



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**DISEÑO Y DESARROLLO DE REDES DE
SENSORES POTENCIOMÉTRICOS Y
VOLTAMÉTRICOS PARA SU APLICACIÓN EN
VINOS**

Autor:

Valdespino San José, María

Tutores:

García Cabezón, Ana Cristina

García Hernández, Celia

**Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica,
Expresión Gráfica en la Ingeniería Cartográfica, Geodesia y Fotogrametría,
Ingeniería Mecánica e Ingeniería de los Procesos de Fabricación**

Valladolid, Febrero 2019.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a la profesora D^a Cristina García Cabezón por darme la oportunidad de realizar este trabajo a su lado, por su ayuda y dedicación que ha invertido conmigo durante la elaboración de este proyecto. Agradecer todo lo que me ha enseñado en este tiempo. Sin ella no habría sido posible.

También querría dar las gracias a mi compañera de laboratorio y de proyecto, Esther de Torre que ha estado a mi lado, desde el principio hasta el final apoyándome y ayudándome. Con ella todo ha sido más fácil y ha convertido este tiempo de trabajo en un período agradable.

A Laura y Eugenia mis amigas de carrera, que han estado continuamente a mi lado desde el primer día. Gracias por estar en todos los momentos buenos y malos junto a mí.

A mis seis amigas de siempre por crecer a mi lado y apoyarme en todos los momentos difíciles. Gracias por estar constantemente.

Y por último, el apoyo incondicional que he tenido estos años duros y toda la vida, mis padres Jesús y M^a Jesús porque me han dado la oportunidad de formarme, pero también de permitirme elegir, decidir y ser. Gracias por confiar y levantarme siempre. Y a mí abuelina Cristina que es la mujer que siempre he admirado.

A todos vosotros, GRACIAS.

Resumen

En este trabajo fin de grado se ha llevado a cabo el diseño y fabricación de dos tipos de redes de sensores que nos han permitido construir una lengua voltamétrica y una lengua potenciométrica que de forma individual o combinada permiten el análisis de productos de interés en la industria de la alimentación. Primeramente, se ha construido la lengua voltamétrica a partir de sensores de pasta de carbono que han sido modificados con enzimas GOx (Glucosa Oxidasa) y Tyr (Tirosinasa). Seguidamente, se ha fabricado una red potenciométrica que contiene 20 sensores diferentes, estos son membranas de base PVC, con aditivos y plastificantes. Ambas redes de sensores se han caracterizado en diferentes disoluciones patrón con objeto de determinar su viabilidad. En el caso de los sensores voltamétricos han sido testados en una disolución de KCl y en una disolución redox de ferro-ferricianuro. Mientras que la red potenciométrica se ha acondicionado en disolución de KCl y en cinco disoluciones distintas que emulaban los 5 sabores (dulce, salado, ácido, amargo y umami). A continuación, los dos tipos de redes de sensores se han probado en diferentes productos alimentarios. En dos muestras de zumos lácteo (Control-Problema) para su diferenciación. Por último se han utilizado para analizar vinos, permitiendo discriminar entre cuatro muestras de vino de la misma edad y procedentes de cuatro tipos de uva; y entre cuatro muestras de vino de la misma uva pero con distinto envejecimiento. Los sensores desarrollados tienen repetitividad y reproducibilidad óptima y han logrado diferenciar y discriminar perfectamente todas las muestras de estudio.

Palabras clave: Sensores, biosensores, voltamétricos, potenciométricos, red, sabores, zumo, vino, uva, envejecimiento, discriminación.

Abstract

This final project has consisted of the design and production of two different types of sensor grid in order to build a voltammetric tongue and a potentiometric tongue, both of interest in the food industry.

Firstly, a voltammetric tongue has been made from carbon paste sensors that have been modified with enzymes Gox (Glucose oxidase) and Tyr (Tyrosinase). Subsequently, a potentiometric sensor grid has been constructed, made up of twenty different sensors, which are membranes composed of PVC, additives and plasticizers.

Both sensor grids have been characterized in different standard solutions to determine their feasibility. Voltammetric sensors have been tested in a KCl dissolution and a redox solution of ferro-ferricianide. Whereas the potentiometric grid has been conditioned in a KCl dissolution and in five different solutions which emulated the five flavours (sweetness, saltiness, sourness, bitterness and umami).

Subsequently, both sensor grids have been tested on different food products. In one case, upon two milk juices samples (Control-Problem) for their differentiation. In a second case, they were then used to analyse wines, allowing discrimination between four samples of wine of the same age and from four types of grape; and between four samples of wine from the same grape but with different ageing.

The sensors developed have optimum repeatability and reproducibility and have been able to perfectly differentiate and discriminate all study samples.

Keywords: Sensors, biosensors, voltammetric, potentiometric, grid, flavors, juice, wine, grape, ageing, discrimination.

Abreviaturas y acrónimos

GOx: Glucosa Oxidasa

Tyr: Tirosinasa

CV: Voltametría cíclica

Gluta: Glutaraldehído

TiNP's: Nano partículas de Titanio

NiP's: Nano partículas de Níquel

CeP's: Nano partículas de Cerio

PCA: Análisis de componentes principales

PLS: Regresión de mínimos cuadrados parciales (siglas en inglés)

LDA: Análisis de discriminación lineal (siglas en inglés).

MLR: Regresión lineal múltiple.

Jv: Vino Joven

Cr: Vino crianza

Rv: Vino reserva

Grv: Vino gran reserva

REDOX: Reacción de reducción-oxidación

Gr: Uva garnacha

Temp: Uva tempranillo

TT: Uva tinta de Toro

Men: Uva mencia

CPE: Electrodo de pasta de carbono

LE: Lengua electrónica

WE: Electrodo de trabajo (Working electrode)

RE: Electrodo de referencia (Reference electrode)

AE: Electrodo auxiliar (Auxiliary electrode)

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivos	3
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	5
2.1. Sensores químicos	5
2.1.1. Concepto de sensor químico.....	7
2.1.2. Sensores electroquímicos.....	8
2.2. Sensores voltamétricos	11
2.2.1. Voltametría.....	12
a. Descripción del proceso.....	13
b. Voltametría cíclica.....	16
2.2.2. Sensores: Electroodos de grafito	20
a. Descripción, características, funcionamiento y propiedades	21
b. Modificaciones y variaciones del sensor	23
2.2.3. Biosensores: Electroodos de grafito con enzima	24
2.3. Sensores potenciométricos	27
2.3.1. Potenciometría.....	28
a. Descripción del proceso.....	29
2.3.2. Propiedades y funcionamiento de los sensores potenciométricos	31
2.4. Aplicación de los sensores en la industria de la alimentación.	32
CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.1. Preparación de sensores y biosensores de grafito voltamétricos	37
3.1.1. Materiales utilizados.....	37
3.1.2. Preparación de la pasta	40
3.1.3. Fabricación de los electrodos	41
3.1.4. Enzimas utilizadas para la fabricación de biosensores	44
3.1.5. Mejoras del proceso.....	47
3.1.6. Ensayos voltamétricos	48
a. Elementos utilizados.....	48
b. Disoluciones utilizadas	56
c. Voltametría cíclica.....	58
3.2. Diseño y preparación de sensores potenciométricos.....	61
3.2.1. Materiales utilizados.....	61

3.2.2. Tipos de membranas	64
3.2.3. Fabricación de los electrodos	68
3.2.4. Mejoras de la lengua potenciométrica	70
3.2.5. Ensayos potenciométricos	71
a. Elementos utilizados.....	71
b. Disoluciones utilizadas	76
c. Potenciometría.....	78
3.3. Análisis quimiométrico	82
3.3.1. PCA.....	83
3.3.2. LDA.....	83
3.3.3. PLS	84
3.3.4. MLR.....	84
3.3.5. Funcionamiento de trabajo de los métodos PLS y MLR	85
CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	87
4.1. Características y acondicionamiento de los sensores	87
4.1.1. Voltamétricos	88
a. Ensayos en KCl	88
b. Ensayos en Ferro-ferri.....	90
4.1.2. Potenciométricos	91
a. Ensayos en KCl	91
b. Mediciones para diferenciación de cinco sabores	94
I. Dulce	94
II. Salado.....	94
III. Ácido	95
IV. Amargo.....	95
V. Umami.....	95
4.2. Análisis en zumos lácteos	97
4.2.1. Sensores voltamétricos	98
a. Respuesta de los sensores en zumos	98
b. Discriminación mediante PCA.....	104
c. Correlaciones con los datos químicos, PLS	107
d. Efecto de envejecimiento.....	109
4.2.2. Sensores potenciométricos	116
a. Respuesta de los sensores en zumos	117

4.3. Análisis en distintas variedades de vinos.....	118
4.3.1. Sensores voltamétricos.....	119
a. Respuesta de los sensores en vinos	120
b. Discriminación mediante PCA.....	129
c. Correlaciones con los datos químicos, PLS	132
4.3.2. Sensores potenciométricos	136
a. Respuesta de los sensores en vinos	137
b. Discriminación mediante LDA.....	139
c. Correlación con los datos químicos, MLR	141
4.3.3. Correlación entre los sensores voltamétricos y los potenciométricos	144
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y POSIBILIDADES FUTURAS.....	145
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....	147

Índice de figuras

Figura 1. Funcionamiento de un sensor químico.....	8
Figura 2. Montaje celda electroquímica voltamétrica.....	12
Figura 3. Electrodo de referencia.....	14
Figura 4. Contraelectrodo (AE).....	14
Figura 5. Potenciostato conectado a celda electroquímica.....	15
Figura 6. Voltamograma.....	16
Figura 7. Señal del potencial aplicado en función del tiempo en VC.....	17
Figura 8. Voltamograma de VC.	18
Figura 9. Enfrentamiento de la reversibilidad y la irreversibilidad en VC.	20
Figura 10. Sensor de pasta de carbono.....	22
Figura 11. Funcionamiento de un biosensor.	24
Figura 12. Mecanismo de catálisis enzimática.....	25
Figura 13. Estructura tirosinasa en 3D.....	26
Figura 14. Estructura glucosa oxidasa en 3D.....	27
Figura 15. Montaje celda electroquímica potenciométrica.	28
Figura 16. Dispositivo de medida de potencial.....	29
Figura 17. Esquema de una potenciometría.	31
Figura 18. Grafito.	38
Figura 19. Grafito laboratorio.....	38
Figura 20. Resina “Araldite”.	39
Figura 21. Cable de cobre.....	39
Figura 22. Vidrio de reloj.....	40
Figura 23. Balanza analítica de precisión (Precisa 125A).....	41
Figura 24. Lima y dremel.	42
Figura 25. Horno.	43
Figura 26. Papel de lija.	43
Figura 27. Desbastadora.	43
Figura 28. Sensor CPE voltamétrico.	44
Figura 29. Eppendorf.	45
Figura 30. Agitador Vortex agitando enzima.....	46
Figura 31. Micropipetas.....	47
Figura 32. Desionizador de agua.....	49
Figura 33. Matraces.....	49
Figura 34. Vasos de precipitados.	49
Figura 35. Espátula.....	50
Figura 36. Probetas.	50
Figura 37. Parafilm.	50
Figura 38. Tijeras.	50
Figura 39. Soplete.....	51
Figura 40. Polímetro.	51
Figura 41. Guantes de látex.....	51
Figura 42. Celda electroquímica.....	52
Figura 43. Electrodo de referencia.	52
Figura 44. Electrodo de trabajo.	53

Figura 45. Placa de platino.....	53
Figura 46. Cocodrilos.....	53
Figura 47. Disposición celda electroquímica.....	54
Figura 48. Potenciostato.....	54
Figura 49. Ordenador.....	55
Figura 50. Icono NOVA 1.10.	55
Figura 51. Disposición conjunto de elementos para VC.....	55
Figura 52. Disolución de KCl.....	56
Figura 53. Disolución de Buffer.	57
Figura 54. Disolución de ferro-ferri.....	57
Figura 55. Programa (Nova 1.10) para CV.	59
Figura 56. Señalización de los valores de definición de la CV.	60
Figura 57. Botón “Start”, para el inicio de la CV.....	60
Figura 58. Gráfica de CV. Sensor de grafito en disolución de KCl 0.1M.	61
Figura 59. Tubo de metacrilato con agujeros.....	62
Figura 60. Tubo con tapa.....	62
Figura 61. Cables.....	63
Figura 62. Epoxi de plata.	63
Figura 63. Pegamento de cianocrilato.....	64
Figura 64. Cloroformo.....	64
Figura 65. Soporte de los sensores.	69
Figura 66. Sensores potenciométricos sumergidos en KCl 0.1M.	70
Figura 67. Protección de cables y conector.....	70
Figura 68. Agitador magnético.....	72
Figura 69. Electrodo RE comercial.	72
Figura 70. Electrodo de trabajo potenciométrico.	72
Figura 71. Tapa celda electroquímica.	73
Figura 72. Montaje celda electroquímica sensor potenciométrico.	73
Figura 73. Multiplexor.....	74
Figura 74. Unión de los conectores.	74
Figura 75. Data logger.	75
Figura 76. Ordenador.....	75
Figura 77. Icono Software Benchlink Data Logger 3.	75
Figura 78. Disposición conjunto de elementos para potenciometría.....	76
Figura 79. Pantalla de inicio del software.	78
Figura 80. Designación de los canales de medida.....	79
Figura 81. Acceso a la configuración para la toma de medidas.....	79
Figura 82. Configuración para la toma de medidas.	80
Figura 83. Gráfico de las medidas.....	80
Figura 84. Almacenamiento de datos.....	81
Figura 85. Pasos para almacenar la información obtenida.	82
Figura 86. Icono Software Origin8.	88
Figura 87. Voltamograma de sensor de CPE en KCl.....	89
Figura 88. Voltamograma de sensor CPE en ferro-ferri.....	90
Figura 89. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en KCl.	92

