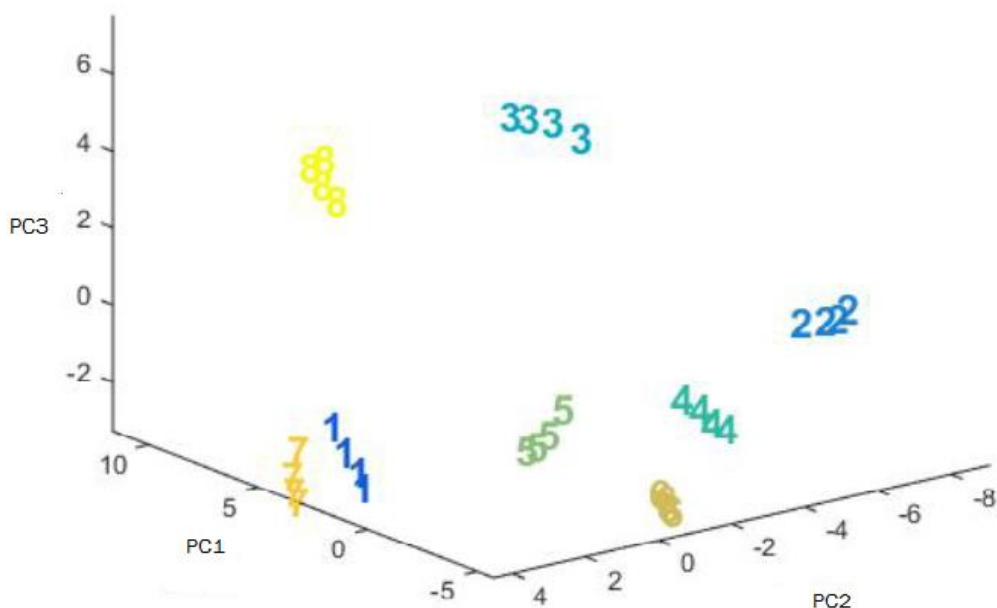


Figura 82. PCA obtenido en 3D a partir de los registros obtenidos con la red de biosensores en las diferentes variedades de vinos.

En la figura 82 podemos observar cómo las repeticiones de cada vino son muy próximas presentando menos dispersión que en el caso de los mostos, pero a la vez cada número aparece alejado uno de otro. Esto quiere decir que la red de biosensores es capaz de distinguir la diferente composición de cada vino, y por tanto es capaz de discriminar. En el caso del vino 1 (Cabernet) y vino 7 (Tempranillo) aparecen más próximos que el resto.



En relación a esto podemos concluir que la variedad de vino Cabernet y Tempranillo tendrán unas características similares. La variedad de vino 3 (Juan García) aparece más alejada del resto, por lo que esta variedad de vino es muy diferente al resto de las estudiadas. A esta misma conclusión llegamos cuando estudiamos los ciclos por separado procedentes de la voltametría cíclica. Además, se aprecia cómo tanto en vinos como en mostos las variedades 1 y 7 son similares y la variedad 3 se aleja del resto.

En este estudio de componentes principales para las distintas variedades de vinos, la primera componente principal (PC1) aporta 37,215 % de la variación que hay en el conjunto de datos, la segunda componente 19,2605 % y la tercera componente 13,1677 %. Asimismo, las tres componentes mencionadas aportan un 69,6434 % de la variación, es decir, un alto porcentaje de toda la información, lo cual podemos considerar que nuestra red de biosensores es efectiva.

#### 4.4.2.3. PCA en vinos y mostos

Para evaluar las posibles similitudes que existen entre las variedades de vinos y mostos se realiza un análisis en componentes principales de ambas muestras conjuntamente. Para ello se han agrupado los resultados obtenidos de las voltametrías cíclicas para obtener una representación como la de la figura .... en las tres componentes principales. En este caso, las ocho primeras variedades corresponden a variedades de vinos y las ocho siguientes a variedades de mostos de modo que:

- |                         |                           |
|-------------------------|---------------------------|
| 1. Vino Cabernet.       | 9. Mosto Cabernet.        |
| 2. Vino Garnacha.       | 10. Mosto Garnacha        |
| 3. Vino Juan García.    | 11. Mosto Juan García.    |
| 4. Vino Mencía Regadío. | 12. Mosto Mencía Regadío. |
| 5. Vino Mencía Secano.  | 13. Mosto Mencía Secano.  |
| 6. Vino Prieto Picudo.  | 14. Mosto Prieto Picudo.  |
| 7. Vino Tempranillo.    | 15. Mosto Tempranillo.    |
| 8. Vino Rufete.         | 16. Mosto Rufete.         |

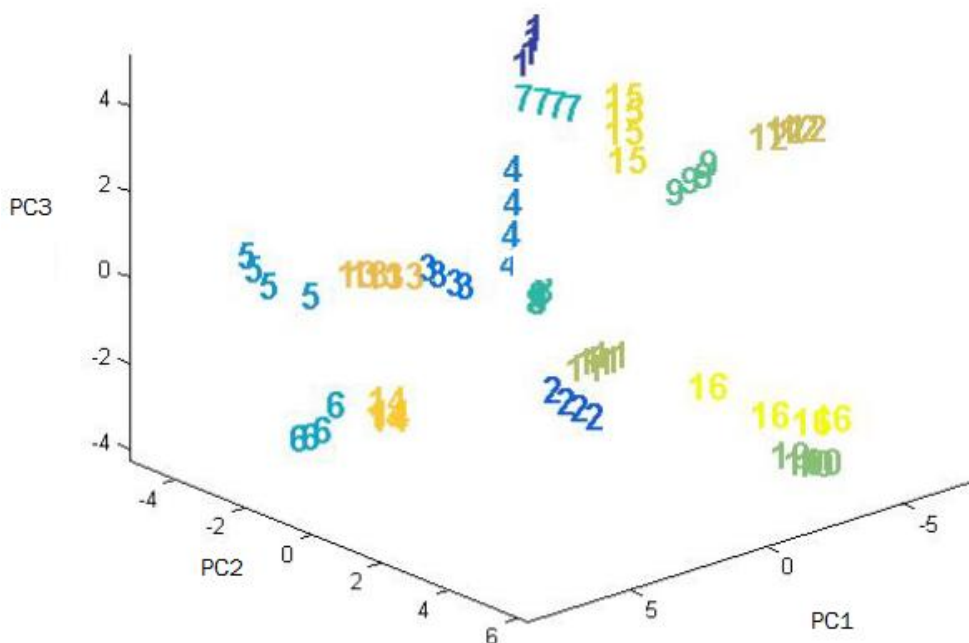


Figura 83. PCA en 3D a partir de los registros obtenidos por la red de biosensores conjuntamente en las diferentes variedades de vinos y mostos.