Figura 90. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en KCl, repetitividad.	93
Figura 91. Gráfica de potenciometría de dos redes de sensores potenciométricos en KCl, reproducibilidad.....	94
Figura 92. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en las disoluciones de los 5 sabores.....	95
Figura 93. Icono Software IBM SPSS Statics.	96
Figura 94. Gráfica LDA 5 sabores.	97
Figura 95. Voltamograma CPE en zumo bruto.....	99
Figura 96. Voltamograma CPE en zumo diluido en KCl.	100
Figura 97. Voltamograma CPE en zumo bruto y diluido en KCl.	100
Figura 98. Voltamograma Biosensor GOx en zumo bruto.....	101
Figura 99. Voltamograma Biosensor GOx en zumo diluido en KCl.	102
Figura 100. Voltamograma biosensor de GOx en zumo bruto y diluido en KCl.	102
Figura 101. Voltamograma sensor CPE sin modificar y biosensor de GOx en zumo bruto.....	103
Figura 102. Voltamograma sensor CPE sin modificar y biosensor de GOx en zumo diluido en KCl.	103
Figura 103. Icono Software MATLAB R2014b.	104
Figura 104. PCA en 3D zumos bruto con sensor CPE y biosensor GOx.	105
Figura 105. PCA en 3D zumos diluido con sensor CPE y biosensor GOx.....	106
Figura 106. Icono Icono Software Unscrambler X.....	107
Figura 107. PLS zumos correlación con todos los parámetros	108
Figura 108. Voltamogramas sensor CPE sin modificar zumos en bruto OD y envejecidos (4D).	110
Figura 109. Voltamogramas sensor CPE sin modificar zumos diluidos en KCl OD y envejecidos (4D).	111
Figura 110. Voltamogramas biosensor GOx zumos en bruto y diluidos en KCl envejecidos (4D).	111
Figura 111. Voltamogramas sensor CPE y biosensor GOx zumos en bruto envejecidos (4D).	112
Figura 112. PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras zumo C y P en bruto, OD y 4D.	113
Figura 113. PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras zumo C y P diluidas en KCl, OD y 4D.....	115
Figura 114. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en zumo lácteo (muestras C y P).....	117
Figura 115. Voltamograma vinos jóvenes sensor CPE.	120
Figura 116. Voltamograma vinos jóvenes biosensor GOx.	121
Figura 117. Voltamograma vinos jóvenes biosensor Tyr.	123
Figura 118. Voltamogramas vinos jóvenes por separada con sensor CPE, biosensor GOx y biosensor Tyr.....	124
Figura 119. Voltamograma vinos envejecidos sensor CPE.....	125
Figura 120. Voltamograma vinos envejecidos biosensor GOx.....	126
Figura 121. Voltamograma vinos envejecidos biosensor Tyr.	127
Figura 122. Voltamogramas vinos envejecidos por separada con sensor CPE, biosensor GOx y biosensor Tyr.	128

Figura 123. PCA red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr) muestras vinos jóvenes.	129
Figura 124. PCA red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr) muestras vinos envejecidos.....	131
Figura 125. PLS vinos jóvenes correlación con todos los parámetros.....	134
Figura 126. PLS vinos envejecidos correlación con todos los parámetros	135
Figura 127. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en vinos jóvenes.	137
Figura 128. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en vinos envejecidos.....	138
Figura 129. Gráfica LDA vinos jóvenes.....	139
Figura 130. Gráfica LDA vinos envejecidos.	140
Figura 131. MLR vinos jóvenes correlación con la acidez.....	142
Figura 132. MLR vinos jóvenes correlación con el grado alcohólico.....	142
Figura 133. MLR vinos envejecidos correlación con la acidez.	143
Figura 134. MLR vinos envejecidos correlación con el grado alcohólico.	143

Índice de tablas

Tabla 1. Plastificantes.	65
Tabla 2. Aditivos.....	66
Tabla 3. Cantidades experimentales de los componentes de las membranas.....	67
Tabla 4. Porcentaje componentes en PCA zumos en bruto sensor CPE y biosensor GOx.....	105
Tabla 5. Porcentaje componentes en PCA zumos diluidos en KCl sensor CPE y biosensor GOx.....	107
Tabla 6. Valores PLS en zumos.....	109
Tabla 7. Identificación números PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras de zumos en bruto C y P, OD y 4D.....	114
Tabla 8. Porcentaje componentes en PCA zumos en bruto red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P, OD y 4D.	114
Tabla 9. Identificación números PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P de zumos diluido en KCl, OD y 4D.	115
Tabla 10. Porcentaje componentes en PCA zumos diluidos en KCl red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P, OD y 4D.	116
Tabla 11. Vinos jóvenes 4 tipos de uvas.	119
Tabla 12. Vinos envejecidos, uva tempranillo.	119
Tabla 13. Números PCA vinos jóvenes.	130
Tabla 14. Porcentaje componentes en PCA vinos jóvenes red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr).	130
Tabla 15. Números PCA vinos envejecidos.	131
Tabla 16. Porcentaje componentes en PCA vinos envejecidos red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr).	132
Tabla 17. Valores PLS vinos jóvenes.	134
Tabla 18. Valores PLS vinos envejecidos.	136
Tabla 19. Valores MLR vinos jóvenes.	143

Tabla 20. Valores MLR vinos envejecidos.	144
---	-----

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Ecuación de Nerst.	9
Ecuación 2. Conductividad.....	10
Ecuación 3. Velocidad de barrido.	17
Ecuación 4. Reacción Redox.....	18
Ecuación 5. Intensidades de VC.	19
Ecuación 6. Diferencia de potencial de VC.	19
Ecuación 7. Reacción de la oxidación de la glucosa.	27

MEMORIA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

El sector industrial de las bebidas y la alimentación en España, ha conseguido convertirse y mantenerse como el primer sector industrial en el país en facturación y como importante generador de empleo. Es un motor de crecimiento que contribuye a la riqueza y el desarrollo de la economía española.

El volumen que factura el sector supera los 93.300 millones de euros, que es el 20,5% del total de las ventas netas de la industria del país. Además aporta el 16,8% del valor añadido bruto de la industria. Representa el 2,4% del PIB de España.

Actualmente, dicho sector da el 20,2% del empleo industrial, lo que supone que 1 de cada 5 personas que trabaja en la industria lo hace en empresas del sector alimentario [1].

La incorporación de aproximadamente un millar de nuevas empresas ha contribuido a consolidar un sistema empresarial más robusto. Por tanto la estructura empresarial está integrada por 29.018 industrias de alimentos y bebidas, un crecimiento anual del 3,5%. Y con ello se ha conseguido una gran mejora del sector.

El comercio exterior del sector se ha mantenido en auge, constatando en 2017 un récord de las exportaciones que se sitúan en 30.652 millones de euros (un incremento del 9%) [2].

La industria española de la alimentación y las bebidas se ha posicionado en cuarto lugar de Europa y en octavo a nivel mundial con los datos de ventas netas.

Enfocándose en la industria vinícola, esta es cada vez más sofisticada e internacionalizada. La Unión Europea sigue encabezando el mercado mundial del vino, pero su participación en las exportaciones ha disminuido considerablemente. La industria del vino en la actualidad se enfrenta a una variedad de desafíos.

Por tanto, el sector de la alimentación y las bebidas y concretamente el vinícola, dada su gran trascendencia, sufre la rigurosa legislación para que al consumidor le llegue un producto libre de fraude. El sector y las empresas para seguir liderando el mercado y cumplir con la ley, optan por la implementación de nuevas tecnologías [3] como métodos rápidos, eficientes y económicos que posibilitan examinar la calidad de los alimentos y bebidas.

Aunque ya existen técnicas de análisis punteras que están en pleno uso como es el caso de la cromatografía de líquidos (HPLC) y de gases, análisis físico-

químico, análisis microbiológico, muchas de ellas no pueden ser plenamente mecanizadas, por tanto, conllevan una pérdida mayor económica y de tiempo, que si existiese un análisis más sencillo y rápido. Además, los equipos para llevar a cabo estas técnicas son muchos de ellos de alto valor económico.

Por tanto, para examinar la calidad, el sabor y los parámetros que debe cumplir un alimento o una bebida se necesita un instrumento que permita mediciones in-situ y sea fácil de mover, mida eficientemente, es decir que los resultados tengan una repetitividad y reproducibilidad y que sea económico.

Los sensores voltamétricos de pasta de carbono cumplen estos requisitos, ya que son sensores portátiles y de tamaño pequeño, cuya fabricación es rápida y poco costosa. Con este sensor se obtiene una repetitividad y reproducibilidad elevada y los resultados se obtienen de forma rauda, eficiente y económica. Con estos sensores se podrá conocer rápidamente si dicho alimento o bebida está dentro de los parámetros correctos que debe cumplir.

Por otro lado, la lengua potenciométrica, son también sensores de bajo coste económico, pero conlleva mayor tiempo para su preparación, son sensores que dan medidas precisas y con muchos resultados fiables. Este sensor tiene la ventaja de que puede diferenciar entre sabores. Es de tamaño pequeño y portátil. Se obtiene una repetitividad y reproducibilidad elevada y discrimina bien los diferentes compuestos que contiene el alimento. El consumo de energía es muy pequeño. Dan medidas muy rápidas con lo que resultan muy útiles para el control de calidad y seguridad de los alimentos y las bebidas. Estos sensores han dado muy buenos resultados y por tanto lleva a concluir que una buena viabilidad en zumos, vinos y leches. Se han probado en estos alimentos ya que tienen una composición compleja por lo que se deduce que el sensor es óptimo con los resultados obtenidos.

Este Trabajo Fin de Grado (TFG), se ha llevado a cabo en el Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid (UVa), dirigido por la profesora Ana Cristina García Cabezón, en colaboración con el Departamento de Química Física y Química Inorgánica, y dentro del grupo de investigación UVaSens. En el grupo se llevan a cabo numerosas investigaciones sobre sensores de utilidad en el sector agro-alimentario. En este TFG se han diseñado dos tipos de redes de sensores que se han probado en zumos y en vinos a la par que en otro TFG se han utilizado para el análisis y discriminación de productos lácteos.

1.2. Objetivos

El objetivo principal del proyecto es llevar a cabo el diseño y puesta a punto de distintos tipos de sistemas de sensores que conformen lenguas electrónicas que se pueden utilizar de forma sencilla y rápida en el control de calidad de productos alimentarios, a un precio competitivo.

Otro objetivo fundamental de este proyecto es comprobar la fiabilidad de los resultados obtenidos por nuestros sistemas y para ello se establecerán las oportunas correlaciones con los datos químicos utilizando programas de análisis estadístico, para concluir no sólo su capacidad de discriminación sino también su capacidad de predecir y conocer los datos químicos que nos permitan caracterizar y controlar la calidad de nuestros productos.

Los objetivos concretos para proceder a realizar esta investigación:

1. Diseño de sensores voltamétricos de pasta de carbono con resina “Araldite”, que consigan tener una repetitividad y reproducibilidad en las medidas.
2. Medir distintas disoluciones para la puesta a punto de los sensores y poder probarlos seguidamente en distintos zumos y vinos para comprobar que los sensores diferencian en los productos alimentarios elegidos.
3. Tratar los datos obtenidos de las medidas de la red de sensores voltamétricos con “Matlab” para conseguir las PCA’s (Análisis de componentes principales), para observar como discriminan los sensores entre los distintos zumos y los distintos tipos de vinos.
4. Uso del programa informático “Origin” para representación y estudio comparativo de los resultados voltamétricos y potenciométricos registrados en los distintos productos.
5. Tratamiento de datos con el programa estadístico “Unscramble”, para relacionar las medidas obtenidas con los datos químicos de los productos alimentarios.
6. Diseño de una lengua electrónica potenciométrica, con distintas membranas que registran el potencial a circuito abierto en el medio de medida.
7. Puesta a punto de la lengua electrónica potenciométrica, para comprobar su repetitibilidad y su reproductibilidad.