En esta ocasión, los datos correspondientes a las variedades de mostos y vinos también aparecen agrupados. A su vez, las diferentes variedades aparecen dispersas por lo que comprobamos que tomando conjuntamente ambas muestras nuestra red de biosensores es capaz de discriminar. Las variedades 5 (Vino Mencía Secano) y 13 (Mosto Mencía Secano) aparecen próximas entre sí. Con esto podemos decir que existirán ciertas similitudes entre vino y mosto de la misma variedad de uva Mencía Secano. Esto mismo ocurre con las variedades 7 (Vino Tempranillo) y 15 (Mosto Tempranillo), y con las variedades 6 (Vino Prieto Picudo) y 14 (Mosto Prieto Picudo). Teniendo en cuenta esto, se puede decir que, a pesar de los procesos que experimenta la uva hasta llegar a convertirse en vino, conserva ciertas propiedades similares a cuando forma parte de un mosto.

En relación a la varianza aportada por cada componente tenemos que la primera componente aporta un 28,368 % de la variación que hay en la muestra conjunta, la segunda componente un 10,0299 % y la tercera componente un 9,0704 %. Todas ellas suman un porcentaje total de 47,48 %. Este resultado es inferior a los obtenidos anteriormente, debido al mayor tamaño de la muestra. Asimismo, resulta un porcentaje aceptable para considerar que nuestra red de biosensores es capaz de discriminar tanto vinos como mostos.

En todos los análisis mediante componentes principales (PCA) obtenemos como resultado que la primera componente principal es la que mayor varianza aporta, pero si no tuviéramos en cuenta el porcentaje de las otras dos no seríamos capaces de representar con gran precisión los datos de las muestras.

#### **4.4.3. Análisis de factores principales (PARAFAC)**

Para realizar un análisis exhaustivo de las muestras de vinos y mostos también se ha llevado a cabo un análisis en factores principales (PARAFAC). En este caso, para obtener unos resultados que proporcionasen unas conclusiones lo suficientemente claras se ha realizado un escalado de los datos en la voltimetría cíclica de vinos y mostos. En este caso también hemos realizado cuatro representaciones de las mediciones tomadas.

En la aplicación de PARAFAC a parte de obtener unas representaciones muy similares a las obtenidas en PCA obtenemos previamente una información previa de nuestra red de biosensores que nos permite caracterizarlos de diferentes maneras.

##### **4.4.3.1. PARAFAC en mostos.**

A la hora de aplicar PARAFAC se nos proporciona un gráfico a partir del cual podemos establecer cual van a ser el número de componentes a estudiar. Este gráfico, como se ya se ha comentado en apartados anteriores de este trabajo, recibe el nombre de concordia (*core consistency*):

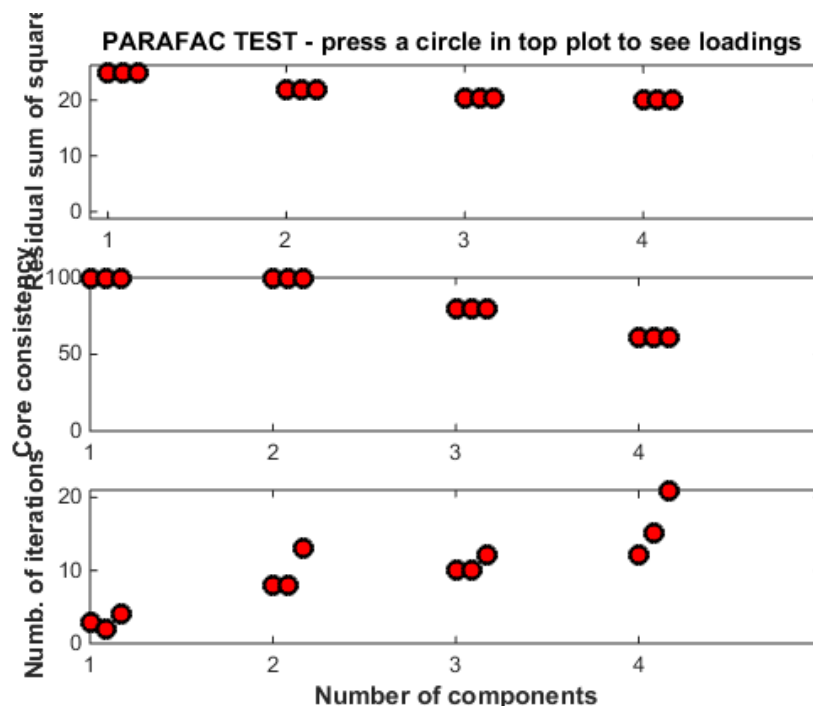


Figura 84. Gráfico Core Consistency para evaluar en el número de componentes a estudiar en mostos.

Como podemos observar en la figura...nos valdría con seleccionar dos componentes. Sin embargo, realizaremos el estudio en tres componentes para establecer una similitud con lo realizado en el caso de PCA.

A continuación, PARAFAC nos muestra conclusiones acerca de nuestra red de sensores. Mediante la siguiente representación podemos ver qué componente proporciona más información, con qué clase de sensores obtenemos intensidades más elevadas y qué zona de potenciales aporta mayor cantidad de información.

En el gráfico *Mode 1* la línea roja hace referencia a la primera componente, la línea azul a la segunda componente y la línea amarilla a la tercera componente. Observamos que la primera componente va a ser la componente que más información de la muestra aporte.