8. Mediciones de zumos y vinos con la lengua electrónica potenciométrica diseñada. Y en cinco sabores para su diferenciación.
9. Tratamiento de datos de los sensores potenciométricos en dos programas estadísticos:
 - a. Para la comprobación de la discriminación de los distintos productos con el sensor, utilización del programa “IBM SPSS”.
 - b. Para relacionar las medidas obtenidas con los datos químicos, se empleará el programa estadístico “Unscramble”.
10. Correlación de los datos obtenidos y conclusión de los resultados.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En este capítulo se incluirá la descripción teórica de este proyecto. Primeramente se describirá el concepto de sensor químico y sensor electroquímico. A continuación se describirá el concepto de sensor voltamétrico y en que consiste el proceso de la voltametría cíclica y como se va a aplicar a este trabajo. Seguidamente se explicará el fundamento teórico de los electrodos que se han diseñado en la ejecución de este proyecto, en concreto los electrodos de pasta de carbono con la resina “Araldite”. Y se desarrollará el fundamento teórico de los biosensores que se han elaborado a partir de los sensores de carbono.

Asimismo se describirá el concepto de sensor potenciométrico y el concepto de lengua electrónica potenciométrica, la descripción del proceso de fabricación, su funcionamiento y sus propiedades y campo de aplicación.

Finalmente, se escribirá sobre los antecedentes de estos sensores que se han llevado ya a cabo en otros proyectos anteriores, que han ayudado a la progresión de estos en este trabajo.

2.1. Sensores químicos

Un sensor es un dispositivo que está habilitado para localizar actuaciones o estímulos externos y dar una respuesta a estos. Dichos instrumentos son capaces de transformar las magnitudes físicas o químicas (variables de instrumentación), en magnitudes eléctricas [5].

Los sensores se pueden clasificar según:

- Su principio de funcionamiento
- El tipo de señal de salida
- El rango de valores de salida
- El nivel de integración
- El tipo de variable medida

Se va a detallar cada clasificación de los sensores [6].

➤ Clasificación según el tipo de funcionamiento

- Activos: Producen señales específicas de las magnitudes a medir de manera independiente. Sin necesitar fuente de alimentación.
- Pasivos: Originan señales determinadas de las magnitudes a medir, mediante una fuente auxiliar.

➤ Clasificación según el tipo de señal que genera

- Digitales
 - Análogos
 - Temporales
- Clasificación según el rango de valores de salida
- On/Off
 - De medida
- Clasificación según el nivel de integración
- Discretos
 - Integrados
 - Inteligentes
- Clasificación según el tipo de variable física medida
- Mecánicos
 - Eléctricos
 - Magnéticos
 - Térmicos
 - Termorresistivos
 - Termoeléctricos
 - Monolíticos o de silicio
 - Piroeléctricos
 - Acústicos
 - Ultrasónicos
 - Químicos
 - Ópticos
 - De radiación
 - Laser

Además, otra clasificación que es de interés, es la de los dos grupos principales dependiendo del tipo de información que obtienen:

- Sensor físico: transforman una magnitud física (presiones, temperaturas, etc...) en magnitudes eléctricas.
- Sensor químico: perciben cambios químicos (pH, composiciones, etc...) y llevan a cabo una determinación mediante señales eléctricas.

En la realización de este proyecto se trabajó con sensores químicos, por tanto, se va a describir este tipo de sensor, su funcionamiento, clasificaciones y aplicaciones.

2.1.1. Concepto de sensor químico

Un sensor químico es un dispositivo que transforma información química en una señal eléctrica, analíticamente útil. Es capaz de dar la concentración de un componente específico de una muestra [7], [8].

Un sensor se caracteriza por sus dimensiones reducidas, robustez, facilidad de utilización y capacidad de suministrar información analíticamente fiable continuamente.

Los sensores químicos normalmente tienen dos componentes básicos conectados en serie:

- **Receptor:**
Un sistema de reconocimiento molecular. El receptor es capaz de reconocer selectivamente un determinado analito.
Como resultado de esta identificación se origina una señal primaria eléctrica, óptica, térmica o másica.
- **Transductor**
Físico-químico. El transductor es el encargado de transformar dicha señal en otra de tipo eléctrico, la cual es más fácil de cuantificar, de medir y de manipular.
La señal eléctrica producida aporta información analítica sobre la muestra, el proceso o el sistema que se está estudiando.

Los sensores químicos también se los denomina quimiosensores si el elemento de estudio se obtiene sintéticamente y biosensores si el sistema de investigación emplea un mecanismo bioquímico.

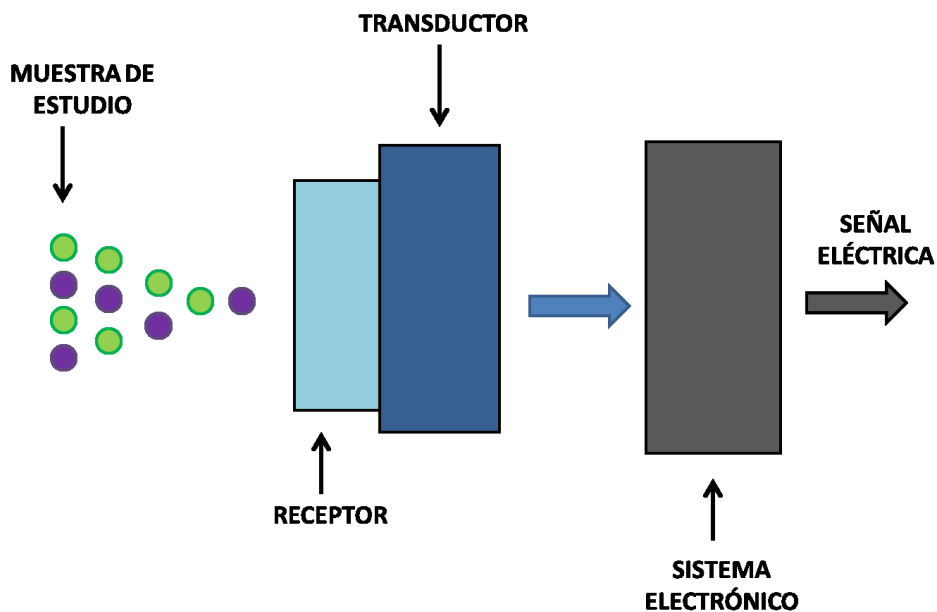


Figura 1. Funcionamiento de un sensor químico.

2.1.2. Sensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos son dispositivos simples que facilitan la etapa de adquisición de datos, son un tipo de sensores químicos, cuyos transductores son electroquímicos que transforman los efectos que se produce en la interacción electroquímica entre el analito y el electrodo en una señal útil en forma de señal eléctrica [9].

Tienen una elevada sensibilidad, son fáciles de reducir su tamaño y se asocian a dispositivos de medida sencillos, como potencióstatos o equipos de potenciometría.

Ejercen su actividad como elementos incorporados en la muestra de estudio, donde se origina la transferencia de cargas entre la sustancia que se quiere examinar y dicho sensor.

Para llevar a cabo este proyecto se ha optado por los sensores electroquímicos ya que en algunos casos se ha tenido limitadas cantidades de analito para realizar el estudio, con este tipo de sensores no se requiere una instrumentación compleja. Además la señal que se obtiene es inmediata y al tratar los datos obtenidos, se adquieren resultados rápidamente.

Se va a investigar la correlación electroquímica entre el analito de estudio y el sensor que se va a diseñar, cuyo sensor va a medir el analito y transmitir dicha señal a un equipo electrónico para que se obtenga la señal eléctrica que se va a describir y caracterizar.

Se van a desarrollar también un tipo de sensores electroquímicos llamados biosensores electroquímicos en los que se incluye en su diseño un componente biológico que serán unas enzimas.

➤ **Tipos de sensores electroquímicos**

Existe una gran variedad de este tipo de sensores, se ha realizado una clasificación de estos respecto a su fundamento de actuación.

Estos son los tipos de sensores electroquímicos:

○ **Sensores potenciométricos:**

Son los sensores cuyo fundamento operativo se basa en la obtención de información a partir de la medida del cambio de potencial eléctrico. Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia [9], [10].

Para medir el potencial no debe circular corriente por el sistema (condición $\rightarrow I=0$ A).

La diferencia de potencial medida entre los electrodos se relaciona con la concentración del analito conforme con la ecuación de Nerst, (Ecuación 1. Ecuación de Nerst.):

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln(Q)$$

Ecuación 1. Ecuación de Nerst.

Donde:

- E: el potencial corregido del electrodo
- E° : el potencial en condiciones estandar
- R: la constante de los gases
- T: la temperatura absoluta
- n: la cantidad de mol de electrones que participan en la reacción
- F: la constante de Faraday
- Q: el cociente de reacción correspondiente

○ **Sensores amperométricos:**

Son dispositivos que se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, llamado electrodo auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica [10], se introducirán los tres en el interior de una celda electroquímica.

Dentro de este tipo de sensores se encuentran los **sensores voltamétricos**, que se obtienen variando el potencial de trabajo de forma controlada, se han diseñado en este proyecto este tipo de sensores.

○ Sensores conductimétricos:

Son los sensores que se basan en la medida de cambios de conductividad que se estimulan por el analito, se impone una tensión o corriente alterna de forma fija entre dos electrodos para determinar las conductancias y resistencias del medio de estudio. Es conveniente utilizar electrodos no polarizables [9], [10].

La conductividad matemáticamente es (Ecuación 2. Conductividad.):

$$\Lambda = \frac{k}{C}$$

Ecuación 2. Conductividad.

Dónde:

- **k:** Conductividad específica
- **C:** Concentración de iones.

La electroquímica, es un campo de la química, se estudia la transformación entre la energía eléctrica y la energía química, implican procesos de transferencia de electrones, la pérdida o la ganancia de estos. A estos procesos se los denomina oxidación y reducción, y al conjunto de ellos, las reacciones redox.

Con este tipo de reacciones se pueden medir parámetros como: el potencial, la carga y la corriente.

Estos procesos se llevan a cabo en celdas electroquímicas, que dependiendo el tipo de sensor, si mide en circuito abierto o cerrado, consta de dos o tres electrodos, que se sumergen en el medio de estudio. Estos electrodos se conectan a un potencióstato/galvanostato.

Un potencióstato es un instrumento utilizado en la electroquímica, se encarga de proporcionar una diferencia de potencial constante, que lo controla en los electrodos.

Los electrodos son conductores eléctricos utilizados para hacer contacto con una parte no metálica de un circuito.

Los electrodos que se utilizan en estas reacciones son:

- **Electrodo de trabajo (WE):** es el electrodo en un sistema electroquímico en el que está ocurriendo la reacción de interés, y sobre el cual se implanta el potencial o la corriente.

- **Electrodo de referencia (RE):** es el electrodo que tiene un potencial de equilibrio estable y conocido.
- **Electrodo auxiliar (AE):** también se le denomina contraelectrodo, es el electrodo que se utiliza para cerrar el circuito eléctrico de la celda. Solo se utiliza cuando se trabaja a circuito cerrado, por ejemplo con sensores voltamétricos.

2.2. Sensores voltamétricos

Son un tipo de sensores amperométricos, que obtienen información del analito a partir de los valores de intensidad de corriente obtenidos al aplicar un potencial que va variando de forma controlada sobre el electrodo de trabajo (WE) respecto al tiempo, en este caso los sensores voltamétricos que se han diseñado han sido con el WE de grafito, como ya se describirá más adelante. El potencial que se aplica en el WE es respecto al electrodo de referencia (RE). Además para cerrar el circuito electroquímico se completa con un electrodo auxiliar (AE) también llamado contraelectrodo, una plaquita de platino, ya que se trabaja a circuito cerrado.

Se introducen los tres en el interior de la celda electroquímica y se ponen en contacto con la disolución de estudio, por el otro extremo de los electrodos se conectan a un potencióstato/galvanostato.

Esquema del montaje de una celda electroquímica y los electrodos (Figura 2. Montaje celda electroquímica voltamétrica.):

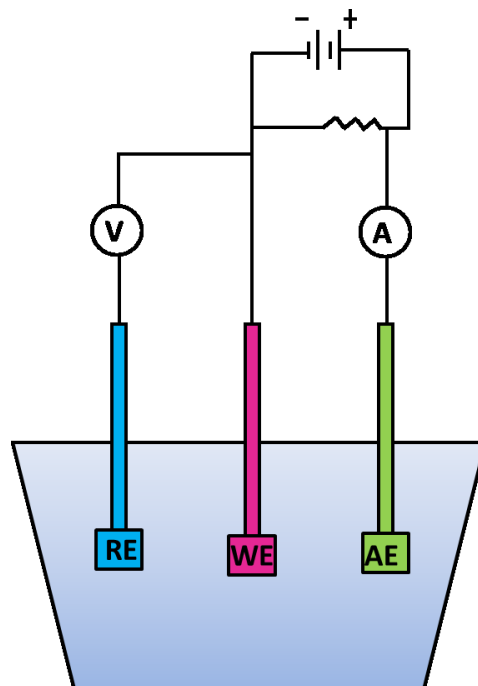


Figura 2. Montaje celda electroquímica voltamétrica.

Los valores medidos que se obtienen como resultado mediante la intensidad de corriente en función del potencial que se ha aplicado nos da una curva “corriente-potencial” y esto aporta información sobre la reacción que se lleva a cabo en el electrodo.

Los sensores voltamétricos son útiles para la detección de la composición en la solución de estudio, por su elevada sensibilidad y selectividad.

Este tipo de sensores que se han diseñado en este proyecto se han probado como ya se explicará más adelante en análisis de bebidas, como vinos y zumos.