En el gráfico *Mode 2* se aprecia que la primera componente si concentra gran parte de la información en la zona de potenciales positivos mientras que la segunda y tercera componente aparecen también reflejadas en la zona de potenciales negativos.

El gráfico *Mode 3* refleja las señales transmitidas por los biosensores. Del 1 al 4 son sensores de inoxidable y del 5 al 8 son biosensores de platino. En este gráfico no queda tan patente la conclusión obtenida a partir de los ciclos de que los biosensores de platino mostraban intensidades superiores ya que la línea roja relativa a la primera componente no experimenta tanta variación. Sin embargo, en las componentes segunda y tercera se refleja con gran claridad.

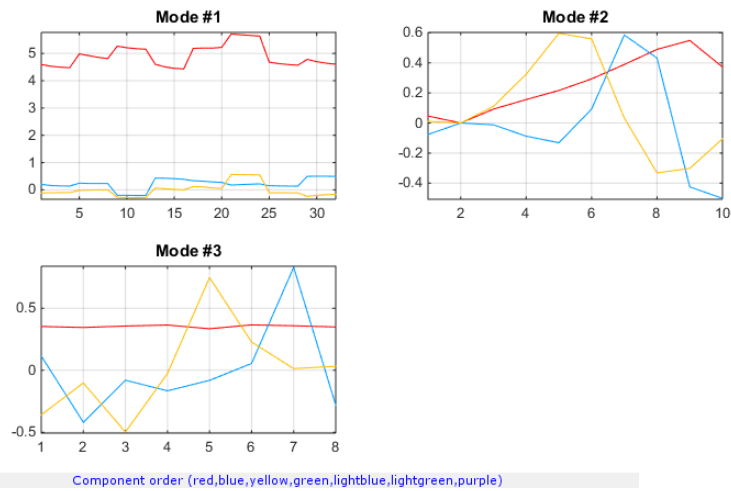


Figura 85. Representación de los diferentes modos en PARAFAC para el análisis de mostos.

Por último, PARAFAC muestra una representación similar a la obtenida por PCA, donde la dispersión entre las variedades de vinos representadas con números del mismo modo que en el análisis en componentes principales, nos permitirá conocer si nuestra red de biosensores es discriminadora o no. Al igual que ocurría en PCA las variedades de vinos aparecen alejadas unas de otra, demostrando la capacidad discriminadora de nuestra red de biosensores en el análisis de mostos.

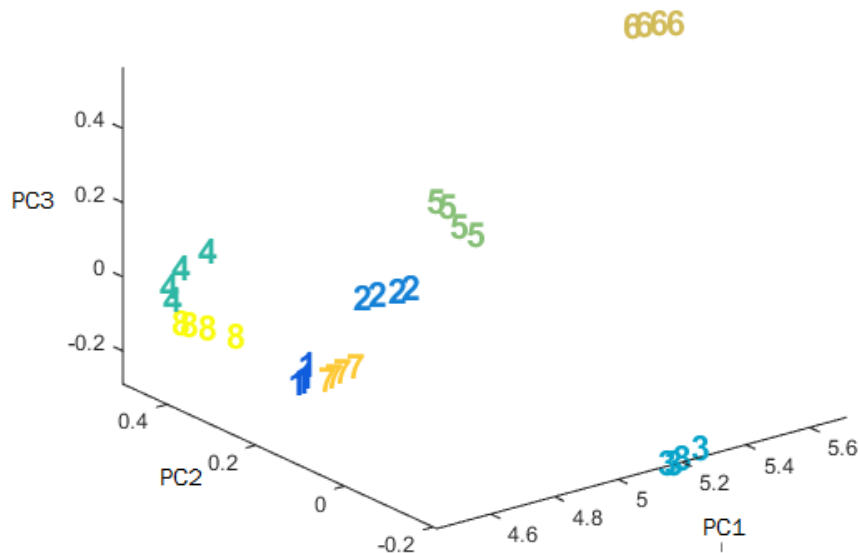


Figura 86. PARAFAC en 3D obtenido a partir de los registros realizados con la red de biosensores en las diferentes variedades de mostos donde: 1-Cabernet, 2-Garnacha, 3-Juan García, 4-Mencía Regadío, 5-Mencía Secano, 6-Prieto Picudo, 7-Tempranillo, 8-Rufete.

Como ocurría en el caso de PCA, la variedad 3 (Juan García) aparece la más alejada del resto y las variedades 1 (Cabernet) y 7 (Tempranillo) aparecen más próximas. Sus ciclos también eran muy similares, por lo que podemos decir que las variedades Cabernet y Rufete tienen una composición claramente muy parecida. La variedad 8 (Rufete) no se muestra muy alejada, de las variedades 1 y 7 lo que es indicativo también de similitudes en su composición. A esta misma conclusión llegamos en la representación de su voltametría cíclica donde los ciclos de estas variedades eran muy similares.

En la aplicación de PARAFAC obtenemos dos representaciones a mayores que nos indican con qué biosensores se obtienen mayores intensidades y que zona de potenciales proporciona mayor información. Esta misma información lo conseguimos con una representación previa de los diferentes modos. Esto nos permite afianzar nuestras conclusiones acerca de la mayor intensidad obtenida con los biosensores de platino, así como la mayor cantidad de información presente en la zona de potenciales positivos. Estas representaciones también tienen como ejes las tres componentes elegidas para mostrar con totalidad la variedad de toda la muestra.

En la figura 87 podemos ver cómo los números correspondientes a los biosensores de platino (del 1 al 4) no aparecen tan próximos como ya se había comentado.