Los gráficos obtenidos con los resultados de los datos medidos, se llaman voltamogramas y se distinguen distintos métodos según el modo de aplicar el voltaje.

Estos sensores son bastante sencillos y dan buenos resultados.

2.2.1. Voltametría

La voltametría engloba un conjunto de técnicas electroquímicas que se fundamenta en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable en la disolución de estudio [11].

a. Descripción del proceso

Este procedimiento es electroquímico, es decir se fundamenta en la oxidación y reducción del analito de estudio que se introduce en una celda electrolítica en interacción con el electrodo de trabajo (como ya se ha explicado en los apartados anteriores y se ha representado en Figura 2). Se aplica un potencial determinado en el electrodo de trabajo (WE), que es el electrodo que se va a diseñar en este proyecto.

No es necesario separar previamente los elementos que componen el analito, ya que con esta técnica se puede trabajar con concentraciones pequeñas de dicho analito, además es un procedimiento que tiene bastante especificidad que además es capaz de trabajar en mezclas complejas.

Esta técnica se lleva a cabo variando el potencial que se aplica, entre el potencial inicial y el potencial final que se quiera determinar (como ya se ha descrito con anterioridad). Se obtiene como información la intensidad de corriente que resulta con la variación del potencial. Dicha información se suscribe como un voltamograma, que es un gráfico donde se representa enfrentada la intensidad de corriente medida en función del voltaje que se va aplicando.

El objetivo de esta técnica es poder detectar una especie electroactiva que se encuentre en un electrolito.

El procedimiento se lleva a cabo en una celda electroquímica, donde se introducen tres electrodos, el electrodo WE, RE y AE, y una disolución que es la que se quiere estudiar. Esto se representó anteriormente en la Figura 2. Montaje celda electroquímica voltamétrica.. Se aplica una diferencia de potencial, el cual es variable, entre el electrodo que se va a diseñar en este trabajo, que es el electrodo de trabajo (WE), y un electrodo de referencia (RE).

En este trabajo el electrodo de trabajo se va a diseñar como se explicará más adelante de pasta de carbono, obteniéndolo mediante una técnica sencilla, mezclándolo con una resina llamada “Araldite”.

El electrodo de referencia utilizado es Ag/AgCl. En la Figura 3. Electrodo de referencia.se esquematiza:

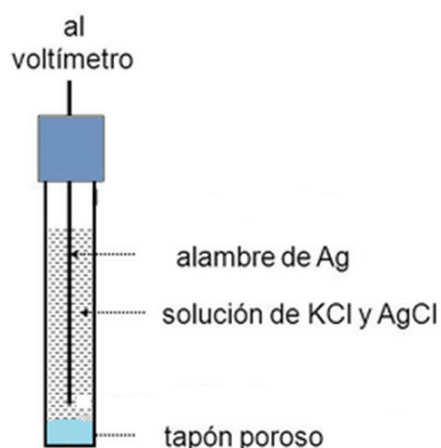


Figura 3. Electrodo de referencia.

El electrodo de referencia (RE) se compone de un hilo de plata que está rodeado de una disolución de cloruro de plata (AgCl), esto a su vez se aloja en una disolución de cloruro potásico (KCl) de concentración 0.1M .

El cometido del RE es medir la diferencia de potencial existente entre él y el WE, con el potencial constante al que se encuentra el RE.

Además como en la voltametría se trabaja a circuito cerrado, se necesita un tercer electrodo que se le denomina electrodo auxiliar (AE) o contraelectrodo como se ha mencionado con anterioridad en los apartados anteriores.

El AE tiene que ser de un material conductor que transmita la corriente desde la fuente al WE, por medio del analito. En este trabajo se ha trabajado con una placa de platino, que se sujetaba con unas pinzas, cuyo otro extremo se conectaba con el potencióstato. En ningún caso las pinzas pueden estar en contacto con la solución de estudio, pues los datos podrían estar alterados.

En la siguiente Figura 4. Contraelectrodo (AE). se puede ver un esquema del electrodo auxiliar:

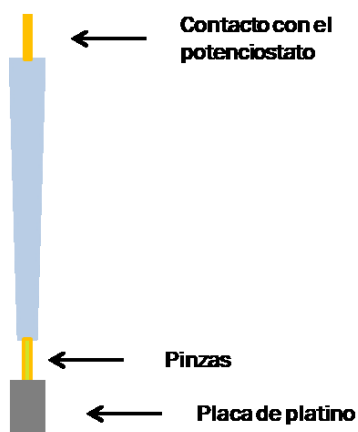


Figura 4. Contraelectrodo (AE).

Existe un momento en el que se llega a un potencial, para el que se ocasiona una reacción redox (reducción-oxidación) de un componente que se encuentra en la solución de estudio. En ese momento, se origina un incremento de la intensidad notable, y se observa en la respuesta que se obtiene en el gráfico (voltamograma).

Como ya se ha ido explicando con anterioridad los tres electrodos (WE, RE y AE), por uno de sus extremos van conectados a un potenciostato.

Un potenciostato es un dispositivo que actúa como fuente que aporta una diferencia de potencial constante y lo mantiene, ya que puede controlar esta diferencia entre uno o más electrodos de trabajo (WE), tomando como punto de referencia el voltaje en el electrodo de referencia (RE) y corrigiendo las variaciones mediante el control de la corriente en el electrodo auxiliar (AE). Además va midiendo la intensidad de corriente producida en el proceso [12].

Seguidamente se muestra en la Figura 5. Potenciostato conectado a celda electroquímica. una fotografía de un potenciostato como el que se ha utilizado en este trabajo conectado a una celda electroquímica a través de los electrodos:



Figura 5. Potenciostato conectado a celda electroquímica.

Una vez que el potenciostato ha obtenido los datos, este va conectado a un ordenador en el cual se instala un software que consigue registrar los voltamogramas como el de la Figura 6. Voltamograma., que son los registros gráficos de la variación de voltaje frente a la intensidad aplicada o al tiempo, [13].

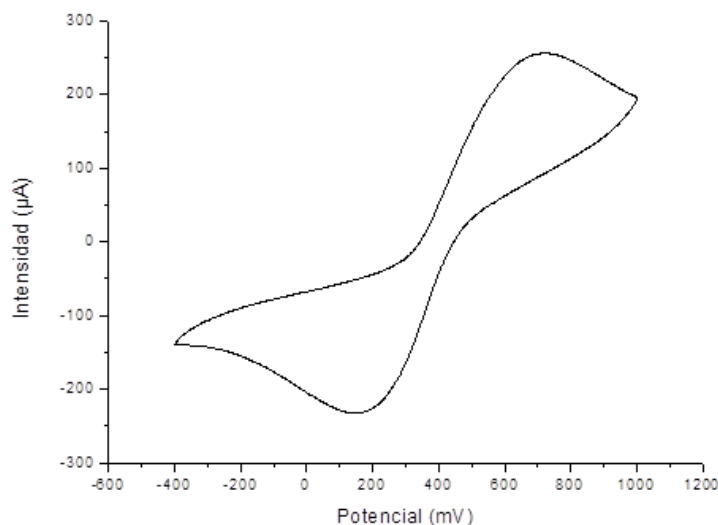


Figura 6. Voltamograma.

Dependiendo de cómo se realice el barrido del potencial durante la técnica, hay distintos tipos de voltametrías, [11]:

- Voltametría de barrido **lineal**
- Voltametría de **onda cuadrada** (OC)
- De **pulso diferencial** (VPD)
- Voltametría **cíclica** (VC)
- Voltametría de **redisolución**

En este proyecto se ha utilizado la voltametría cíclica como técnica de ensayo, para obtener los resultados del sensor expuesto a cada uno de los analitos. Por tanto en el siguiente apartado se va a desarrollar más a fondo en que consiste este tipo de técnica voltamétrica.

b. Voltametría cíclica

La voltametría cíclica (CV) es un procedimiento que se basa en el suministro de un potencial en el electrodo de trabajo (WE) y este cambia a medida que pasa el tiempo. La variación de potencial, es decir que se aplican distintos potenciales, en el electrodo de trabajo que está estacionario colocado en la disolución de estudio, provoca que la medida recogida por el potenciostato y tratada por el software del ordenador, sea una señal de forma triangular.

El primer potencial que se aplica se le denomina E_0 , normalmente tiene un valor donde la corriente posee un valor despreciable, y varía linealmente (se ejecuta un barrido lineal de potenciales donde la velocidad de barrido es constante), hasta el potencial final que se determina, al que se le llama E_f . Cuando se ha alcanzado este valor, el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original que es E_0 , los potenciales donde ocurre la inversión se denominan potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio seleccionado para un ensayo, es el en el que ocurre la oxidación o reducción de uno o más compuestos. La dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva, según el análisis que se quiera realizar. Este ciclo se puede repetir todas las veces que se desee [11].

A continuación se muestra en la Figura 7. Señal del potencial aplicado en función del tiempo en VC., una imagen del barrido lineal:

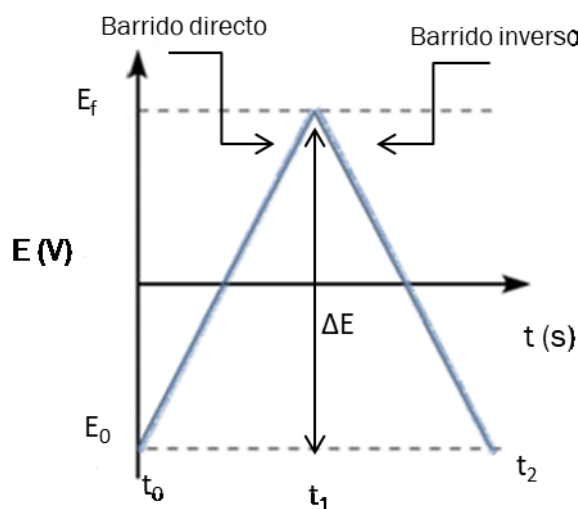


Figura 7. Señal del potencial aplicado en función del tiempo en VC.

Donde la velocidad de barrido se corresponde con la Ecuación 3. Velocidad de barrido.:

$$v = \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

Ecuación 3. Velocidad de barrido.

En el recorrido del intervalo de potencial de E_0 a E_f , se produce la reacción redox (oxidación-reducción). Si en los potenciales elegidos no se produce esto, se amplían los valores de estos para que ocurra lo descrito.

Así pues el voltamograma puede quedar como el ejemplo que se proporciona a continuación (Figura 8. Voltamograma de VC.), sabiendo que las

intensidades que se implantan, las positivas corresponden al ánodo, mientras que las negativas pertenecen al cátodo (según convenio).

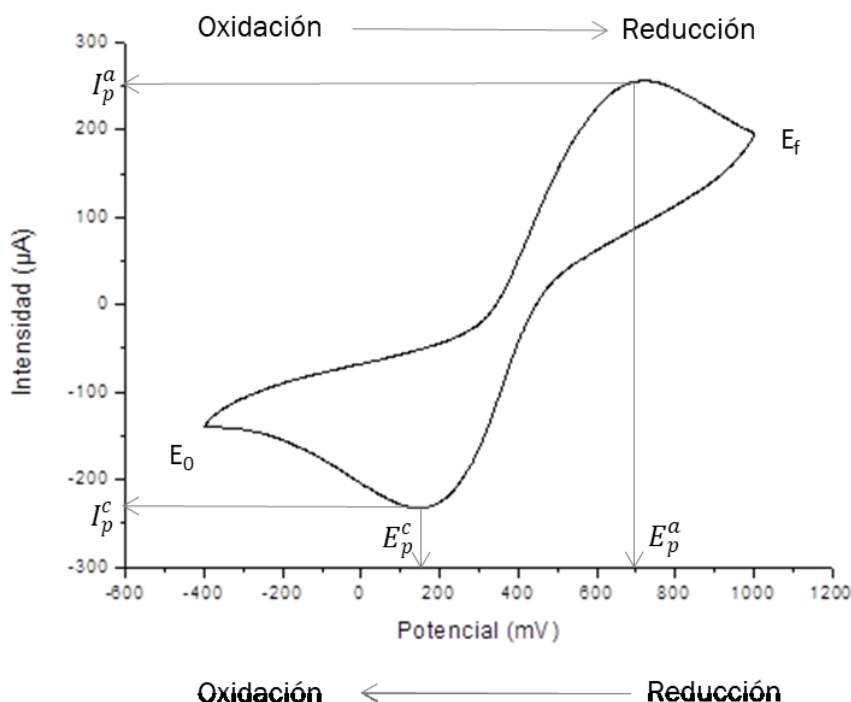


Figura 8. Voltamograma de VC.

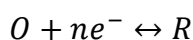
Los picos visualizados en el voltamograma representan los puntos de oxidación-reducción del compuesto que se está estudiando. Cuando el pico es de oxidación se originan intensidades positivas y al contrario, cuando el pico es de reducción se producen intensidades negativas. Esto es una característica del analito.

Para hacer un estudio por primera vez con la voltametría cíclica, se comienza realizando experimentos cualitativos para entrenar al sistema y seguidamente los experimentos cuantitativos para poder obtener los parámetros que se desean [11].

○ Reversibilidad e irreversibilidad de la VC.

Un aspecto relevante en la voltametría cíclica es la reversibilidad o irreversibilidad de las reacciones redox (oxidación-reducción).

Las reacciones redox siguen la Ecuación 4. Reacción Redox.:



Ecuación 4. Reacción Redox.

Un proceso de voltametría cíclica es reversible cuando se ejecuta el barrido inverso del potencial, existe un desplazamiento mediante las posiciones de equilibrio y se reduce el producto de la electrólisis (en este caso R, según la Ecuación 4, y se produce componente inicial (es decir, O).

En la Figura 8. Voltamograma de VC., se observa como es la respuesta de una voltametría cíclica con reacción redox reversible. Donde vemos indicados los parámetros que se corresponden con:

- $E_p^c \rightarrow$ Potencial del pico catódico
- $E_p^a \rightarrow$ Potencial del pico anódico
- $I_p^c \rightarrow$ Intensidad del pico catódico
- $I_p^a \rightarrow$ Intensidad del pico anódico

Para que un proceso sea reversible se tienen que cumplir los siguientes requisitos:

- Las intensidades (I_p^c e I_p^a), son iguales ya que:

$$\frac{I_p^a}{I_p^c} = 1$$

Ecuación 5. Intensidades de VC.

- La diferencia de potencial entre los picos:

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{59}{n}$$

Ecuación 6. Diferencia de potencial de VC.

En un sistema reversible la velocidad de transferencia de electrones es más grande que la velocidad de transporte de masa y el equilibrio de Nernst siempre se mantiene en la superficie del electrodo.

Si un sistema de transferencia de electrones no logra mantener el equilibrio en el electrodo la forma del voltamograma cíclico cambia y por tanto ahora es irreversible [11].

En la Figura 9. Enfrentamiento de la reversibilidad y la irreversibilidad en VC. se observa la diferencia en el voltamograma de un proceso reversible y de un proceso irreversible:

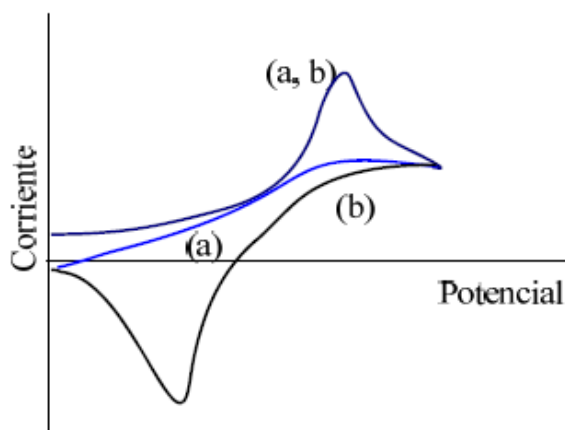


Figura 9. Enfrentamiento de la reversibilidad y la irreversibilidad en VC.

Las curvas (a) y (b) pertenecen a la señal de intensidad obtenida después de ejecutar los respectivos barridos de potencial.

La curva (b) se produce a mayor velocidad de barrido que la curva (a).

En los dos casos, el barrido de izquierda a derecha desarrolla e mismo recorrido (la parte de arriba del “pajarito”, la curva negra superior).

Pero el proceso (b) que es el más rápido perfila la curva por arriba mientras que el proceso (a) que es el más lento cuando regresa al potencial inicial, muestra un perfil distinto que es la curva azul.

Estas diferencias son causadas por la reversibilidad o la irreversibilidad de las reacciones que ocurren en el proceso.

Cuando el proceso es irreversible el voltamograma de la voltametría cíclica puede mostrar o no mostrar el pico inverso de la oxidación o de la reducción, pero si el proceso es reversible como es el caso del proceso (b) que es el más rápido, no se produce el paso irreversible, ya que habrá aumentado la velocidad de barrido y por tanto el paso inverso puede aparecer antes que el paso irreversible [14].

2.2.2. Sensores: Electrodo de grafito

Actualmente hay muchos tipos de sensores y diversos procedimientos de preparación para obtenerlos. Pero este proyecto se va a enfocar a diseñar un tipo de **sensores de grafito**. Se ha desarrollado unos sensores simples y con una elaboración sencilla para su obtención.

Se pueden utilizar con instrumentación básica y no compleja. Además, estos sensores se han diseñado con el propósito de que sean rápidos en la medida y que se puedan utilizar con una cantidad de analito reducida. Ya que en

algunos casos no se ha podido precisar de gran cantidad de analito para probarlos.

Asimismo, estos sensores diseñados han sido modificados con distintas enzimas consiguiendo así **biosensores**. Estos han sido muy útiles para conseguir determinar y discriminar unos analitos de otros al probar los sensores en los distintos productos alimentarios en los que se ha llevado a cabo el trabajo.

Con todo ello, se va a desarrollar las características, propiedades y funcionamiento de los sensores de grafito de forma teórica que se han diseñado en este trabajo y en apartados siguientes se explicará el procedimiento que se ha llevado a cabo para su fabricación.

a. Descripción, características, funcionamiento y propiedades

El diseño de sensores de pasta de carbono tiene ciertas características y propiedades que son interesantes para la fabricación de electrodos de grafito.

Como ya se ha mencionado en el previo de este sub apartado, la fabricación de estos sensores hace posible que se añadan más componentes que modifican las composición de la pasta de carbono (del grafito) y de esta forma se mejora la selectividad del sensor.

La preparación de este tipo de sensores conlleva tiempos parcialmente cortos, comparándolo con otros tipos de métodos para la obtención de estos y de otra clase de sensores.

Con los sensores que se han diseñado se puede observar que tienen buenos límites de detección comparado con otros sensores con los que se ha trabajado paralelamente.

El coste de la fabricación de estos sensores no es muy elevado, ya que necesita elementos para fabricarlos sencillos como son el grafito y la resina “Araldite”, los cuales no son componentes que tengan un coste elevado.

El sensor una vez fabricado se puede reutilizar muchas veces más, es muy difícil que se dañe y su limpieza es muy sencilla y rápida.

A continuación se va a describir la composición del sensor diseñado:

El sensor está fabricado a partir de un tubo de metacrilato hueco en su interior, tiene una medida de unos 8 centímetros que se ha cortado con esa longitud aproximadamente cada uno de ellos que se ha fabricado.

En el interior del tubo hueco de metacrilato está introducido un cable (hilo conductor de cobre) que por un extremo saldrá del tubo de metacrilato para ir

conectado directamente a la pinza que le pone en contacto con el potencióstato y por el otro lado está en contacto con la pasta de carbono.

La pasta de carbono, que como se acaba de mencionar se introduce por un extremo del tubo de metacrilato, se compone de grafito mezclado con una resina llamada “Araldite” que es un adhesivo de dos componentes, en el apartado de proceso experimental se explicarán cantidades y proporciones de cada componente que forman los sensores.

Cuando se mezclan el grafito y la resina “Araldite” se forma una pasta, la cual tiene el grafito como conductor y la resina como adherente.

El grafito es importante que sea muy puro, para ello como se explicará con más detalle en la parte de procedimiento experimental, se le deshidrata.

Seguidamente se observa en la Figura 10. Sensor de pasta de carbono. un esquema del sensor de grafito diseñado:

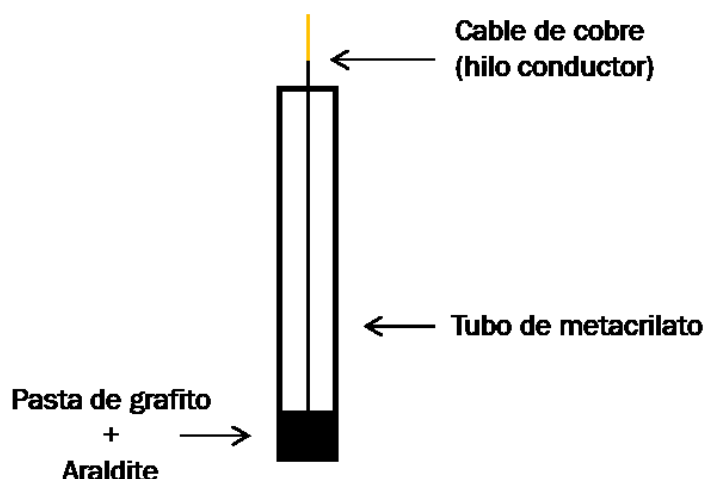


Figura 10. Sensor de pasta de carbono.

Este sensor de pasta de grafito más la resina “Araldite” que se ha diseñado en este trabajo, se ha utilizado como sensor voltamétrico. La técnica que se ha llevado a cabo para la medida del analito con este sensor ha sido la voltametría cíclica ya explicada en el apartado 2.2.1.

El sensor diseñado dentro del proceso en la celda electroquímica ejerce la función del electrodo de trabajo (WE).

Por tanto el proceso completo del diseño y funcionamiento de este sensor de pasta de carbono es el resumido a continuación:

- Primero se prepara la pasta de carbono, elaborando la mezcla de grafito y resina “Araldite”.

- Una vez obtenido la pasta homogénea, se prepara el sensor con todo lo comentado anteriormente.
- Cuando se tiene el sensor preparado para medir, se prepara la celda electroquímica con todos los elementos mencionados en el punto 2.2.1, como son el RE y el AE, trabajando el sensor diseñado como electrodo de trabajo (WE).
- Finalmente, cuando todos los elementos están conectados con el potenciómetro y este a su vez con el ordenador, el software de este consigue el voltamograma. Y éste es el resultado de los datos del analito usando la técnica de la voltametría cíclica.

b. Modificaciones y variaciones del sensor

En este apartado se van a comentar las modificaciones que se han realizado al sensor de pasta de carbono (CPE) que se ha diseñado.

Las modificaciones han hecho que el sensor sea mejor en algunos aspectos de la respuesta obtenida.

Estas modificaciones se han realizado añadiendo algunos componentes al sensor diseñado, ya que estos componentes tienen la función de mediadores electrónicos.

Las modificaciones han consistido en añadir dos tipos de enzima al electrodo y de esta forma crear biosensores.

○ **Modificaciones con enzimas**

La modificación de los sensores (CPE) que se ha llevado a cabo ha consistido en añadir una enzima en el sensor. Con esto se ha conseguido que el sensor se convierta en un biosensor. También nos hemos apoyado en cierta bibliografía para esta modificación que apoya que la adición de enzimas es un componente que mejora significativamente la respuesta del sensor.

Las enzimas que se han añadido han sido la glucosa oxidasa (GOx) y la tirosinasa (Tyr). Ambas han dado muy buenos resultados en los medios alimentarios que se las ha probado. Como ya se explicará más adelante en el Capítulo 4.

Finalmente, se concluye este sub apartado, mencionando que experimentalmente se han puesto a prueba los sensores y además de su diseño, se ha intentado su mejora con estas modificaciones mencionadas.

2.2.3. Biosensores: Electroodos de grafito con enzima

Los biosensores son un tipo de sensores químicos (y electroquímicos) a los que se les integra un componente biológico, que puede ser un ácido nucleico, un tejido, una célula, anticuerpo, un microorganismo, o como es el caso de este proyecto, una **enzima**.

El componente biológico actúa como elemento de reconocimiento y está ligado al sistema de transformación de la señal y su procesamiento, originado por la interacción entre el electrodo con la enzima y el analito.

Como resultado de la unión de la enzima y el analito se origina la variación de las propiedades físico-químicas que son detectadas por el sistema de transformación de la señal.

Resumiendo, del mismo modo que los sensores electroquímicos que se han descrito en los apartados anteriores, se ocupan de transformar una señal química en una señal eléctrica.

Los biosensores tienen las propiedades y las virtudes de los sensores químicos y además las enzimas les aportan mayor sensibilidad y selectividad, mayor efecto autocatalítico y límites de detección más reducidos. Por tanto pueden analizar soluciones con concentraciones muy pequeñas.

Además se focalizan en el analito y no interactúan con el resto de sustancias que contenga la solución.

Asimismo, pueden determinar y analizar distintos analitos simultáneamente.

Se muestra a continuación en la Figura 11. Funcionamiento de un biosensor., un esquema de cómo funciona un biosensor:

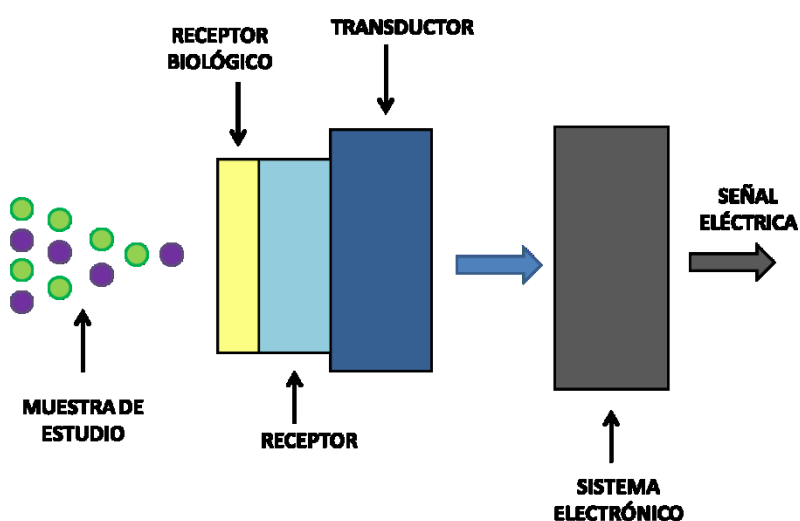


Figura 11. Funcionamiento de un biosensor.