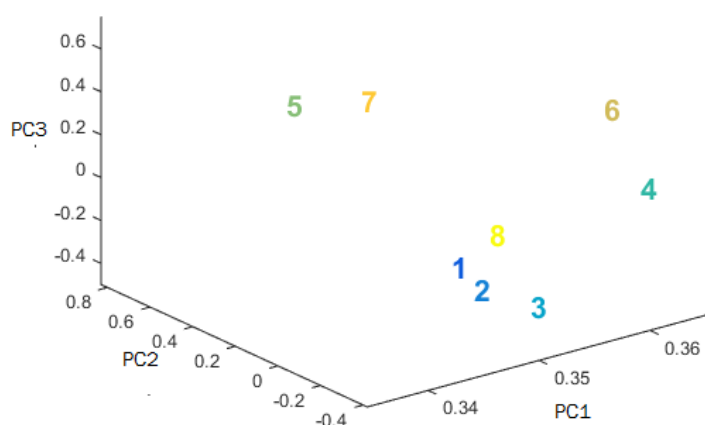


Figura 87. PARAFAC en 3D indicativo de la intensidad mostrada por los diferentes tipos de biosensores en función del sustrato empleado, inoxidable y platino.

En esta ocasión tampoco aparecen tan separadas las zonas de potenciales positivos y negativos, por lo que hace indicar que en mostos proporcionan la misma cantidad de información ambas ramas.

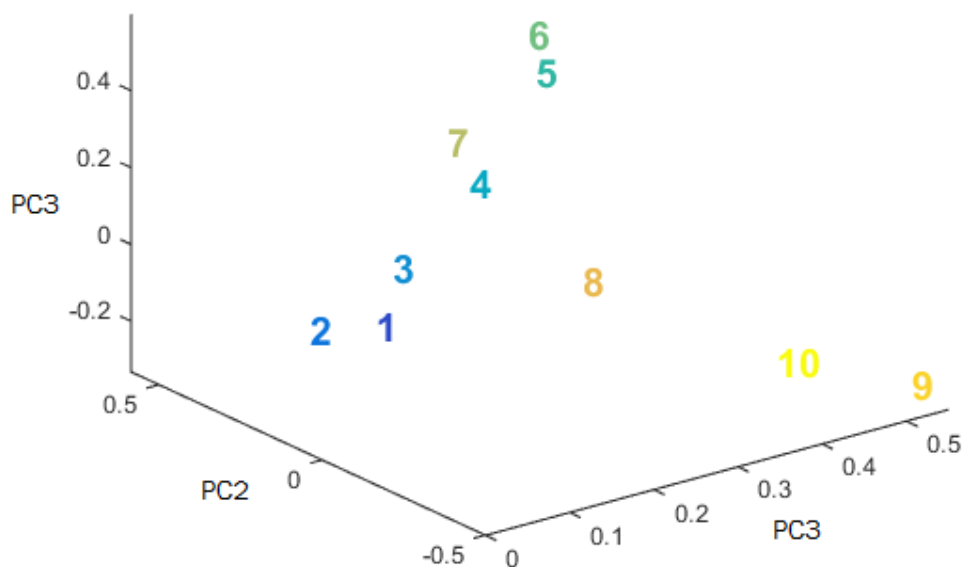


Figura 88. PARAFAC en 3D indicativo de la información proporcionada por las ramas de oxidación y reducción donde: 1-5 -potenciales positivos y del 5-10 potenciales negativos.

#### 4.4.3.2. PARAFAC en vinos.

Al igual que ocurría en el caso de los mostos el número de componentes seleccionadas para representar las muestras en su totalidad es tres, aunque como podemos ver en la figura 89 con dos componentes habría sido suficiente.

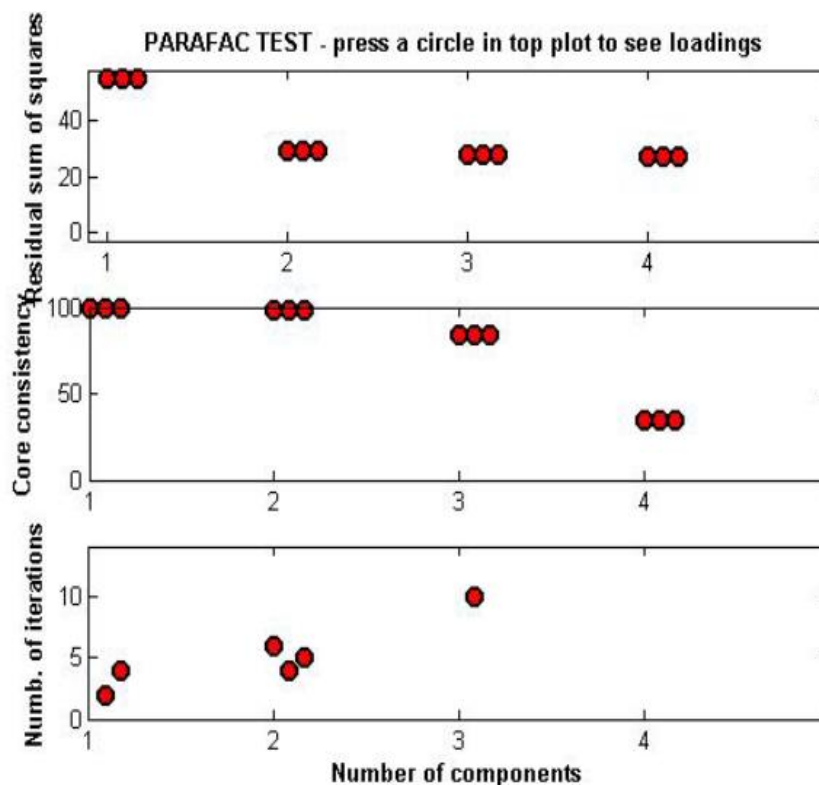


Figura 89. Gráfico Core Consistency para evaluar en el número de componentes a estudiar en vinos.

En el gráfico *Mode 1* observamos que la primera componente también va a ser la componente que más información de la muestra aporte. En el gráfico *Mode 2* se aprecia que la parte de potenciales positivos es la zona donde se concentra la mayor parte de la información, ya que las tres componentes aparecen representadas mayoritariamente en esta zona. En esta ocasión se refleja con mayor claridad que en el análisis de los mostos. El gráfico *Mode 3*, del 1 al 4 son sensores de inoxidable y del 5 al 8 son biosensores de platino. En este gráfico queda reflejado con gran precisión que en el análisis de vinos los biosensores de platino marcan intensidades superiores. A esta misma conclusión habíamos llegado cuando estudiamos los ciclos obtenidos de las voltametrías cíclicas. En relación a la intensidad proporcionada por los diferentes tipos de electrodos, en el caso de los vinos se observa con mayor claridad la mayor intensidad proporcionada por los biosensores de platino.



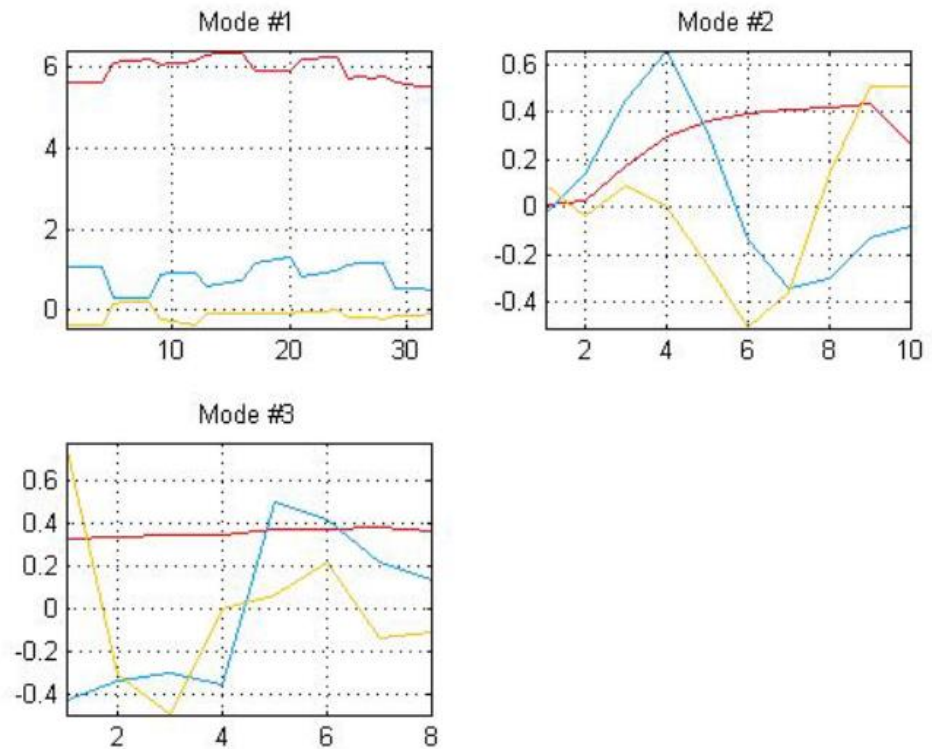


Figura 90. Representación de los diferentes modos en Parafac para el análisis de vinos.

En la figura 91 podemos observar que los datos de las diferentes variedades de vino están agrupados. En esta ocasión, se aprecia que las variedades 2 (Garnacha) y 4 (Mencía Regadío) aparecen próximas por lo que presentarán características similares. En el caso de la representación de los ciclos vimos como las variedades de Cabernet (1) y Rufete (8) presentaban ciclos similares. En esta representación se aprecia que no aparecen muy alejados entre sí. En conclusión, podemos decir que existe entre las muestras una gran dispersión por lo que podemos concluir que nuestra red de sensores es capaz de discriminar los 8 tipos de vinos.

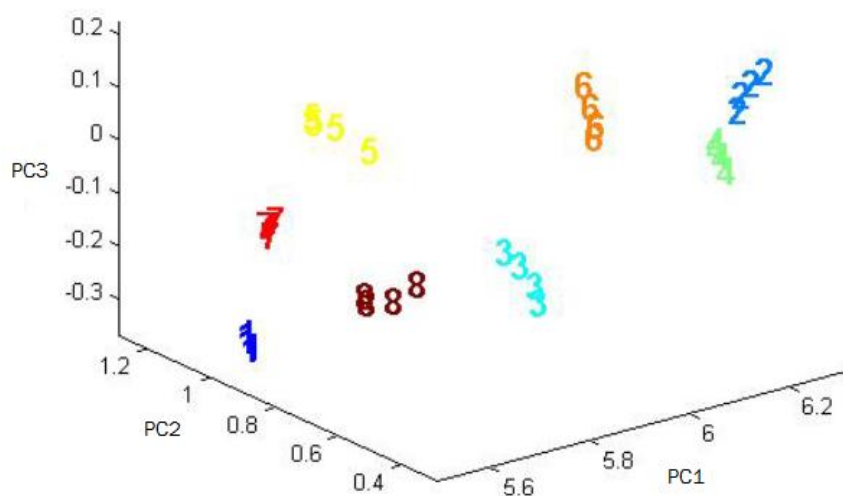


Figura 91. PARAFAC en 3D obtenido a partir de los registros realizados con la red de biosensores donde: 1-Cabernet, 2-Garnacha,3-Juan García,4-Mencia Regadio, 5-Mencia Secano, 6-Prieto Picudo, 7-Tempranillo, 8-Rufete.

En la figura 82 observamos como los potenciales positivos representados con los números comprendidos del 1 al 4 aparecen más agrupados, indicativo de que nuestra red de biosensores tendrá mayor capacidad discriminatoria si elegimos la zona de oxidación. Al contrario que ocurría en el caso de los mostos, en esta ocasión la zona de potenciales positivos va a ser la zona que mayor cantidad de información nos aporte.