Como en este trabajo el elemento biológico que se ha utilizado han sido las enzimas, se va a profundizar más en su explicación.

Los biosensores enzimáticos

Son los biosensores cuyo componente biológico receptor es una enzima. Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones químicas y no afectan al equilibrio de la reacción. Actúan sobre las moléculas, que son los sustratos y permiten el desarrollo de los procesos celulares [21].

El mecanismo de catalización de una enzima es el siguiente que muestra la Figura 12. Mecanismo de catálisis enzimática.:

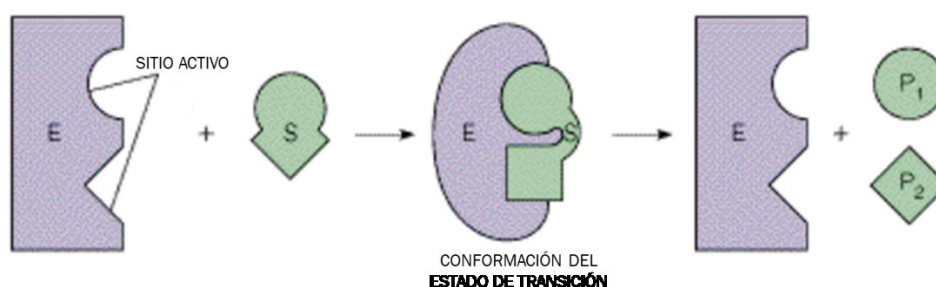


Figura 12. Mecanismo de catálisis enzimática.

Dónde:

- E es la enzima
- S es el sustrato
- E-S es el estado intermedio enzima sustrato
- P₁ y P₂ son los productos 1 y 2

Para llevar a cabo la fabricación del biosensor enzimático hay que realizar una inmovilización de la enzima que se vaya a utilizar. Consiste en situar la enzima en un área determinada, en el caso de los sensores electroquímicos de pasta de carbono diseñados en el proyecto (CPE), la enzima tiene que cubrir toda la superficie que ocupa la pasta de carbono, para que el receptor sea uno y haya errores en la medida porque haya zonas desiguales. Así se forman zonas insolubles que no se disuelven con la solución. Es la parte más importante en la fabricación del biosensor ya que si no se coloca bien la enzima, el biosensor no será fiable [18].

Este proceso puede llevarse a cabo por varias técnicas. Algunas de ellas son la deposición electroquímica de la enzima, la deposición electroforética, Layer-by-Layer (LbL) (técnica utilizada de forma relevante en mi grupo de trabajo en el laboratorio Uvasens).

La técnica que se ha llevado a cabo para construir los biosensores de este trabajo ha sido la de colocar la enzima encima de los sensores de pasta de carbono (CPE) y se ha utilizado glutaraldehído (Glu) como agente de entrecruzamiento, por tanto esta técnica se denomina Cross-linking.

Esta técnica lleva dos procesos de inmovilización, primero se adsorbe la enzima por la pasta de carbono y a continuación se produce el entrecruzamiento con el glutaraldehído.

Aunque ya se ha descrito la técnica en este apartado, en el Capítulo 3 se detallará el procedimiento experimental para fabricar el diseño.

Actualmente se dispone de una amplia variedad de enzimas que consiguen llevar a cabo un requerimiento específico.

Seguidamente, se van a describir las enzimas empleadas en este TFG, que son la glucosa oxidasa (GOx) y la tirosinasa (Tyr). Se han fabricado biosensores con estas dos enzimas ya que la combinación de ambas es ideal para analizar el contenido en glucosa y en compuestos fenólicos que es importante a la hora de identificar y diferenciar vinos y zumos que son las sustancias alimentarias en las que se aplicarán en este trabajo.

- Biosensores de tirosinasa (Tyr).

La tirosinasa (monofenol monooxigenasa) es una enzima que se ocupa de catalizar la oxidación de los fenoles. En estas reacciones el oxígeno es reducido a agua o agua oxigenada (peróxido de hidrógeno $\rightarrow$ H₂O₂).

La tirosinasa tiene la estructura molecular en tres dimensiones que muestra la Figura 13. Estructura tirosinasa en 3D.:

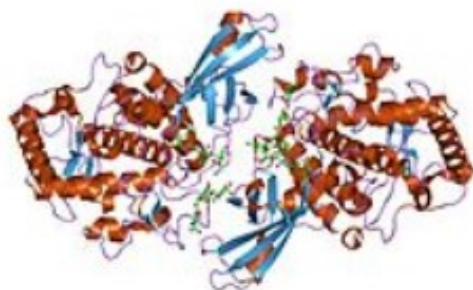


Figura 13. Estructura tirosinasa en 3D.

Al inmovilizar la enzima en la pasta de grafito y obtener el biosensor, se consiguen respuestas del sensor rápidas y estables. Además dichas respuestas son sensibles a los compuestos fenólicos y polifenólicos como los que tiene el vino (valor antioxidante de los compuestos fenólicos en el vino), que es una de las sustancias donde se van a probar este tipo de biosensores [18], [19], [20].

- Biosensores de glucosa oxidasa (GOx).

La glucosa oxidasa es una enzima oxidoreductasa encargada de catalizar la oxidación de la glucosa.

La glucosa oxidasa tiene la estructura molecular en tres dimensiones que se observa en la Figura 14. Estructura glucosa oxidasa en 3D.:

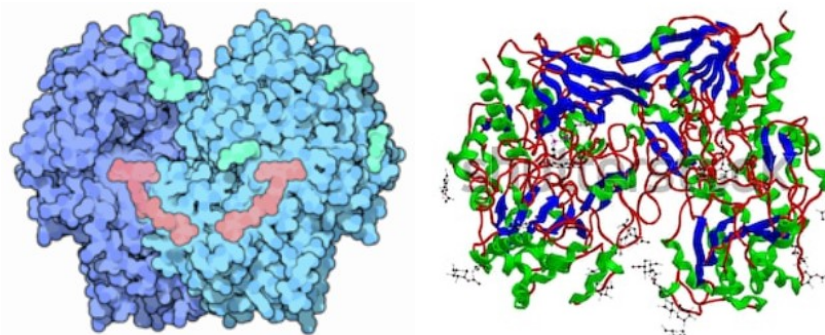
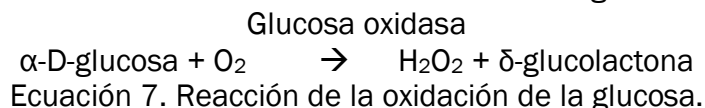


Figura 14. Estructura glucosa oxidasa en 3D.

Para catalizar la oxidación de la glucosa, que se halla en la disolución de estudio, la GOx consume el oxígeno molecular para formar δ -glucolactona y peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), la reacción sería de la forma que se expone en la Ecuación 7. Reacción de la oxidación de la glucosa.:



Donde:

- $\alpha\text{-D-glucosa} \rightarrow$ Sustrato
- $\text{O}_2 \rightarrow$ Cofactor
- Glucosa oxidasa $\rightarrow$ enzima catalizadora de la oxidación

La glucosa oxidasa es una enzima que se utiliza mucho en la industria alimentaria para determinar y cuantificar azúcares, en este trabajo se ha utilizado para determinar la $\alpha\text{-D-glucosa}$. Además es una enzima cuyo coste es bajo [23], [24].

2.3.Sensores potenciométricos

Son un tipo de sensores que obtienen información del analito a partir de la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia. Con estos sensores se trabaja a circuito abierto, contando con el electrodo de referencia (RE) y con el electrodo de trabajo (WE). Entre estos dos electrodos es donde se aplica la diferencia de potencial que es la respuesta que se quiere obtener.

Estos dos electrodos se introducen en la celda electroquímica junto con la disolución de estudio, el procedimiento consiste en trabajar a “corriente nula”, como se va a describir en los siguientes sub apartados.

Los dos electrodos se conectan por el extremo opuesto al de la celda a un dispositivo de medida de potencial que es el que va conectado al ordenador que contiene el software que va a proporcionar la respuesta gráficamente.

El esquema del montaje de una celda electroquímica con los electrodos potenciométricos es el de la Figura 15. Montaje celda electroquímica potenciométrica.:

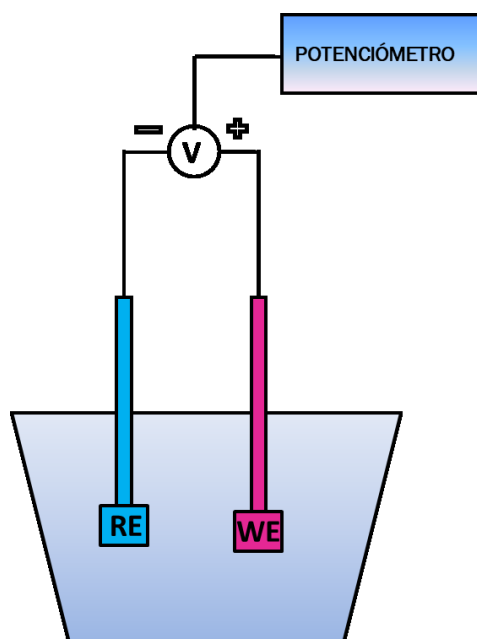


Figura 15. Montaje celda electroquímica potenciométrica.

Este tipo de sensores que se han diseñado en este proyecto se han probado como ya se explicará más adelante en análisis de bebidas, como vinos y zumos, y también como “lengua” para diferenciar 5 sabores.

2.3.1. Potenciometría

La potenciometría es una técnica electroquímica que se establece a partir de la Ecuación 1. Ecuación de Nerst., que se basa en la medida de los potenciales eléctricos en materiales o soluciones para calcular la concentración de disoluciones iónicas [25].

a. Descripción del proceso

Como se acaba de mencionar la potenciometría es una técnica que se funda a partir de la ecuación de Nernst.

Esta ecuación relaciona la diferencia de potencial entre los dos electrodos, que se van a utilizar como se describirá un poco más adelante, con la concentración del analito en la disolución de estudio.

En el apartado 2.1.2., se explicó la Ecuación 1. Ecuación de Nerst. y cada parámetro de esta ecuación.

Para esta técnica es necesario el empleo de tres elementos:

- Dispositivo de medida de potencial
- Electrodo de referencia (RE)
- Electrodo de trabajo (WE) o electrodo selectivo a iones a caracterizar.

Ahora se va a proceder a describir cada uno de los tres elementos que se emplea en esta técnica:

- Dispositivo de medida de potencial.

Es el aparato utilizado para medir el voltaje de la celda en el que se encuentran el electrodo de referencia (RE) y el electrodo indicador (WE).

Es un voltímetro muy sensible que amplifica la débil señal eléctrica que producen los electrodos, y permite lecturas de hasta 0.1 mV con considerable exactitud [25].

La Figura 16. Dispositivo de medida de potencial. representa el instrumento:

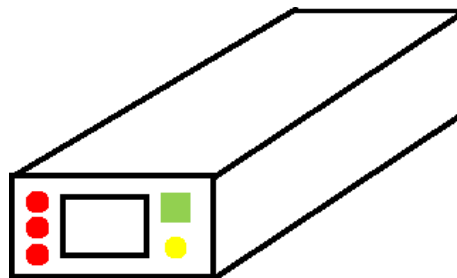


Figura 16. Dispositivo de medida de potencial.

En este trabajo se ha utilizado como dispositivo de medida un aparato llamado Data logger, que es un dispositivo electrónico cuya función es registrar los datos en el tiempo por medio de los sensores conectados externamente. Este aparato además de ir conectado a los sensores,

también estaba conectado al ordenador donde se encontraba el software que recibía y trataba los datos de este registrador.

- Electrodo de referencia (RE).

El electrodo de referencia es el que proporciona el potencial conocido y que no cambie este con la composición de la disolución de estudio, habitualmente son de doble unión o de calomelano respecto a los cuales se miden las variaciones de potencial [25].

El que se ha usado en este trabajo ha sido de Ag/AgCl. Como el que se ha usado también con los electrodos voltamétricos.

Se compone de un hilo de plata que está rodeado de una disolución de cloruro de plata (AgCl), esto a su vez se aloja en una disolución de cloruro potásico (KCl) de concentración 0.1M.

Pero también se probó un electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl. Ya que el que se usó con los voltamétricos era elaborado por nosotros en el laboratorio.

Al tomar los resultados finales con los sensores potenciométricos usamos el electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl.

El electrodo de referencia debe de ser fácil de montar.

- Electrodo de trabajo (WE) o electrodo selectivo a iones a caracterizar.

La construcción de los sensores potenciométricos depende del tipo de disolución que se quiera medir.

Los electrodos selectivos a iones son electrodos sensibles a la presencia de un tipo de ión en la disolución de estudio y posibilitan su cuantificación. Son sensibles a una familia de iones de características similares pero entre todos tiene mayor afinidad por uno de ellos en concreto [25].

Este electrodo es el que se ha diseñado en este proyecto. En el Capítulo 3 se explicará detalladamente como se ha fabricado y con qué componentes se ha realizado.

Es un electrodo que contiene membranas que se especificarán cuales son más adelante.

La membrana es responsable del reconocimiento selectivo y de la transformación del potencial generado en una señal eléctrica que se puede medir. Esto quiere decir que el receptor y el transductor están incorporados en un único elemento [25].

2.3.2. Propiedades y funcionamiento de los sensores potenciométricos

Los sensores potenciométricos miden el potencial de equilibrio termodinámico, donde no fluye corriente, es decir es igual a cero.

Seguidamente se muestra la Figura 17. Esquema de una potenciometría. el montaje de una potenciometría teóricamente:

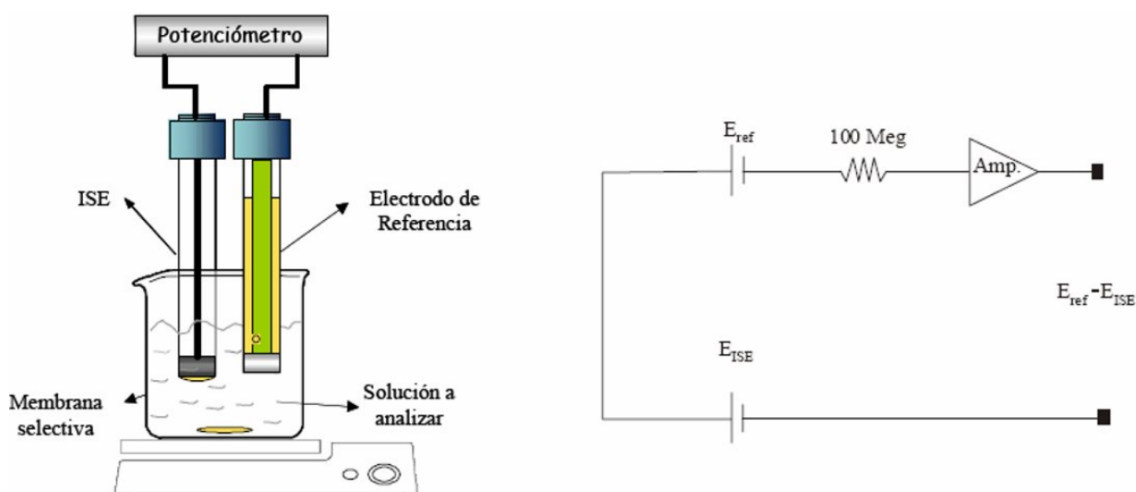


Figura 17. Esquema de una potenciometría.

Se introducen los dos electrodos (RE y WE) en la celda electroquímica con la disolución de estudio, se crea un flujo transitorio de iones en la interfase que hay entre la membrana selectiva y la solución de estudio, así se ocasiona una diferencia de potencial que depende de la cantidad de iones presente en la disolución.

La diferencia de potencial medida es el resultado de tres factores:

- La interacción entre la membrana y el analito de estudio.
- La interacción que se produce entre el elemento de referencia y el medio donde se encuentra, aportando un potencial constante suponiendo constantes la temperatura y la composición del medio.
- La unión líquida que se produce entre la disolución de estudio y la solución interna del electrodo de referencia. El RE fija su potencial con una solución de cloruro constante.

La medida de potencial que se origina en la celda electroquímica representa el cambio de potencial que se origina mediante la superficie de la membrana

del WE, y se consigue la respuesta de la concentración de iones en la disolución de estudio [25].

Dependiendo del estado de la membrana es de un tipo o de otro, en este trabajo se ha diseñado los sensores con la membrana en estado sólido.

Esta membrana está compuesta por una mezcla homogénea de polímero (PVC) que contiene un intercambiador iónico orgánico para el ión o analito a determinar. La membrana es fácil de reemplazar. La membrana no es demasiado resistente y habitualmente hay que sustituirlas [25].

Además dentro de los sensores de membrana se distinguen en si la membrana es cristalina o no lo es. En este trabajo las membranas que se han utilizado no son cristalinas. Y son del tipo de líquido inmovilizado en polímero rígido (**matriz de PVC**), y es bueno para medir nitratos y calcio.

En este trabajo se han usado 20 tipos de membranas distintas, pero las 20 membranas contienen la matriz de PVC.

Cada membrana está compuesta por PVC, más un plastificante más un aditivo.

Lo que cambia entre ellas es el aditivo y/o el plastificante que llevaba cada una de ellas.

El mecanismo de funcionamiento del sensor potenciométrico que se ha diseñado es independiente de la naturaleza o tipo de membrana que haya medido.

2.4. Aplicación de los sensores en la industria de la alimentación.

En este apartado se va a exponer los antecedentes de los sensores diseñados, es decir si se han utilizado para algún otro trabajo o prueba.

También se va a desarrollar en que se van a probar en este trabajo, en qué tipo de productos alimentarios se van a ensayar.

Y se mencionarán otras aplicaciones de este tipo de sensores en la industria.

- **Sensores voltamétricos.**

Se va a comenzar describiendo las aplicaciones de los sensores voltamétricos en este trabajo, en otros y en la industria.

- Antecedentes

Los antecedentes de estos sensores son muy amplios. Algunos de ellos que se han desarrollado en el grupo de investigación “UVaSens” con mi tutora Cristina García Cabezón son los siguientes:

La detección de antioxidantes, la discriminación de fenoles y polifenoles, la detección de azúcares. A parte paralelamente a este proyecto mi compañera Esther de Torre ha realizado un proyecto probando estos sensores diseñados

en leches. Para ver su capacidad de discriminación de distintos productos lácteos en función de su composición.

- Finalidad de este TFG

En este trabajo los sensores diseñados de pasta de carbono (CPE) y los biosensores, se van a probar en zumos con leche y en vinos.

Lo que se va a buscar en estos dos productos de alimentación va a consistir que el sensor distinga entre cada uno de ellos. Se explicará más adelante detalladamente en el Capítulo 4, habrá dos zumos con la misma composición, pero uno de ellos tiene un problema (prueba de problema-control), y el sensor CPE diseñado tiene que distinguir cuál de los dos es el zumo problema y cual el zumo control.

Seguidamente este mismo sensor y los biosensores, se utilizarán para medir los vinos. Primero en una clasificación de 4 vinos dependiendo el tipo de uva y posteriormente dependiendo de la edad del vino.

- Estado actual de los sensores

Este tipo de sensores voltamétricos se usan en análisis de laboratorio y están en fase de estudio y mejora.

- Sensores potenciométricos.

Se va a describir las aplicaciones de los sensores potenciométricos en este trabajo, en otros y en la industria.

- Antecedentes

Los antecedentes de este tipo de sensores van ligados a dos trabajos. El primero es el mencionado anteriormente, que se ha realizado paralelamente por mi compañera Esther de Torre, que ha probado el sensor en leche para distinguir las leches por su composición.

El siguiente trabajo que ha ido muy ligado a este proyecto es el del profesor **Luis A. Dias** de la “Escuela Superior Agraria de Bragança (Instituto Politécnico) ” que ha desarrollado un sistema de lengua electrónica potenciométrica similar al que se ha diseñado en este proyecto y lo ha probado en:

- Miel

Este trabajo se ha basado en probar la lengua electrónica en 52 muestras de mieles comerciales obtenidas aleatoriamente en distintas regiones de Portugal, los datos obtenidos fueron evaluados por discriminación de las muestras con programas estadísticos de multivariantes (métodos de análisis de componentes principales y discriminantes lineales). Con la lengua electrónica consiguió proporcionar una alternativa analítica para la clasificación de las mieles con respecto al tipo de polen, ya que si el análisis

es biológico requiere mucho tiempo y mano de obra cualificada. Y se concluyó que la lengua tenía una eficiencia buena [27].

- Leche

Se construyó una lengua electrónica con 36 sensores de sensibilidad cruzada, que sirvieron para la detección de la adulteración de la leche de cabra con leche bovina, un gran problema para la industria láctea. Es un nuevo método como alternativa a la metodología analítica clásica utilizada para detectar adulteraciones de leche. Es un procedimiento más sencillo, rápido y económico.

Se consiguió una alta especificidad (del 97 y 93%) y el modelo confirmó demostró su validez porque consiguió clasificar correcta e incorrectamente muestras de leche con reiteración (confirmando que no clasificaba de manera aleatoria) [28].

- Finalidad de este TFG

En este trabajo los sensores potenciométricos diseñados, se van a probar en zumos con leche y en vinos.

Lo que se va a buscar en estos dos productos de alimentación va a consistir que el sensor distinga entre cada uno de ellos. Se detallará en el Capítulo 4. Habrá dos zumos con la misma composición, pero uno de ellos tiene un problema (prueba de problema-control), y el sensor potenciométrico con sus 20 membranas distintas tiene que distinguir cuál de los dos es el zumo problema y cual el zumo control, dependiendo de la diferencia de potenciales. Seguidamente esta lengua electrónica potenciométrica, se utilizará para medir los vinos. Primero en una clasificación de 4 vinos dependiendo el tipo de uva y posteriormente dependiendo de la edad del vino. Dependiendo del vino que sea tiene que tener un potencial diferente y eso es lo que hará que el sensor distinga entre los distintos vinos.

- Estado actual de los sensores

En la industria los sensores potenciométricos se utilizan para [25]:

- Análisis de iones de procesos industriales continuos o en batch.
- Determinación de monitoreo continuo de la calidad de aire y gases contaminantes.
- Determinación de electrolitos en fluidos fisiológicos para análisis clínicos.
- Determinación de iones constituyentes den muestras de agricultura, medio ambiente y farmacia.
- Determinación del pH.
- Determinación del punto final en disoluciones ácidos, bases y redox.

Este tipo de sensores potenciométricos que se han diseñado en este trabajo, se usan en análisis de laboratorio y están en fase de estudio y mejora.

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este capítulo se incluirá la descripción del procedimiento experimental que se ha llevado a cabo en este proyecto. Primeramente se describirá el procedimiento que se ha llevado a cabo para el diseño de los sensores voltamétricos. Para ello, se explicará que materiales han sido utilizados, la preparación de la pasta de la que están formados este tipo de electrodos, la fabricación de dichos electrodos, que enzimas se han utilizado para obtener los biosensores voltamétricos, las mejoras que se han realizado al proceso y los ensayos voltamétricos que se han elaborado con este tipo de sensores.

A continuación se describirá el diseño y el procedimiento experimental que se ha realizado para la obtención de la red de sensores potenciométricos. Por tanto, se explicará los materiales usados, los tipos de membranas utilizadas para la fabricación de la lengua electrónica potenciométrica, y como se ha llevado a cabo dicha fabricación de la red de electrodos, las mejoras de la lengua potenciométrica y los ensayos potenciométricos que se han realizado con este tipo de sensores.

Finalmente, se escribirá sobre el análisis quimiométrico que se ha utilizado para analizar los resultados obtenidos de las medidas de los sensores, describiendo cada análisis que se ha utilizado para tratar los datos obtenidos, estos son: PCA, LDA, PLS, MLR.

3.1. Preparación de sensores y biosensores de grafito voltamétricos

Se han fabricado dos tipos de sensores voltamétricos: la red de sensores y biosensores voltamétricos.

Para la fabricación de ambos se ha seguido el mismo procedimiento experimental, pero para conseguir los biosensores, se parte del sensor voltamétrico y se le añade la correspondiente enzima, se detallará en los sucesivos apartados.

3.1.1. Materiales utilizados

Los materiales utilizados para la fabricación de los sensores voltamétricos de pasta de carbono (CPE) son:

- **Grafito.**

El grafito es un mineral de carbono casi puro, tiene brillo metálico y color entre gris y negro.

Procede de las rocas de carbón que han soportado metamorfismo y se extrae de las minas.

Los átomos de carbono están firmemente unidos en el plano por enlaces covalentes, conformando capas. Estas capas están apiladas paralelamente y unidas entre sí por fuerzas de Van der Waals (que son más débiles).

El grafito puede ser de dos tipos: natural o sintético [29].



Figura 18. Grafito.

Cantidades:

Para llevar a cabo la fabricación del sensor CPE, la cantidad del grafito que se va a utilizar siempre va a ser un **50% del peso total de la pasta**. Es decir, para fabricar la pasta de carbono, que se parte de que el peso total va a ser 6.4 gramos, la cantidad de grafito que se va a utilizar son **3.2 gramos**.

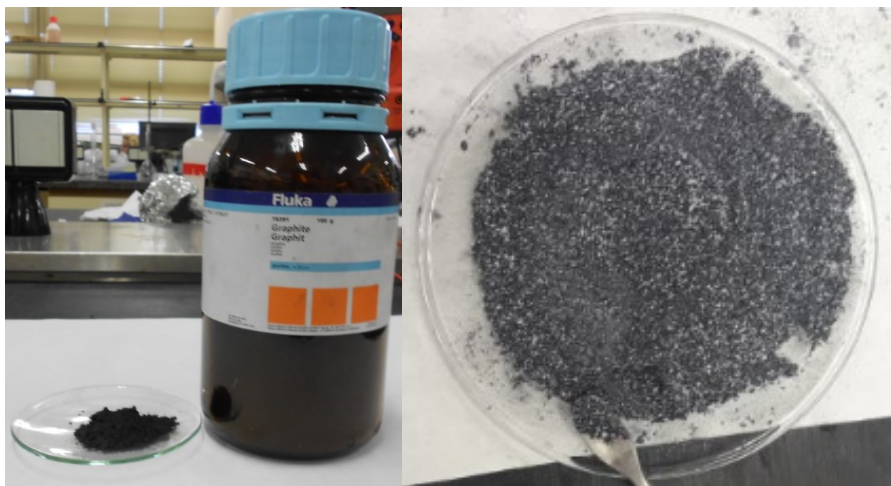


Figura 19. Grafito laboratorio.