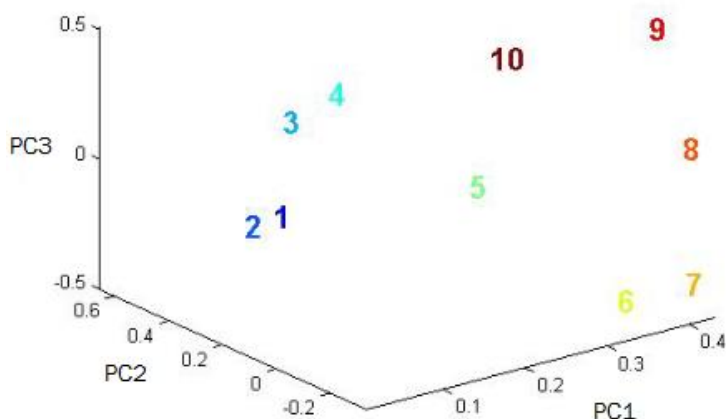


Figura 92. PARAFAC en 3D obtenido a partir de los registros realizados por la red de biosensores indicativo de la zona de potencial que proporciona mayor información.

En la figura 93 aparecen reflejados los biosensores según el tipo de sustrato utilizado. Los números del 1 al 4 se refieren a biosensores de inoxidable y del 5 al 8 a biosensores de platino. Se puede apreciar ligeramente que los biosensores de platino muestran intensidades superiores. En esta ocasión también podemos afirmar con mayor fiabilidad que los biosensores de platino reflejan intensidades superiores.

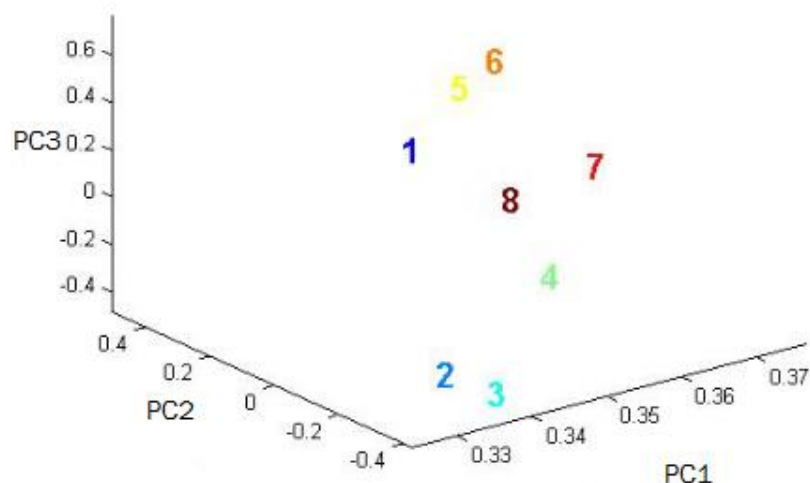


Figura 93. PARAFAC EN 3D indicativo de las intensidades proporcionadas por nuestra red de biosensores.

#### 4.4.3.3. PARAFAC en vinos y mostos.

Al agrupar las señales obtenidas de las voltametrías cíclicas de vinos y mostos, también se aprecia que la rama de oxidación es la rama que más información aporta. Sin embargo, la rama de potenciales positivos aparece menos agrupada que en el caso de los vinos, pero menos dispersa que en el caso de los mostos.

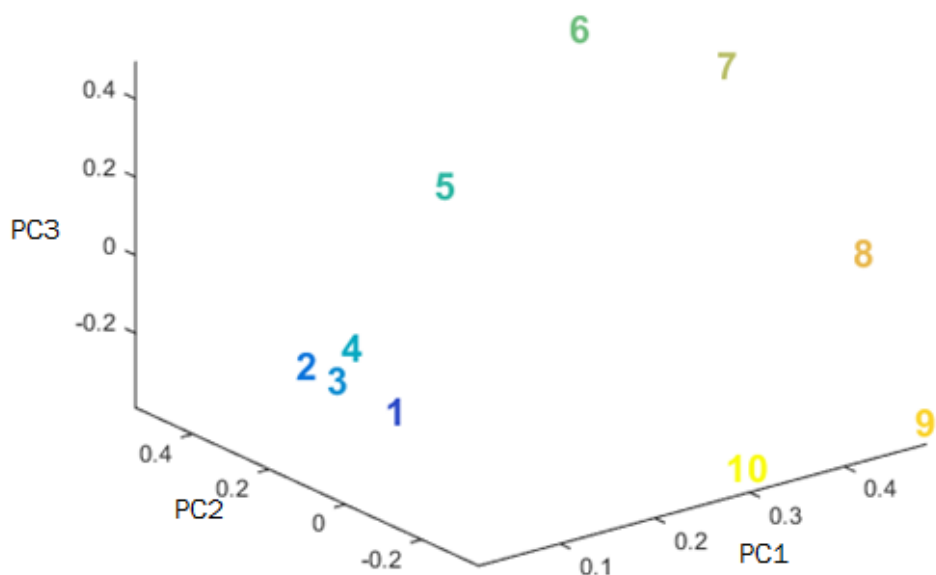


Figura 94. PARAFAC en 3D indicativo de la información proporcionada por las ramas de oxidación y reducción donde: 1-5 potenciales positivos, 5-10 potenciales negativos.

La representación conjunta de las diferentes variedades de vinos y mostos se muestra en la figura. Como ocurría en el caso de la representación en PCA, ciertas variedades de la misma uva en vinos y mostos aparecen próximas por lo que confirmamos la conclusión obtenida con anterioridad de que a pesar de los procesos que sufre la uva en los vinos mantiene alguna de sus características cuando se emplea en mostos.

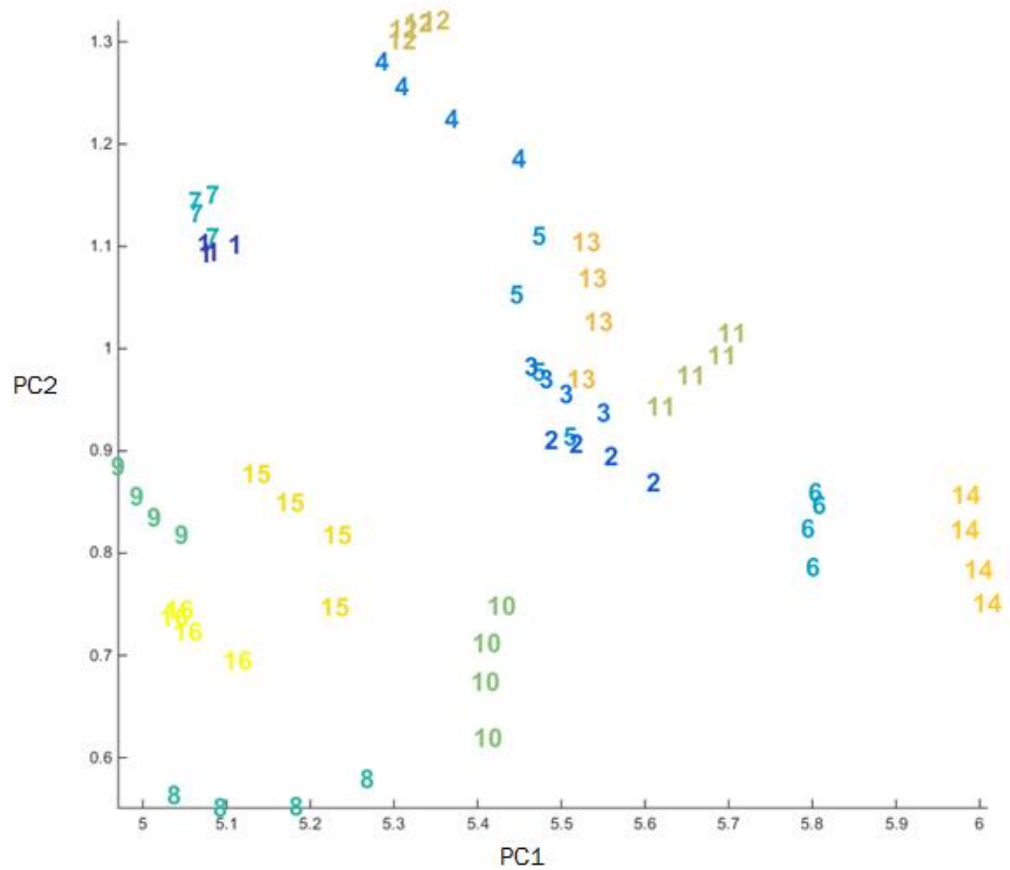


Figura 95. PARAFAC en 3D obtenido a partir de los registros realizados con la red de biosensores donde: 1-8 variedades de vinos y 8-16 variedades de mostos.

Hemos elegido una representación en dos componentes ya que observamos con mayor claridad las similitudes y diferencias entre las diferentes variedades de vinos y mostos. No es erróneo realizarlo así ya que, si observamos el gráfico de concordancia indicativo de las componentes necesarias, con dos componentes la muestra se representaría con gran precisión.

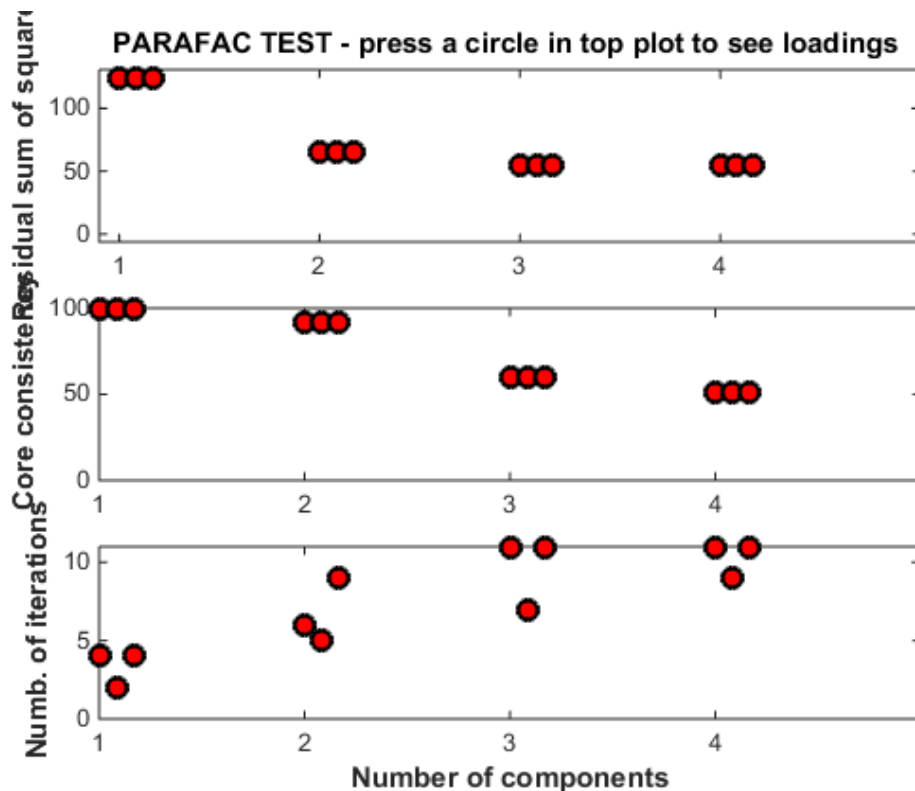


Figura 96. Gráfico concordia (Core Consistency) para la elección de componentes a representar en el análisis conjunto de vinos y mostos.

Volviendo a la representación conjunta de las muestras observamos cómo en el caso de PCA las variedades 6 (Vino Prieto Picudo) y 14 (Mosto Prieto Picudo) aparecen próximas. Lo mismo ocurre con las variedades 3 (Vino Juan García) y 11 (Mosto Juan García). A pesar de esto se observa una gran dispersión, concluyendo finalmente que nuestra red de biosensores tiene una gran capacidad discriminadora tanto en vinos como en mostos.

#### 4.4.4. PLS en mostos.

Para terminar con nuestro análisis a las muestras de vinos y mostos, se va a analizar las correlaciones que existen entre los datos obtenidos por nuestro biosensores con la composición química real de los mostos. La red de biosensores o lengua electrónica diseñada en este trabajo se centra principalmente en la detección de azúcares y polifenoles. Mediante este análisis podremos comprobar la efectividad de la misma.

En el caso de la detección de azúcares obtenemos los siguientes datos:

- Variables latentes: 3
- Calibración
  - $R^2$ : 0.984673
  - RMSE: 1.739755
- Validación
  - $R^2$ : 0.943015
  - RMSE: 3.458785

Para el caso de la detección de polifenoles los datos obtenidos son:

- Variables latentes: 3
- Calibración
  - $R^2$ : 0.97176
  - RMSE: 0.231275
- Validación
  - $R^2$ : 0.983467
  - RMSE: 0.578115

En ambos casos, el coeficiente de determinación obtenido tiene un valor muy elevado, por lo que podemos afirmar que nuestra red de biosensores presenta una gran eficacia a la hora de detectar tanto azúcares como polifenoles.

Finalmente apuntar que no se ha realizado el estudio PLS con los datos químicos de los vinos ya que no se disponía de ellos. Gracias a la Estación Enológica de Castilla y León que nos ha suministrado estos datos recientemente completaremos este análisis con las correlaciones con los datos químicos de los ocho vinos analizados.

#### 4.5. CONCLUSIONES

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar una red de biosensores capaces de discriminar entre distintas variedades de mostos y vinos. Dicha red está formada por biosensores con diferente sustrato, modificados con nanopartículas de oro. Las conclusiones a las que se ha llegado en este estudio de investigación han sido:

- Cada diferente tipo de electrodo, en función de su sustrato (inoxidable, platino), modificador (nanopartículas de oro) y enzima (tirosinasa y glucosa oxidasa) proporciona una respuesta diferente ante diferentes variedades de mostos y vinos, proporcionando a la red una alta selectividad cruzada.
- Los biosensores fabricados con platino reflejan señales con intensidades más elevadas.
- Las nanopartículas de oro mejoran el comportamiento del sensor aumentando la intensidad de la señal y mejorando la visualización de los picos en los ciclos.
- La modificación de los sensores mediante enzimas proporciona una alta especificidad sobre los compuestos que se quieren estudiar – azúcares y polifenoles – componentes principales en mostos y vinos.
- La zona de potenciales positivos, barrido de oxidación, aporta la mayor parte de la información de las muestras de vinos y mostos.
- La red de biosensores es capaz de distinguir entre las distintas variedades de vinos y mostos, siendo necesario el uso conjunto de todos los biosensores construyendo así una lengua bio(electrónica) y complementando las diferentes señales obtenidas y obteniendo una mayor discriminación. Se ha logrado obtener una red con una importante selectividad cruzada que permite obtener un óptimo grado de clasificación.
- Se observa una muy buena correlación entre el Análisis de componentes principales y el Análisis de factores principales en la discriminación de vinos y mostos.



- Los resultados del tratamiento de datos ponen claramente de manifiesto que a pesar de los procesos a los que se encuentra sometido el vino, existen similitudes con el mosto de la misma variedad de uva. El vino, producto final, recuerda a su origen, el mosto.
- La red de biosensores desarrollada también es capaz de establecer buenas correlaciones con los componentes fenólicos y azúcares de las diferentes variedades de mostos. La red es capaz de darnos una respuesta rápida que nos permite discriminar entre mostos y vinos sin necesidad de llevar a cabo ensayos individuales para cada uno de los componentes de los productos de la uva.

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.



## BIBLIOGRAFÍA

Romero García, Marta

Detección de vinos mediante  
una red de biosensores  
de pirrol y nanopartículas de oro.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] G. Revilla Allende, (2013). *“Diseño de una lengua electrónica para el análisis de mostos.”*
- [2] O. Castrillejo García, (2015). *“Desarrollo y aplicaciones de sensores poliméricos con nanopartículas de oro para la detección de antioxidantes en la industria de la alimentación.”*
- [3] L. López Gómez, (2013). *“Desarrollo de una red de sensores y biosensores miniaturizados para el análisis de mostos.”*
- [4] F.G.Banica, (2012). *“Chemical Sensors and biosensors: Fundamentals and Applications.”*
- [5] J.Janata, (2010). *“Principles of Chemical Sensors”*.
- [6] D.Pineda, (2003). *“Biosensores y su aplicación en la industria de los alimentos”*. Dirección de Innovación y calidad. Ministerio de Economía.
- [7] V. Carretero, M<sup>a</sup> L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, (2004). *“Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines”*. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Complutense of Madrid.
- [8] W.J.Feast, J.Tsibouklis, K.L. Pouter, L.Groenendaal, E.W. Meijer, (1996) . *“Synthesis, processing and material properties of conjugated polymers”*
- [9] V.Shaktawat, K.Sharma, N.S. Saxena, (2010). *“Structural and electrical characterization of protonic acid doped polypyrrole.”*. Semi-conductor & Polymer Science Laboratory, Deptt. Of Physics, University of Rajasthan, India.
- [10] L.X. Wang, X.G.Li, Y.L.Yang, (2000). *“Preparation, properties and applications of polypyrroles”*. Department of Polymer Material Science Engineering, Tongji University, Shanghai, Republic of China.
- [11] V. Carralero Sanz, (2008). *“Preparación de biosensores enzimáticos y inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro.”*
- [12] L.Escuder-Gilabert, M.Peris, (2010). *“Highlights in recent applications of electronic tongue in food analysis.”*
- [13] X.Cetó, C.Apetrei, M.del Valle, M.L.Rodríguez Méndez, (2013). *“Evaluation of red wines antioxidant capacity by means of a voltametric e-tongue with an optimized sensor array.”*

[14] V.Parra, A.A.Arieta, J.A.Fernández-Escudero, M.Íñiguez, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez Méndez, (2005). *“Monitoring of the ageing of red wines in oak barrel by means of an hybrid electronic tongue.”*

[15] M.Terrádez Gurrea. “Análisis de componentes principales”. UOC.

[16] Análisis de Componentes Principales (Tema 3)

[17] C.García Hernández, C.Medina Plaza, C.García Cabezón, F.Martín Pedrosa, I.del Valle, J. A de Saja, M.L.Rodríguez Méndez, (2015). *“An electrochemical quartz cristal microbalance multisensor system based on phthalocyanine nonostructured films: discrimination of musts.”*