○ **Resina “Araldite”.**

Es un adhesivo de dos componentes, una resina y endurecedor que reacciona al mezclarse. Es valiosa para unir metal, madera, piedra, cristal, porcelana y plásticos.

La resina consta de dos componentes, que se echan en diferentes momentos de la fabricación de la mezcla. El primer componente es de color transparente, el segundo componente es de color amarillento [30].



Figura 20. Resina “Araldite”.

Cantidades:

Para fabricar el sensor, la cantidad de “Araldite” que se va a necesitar es un **50% del peso total de la pasta**. Para elaborar la pasta de carbono, que se parte de que el peso total va a ser 6.4 gramos, la cantidad de “Araldite” que se va a utilizar son **3.2 gramos**. Esto quiere decir que se va a emplear 1.6 gramos del primer componente y 1.6 gramos del segundo componente del adhesivo.

○ **Cables.**

Se utiliza un cable de cobre que pone en contacto la pasta de carbono formada con la pinza que está conectada al equipo en este caso el potenciómetro.

Un requisito fundamental es que la pasta recubra bien el cable, ya que no puede estar en contacto el cable con la disolución que se vaya a medir.



Figura 21. Cable de cobre.

- **Tubos de metacrilato.**

Se usan unos tubos de metacrilato abiertos por ambos lados, por uno se introduce la mezcla y por el otro el cable que quedará en contacto con la pinza del potencióstato.

Aparte de los materiales que son componentes del sensor, se utilizan otros instrumentos necesarios para llevar a cabo la fabricación:

- Balanza analítica de precisión (Precisa 125A)
- Vidrio de reloj
- Espátulas
- Un folio de plástico
- Papel de lija
- Horno

Estos elementos se mostrarán más adelante en los siguientes apartados.

3.1.2. Preparación de la pasta

Para la preparación de la pasta de carbono se realizan los siguientes pasos:

Primeramente, se pesa el grafito en un vidrio de reloj (Figura 22. Vidrio de reloj.), con un peso de 3.2 gramos aproximadamente.



Figura 22. Vidrio de reloj.

Seguidamente, se introduce en el horno el grafito sobre el vidrio de reloj, ya que se necesita que se deshidrate para que la pureza del grafito sea mayor.

El tiempo que se mantiene el grafito en el horno es de aproximadamente 2 horas a la temperatura de 100°C. Una vez pasado ese tiempo, se saca el grafito del horno.

A continuación, se pesa la resina “Araldite”. Cogemos un pedazo de plástico y después de tarar la balanza (Figura 23. Balanza analítica de precisión (Precisa 125A)), pesamos el primer componente del adhesivo (el componente de color transparente) hasta conseguir un peso de 1.6 gramos. Rápidamente se toma otro pedazo de plástico y se pesa el segundo componente del adhesivo (el componente de color amarillento), obteniendo 1.6 gramos.

Es recomendable que el adhesivo (ambos componentes se viertan en un plástico, ya que es donde más adelante se mezclarán con el grafito y el proceso mancha en exceso, de esta forma esos pedazos de plásticos se pueden desechar).



Figura 23. Balanza analítica de precisión (Precisa 125A)

Posteriormente, dónde está contenido el primer componente del adhesivo se va vertiendo poco a poco y mezclando el grafito continuamente sin parar, hasta que se consigue una masa homogénea. Se mezcla con una pequeña espátula. Cuando se ha conseguido mezclar la totalidad de ambos productos, se tiene que obtener una especie de pelota con la textura blanda con similitud a la plastilina.

Seguidamente, donde está la pelota obtenida se va añadiendo el segundo componente en pequeñas cantidades sin parar de mezclar pero con rapidez ya que la pasta a medida que se va añadiendo este segundo componente, va endureciendo la mezcla.

Cuando se termina de añadir la totalidad del segundo componente, se obtendrá una pelota más dura que la primera obtenida. La pasta estará lista para su introducción en el tubo de metacrilato. Este proceso hay que hacerlo rápidamente ya que la pasta endurece rápidamente y cada vez más.

3.1.3. Fabricación de los electrodos

Primeramente se preparan los tubos de metacrilato, cortándolos con la medida que interese. En las fotografías que se proporcionarán posteriormente se verá el tamaño aproximado. Además por el extremo que se vaya a incorporar la pasta de carbono, se lija y se raya (como una lima o un dremel) para que tenga mayor rugosidad y así penetre más fácilmente la mezcla.



Figura 24. Lima y dremel.

Se corta con la medida adecuada el cable para dejar todo preparado antes de la realización de la pasta de carbono, ya que como se ha comentado varias veces la pasta una vez obtenida endurece rápidamente y hay que trabajar con ella rápido.

A continuación, se prepara la pasta de carbono con los pasos que se explicaron en el punto anterior (3.1.2)

Una vez obtenida la pasta de carbono, se introduce rápidamente en el tubo de metacrilato por uno de los dos extremos y se mete entre 1-2cm aproximadamente, y se introduce por el otro extremo el cable hasta que quede en contacto con la pasta de carbono, consiguiendo que esta envuelva bien el contacto del cable pero sin dejarle al descubierto con el exterior.

Una vez conseguido esto, se introduce en el **horno** durante **24 horas** a una temperatura de **50°C**, con esto se consigue que la mezcla de carbono endurezca y consiga la consistencia adecuada al solidificar totalmente.



Figura 25. Horno.

A las 24 horas se extrae del horno el sensor y se lija (en la desbastadora o con papel de lija), hasta que se obtiene una superficie lisa y brillante, sin ningún poro o agujero en la parte de la pasta de carbono.



Figura 26. Papel de lija.



Figura 27. Desbastadora.

Finalmente se puede cerrar con una gota de pegamento la otra parte del tubo de metacrilato.

De esta forma se consigue el sensor voltamétrico, que estará listo para probar y medir la señal electroquímica que aporta.

El sensor de pasta de carbono (CPE) que se obtiene es el que se observa en la Figura 28. Sensor CPE voltamétrico.:



Figura 28. Sensor CPE voltamétrico.

Con las cantidades mencionadas se obtendrán entre 2 y 4 sensores, dependiendo de la cantidad que se aloje en cada tubo, en los siguientes apartados se mencionan algunas modificaciones.

3.1.4. Enzimas utilizadas para la fabricación de biosensores

Para la fabricación de los biosensores se parte de los electrodos fabricados de pasta de carbono CPE, cuya elaboración se ha explicado en el apartado anterior 3.1.3.

Se adiciona las enzimas específicas que se han elegido y se expusieron en el Capítulo 2. El objetivo es que la enzima correspondiente reaccione con el analito que está contenido en la disolución de estudio, y de esta forma se detectará. Por tanto así se obtiene un sensor específico.

A continuación, se van a detallar las enzimas y su elaboración y el procedimiento de deposición de estas en el sensor de CPE.

Las enzimas utilizadas han sido:

- **Tirosinasa (Tyr)**

“Tirosinasa from mushroom”. Se llevarán a cabo medidas de antioxidantes con esta enzima. En este trabajo será usada para la medición de vinos.

- **Glucosa oxidasa (GOx)**

Enzima glucosa-oxidasa GOD (obtenida de *Aspergillus niger*, 168400 u/g sólido, Sigma-Aldrich).

Esta enzima se utilizará para la medida de azúcares. En este trabajo se usará para la medición de glucosa en vinos y en zumos con leche.

Procedimiento de preparación de las enzimas

Para la preparación de ambas enzimas se ha realizado el mismo procedimiento.

Primeramente se elabora la disolución tampón fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$), también llamada Buffer fosfato, es una disolución amortiguadora de concentración 0.01M y pH=7. En el apartado 3.1.6 b, se explicará cómo se realiza esta disolución.

Una vez elaborada la disolución Buffer, se dispone de 0.005 gramos de la enzima correspondiente (sólida y mantenida en un congelador) sobre un eppendorf (Figura 29. Eppendorf.).



Figura 29. Eppendorf.

Una vez introducida la cantidad de enzima en el eppendorf se adiciona 1 mL de la disolución de Buffer (0.01 M). Se consigue una concentración de 5 mg/mL. Para disolver la enzima en la disolución Buffer se agita en el agitador “Vortex” (Figura 30. Agitador Vortex agitando enzima.).



Figura 30. Agitador Vortex agitando enzima.

Una vez disuelta la enzima en la disolución Buffer, se preparan alícuotas (de 60 μ L cada una) que se almacenan en el congelador para que se conserven sus propiedades, hasta que se las vaya a colocar en el sensor para prepararle para medir las disoluciones.

De esta forma conseguimos las enzimas de tirosinas (Tyr) y de glucosa oxidasa (GOx), listas para colocar en el sensor CPE.

Procedimiento de preparación de los biosensores

Para preparar los biosensores, se parte del electrodo de pasta de carbono que se había fabricado y explicado anteriormente en el apartado 3.1.3.

Se procede a la inmovilización de la enzima, se coge el electrodo y se fija en un soporte con la parte de la pasta de carbono hacía arriba. Con una micropipeta (de 60 μ L) se coge la cantidad de enzima que se encuentra en el eppendorf.



Figura 31. Micropipetas.

La enzima se deposita encima la pasta de carbono y se deja secar, hasta que la enzima se ha absorbido por completo.

Posteriormente, se introduce el electrodo por el extremo de la pasta de carbono en glutaraldehído (Glu), ya que se va a utilizar como el agente de entrecruzamiento (técnica de Cross-linking), durante 1 minuto. De esta forma se produce el entrecruzamiento con el glutaraldehído.

Finalmente, se sumerge de nuevo en la disolución de Buffer (0.01M y pH=7), 30 segundo.

Después de este procedimiento, el biosensor está listo para medir la disolución de estudio.

3.1.5. Mejoras del proceso

Algunas posibles mejoras que se pueden realizar en los sensores voltamétricos CPE son:

- La adición de una cantidad determinada de nanopartículas (Cerío, Níquel, Titanio) a la pasta de carbono del sensor. Este proceso es una posible línea de investigación futura.
- La fabricación de biosensores a partir del sensor CPE con la superposición de enzimas en este. Con este procedimiento dependiendo de la muestra que se desee analizar se precisa la enzima

y se obtienen resultados específicos con dicha enzima. Esta mejora se ha realizado en este trabajo.

- De forma estética los sensores se pueden mejorar embelleciendo el tubo de metacrilato introduciendo algo que cubra su interior, de esta forma no se verá el interior del tubo y consecuentemente no se verá el cable.

3.1.6. Ensayos voltamétricos

Con los sensores y los biosensores ya fabricados, se va a llevar a cabo su utilización para medir y caracterizar las diferentes disoluciones y compuestos que se quieren analizar.

En este trabajo se va a entrenar el sistema con una disolución de KCl, a continuación se medirán zumos con leche y vinos.

Se van a describir los elementos usados para el procedimiento de las mediciones, las disoluciones y productos alimentarios que se quieren estudiar y las particularidades y descripción del proceso de medida.

a. Elementos utilizados

Se va a enumerar los elementos del laboratorio que son necesarios para llevar a cabo el montaje de la celda electroquímica y las mediciones que se van a llevar a cabo en el desarrollo experimental.

Material de laboratorio

- Desionizador de agua.

Agua desionizada Milli-Q de conductividad 18,2 MΩcm.



Figura 32. Desionizador de agua.

- Matraces de 50, 100, 200, 500 y 1000 mL.



Figura 33. Matraces.

- Vasos de precipitados



Figura 34. Vasos de precipitados.

- Espátulas y cucharillas



Figura 35. Espátula.

- Probetas



Figura 36. Probetas.

- Parafilm



Figura 37. Parafilm.

- Tijeras



Figura 38. Tijeras.

- Soplete



Figura 39. Soplete.

- Polímetro

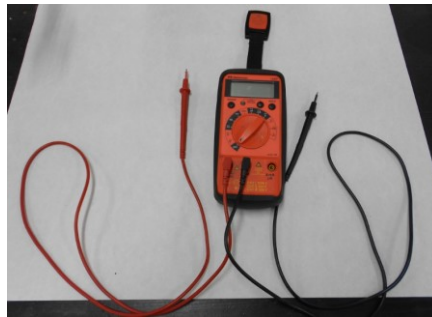


Figura 40. Polímetro.

- Guantes de látex



Figura 41. Guantes de látex.

Elementos para las mediciones

Para realizar las mediciones hay que montar una celda electroquímica y para ello se necesitan distintos elementos que son los siguientes:

- Celda electroquímica

Es el recipiente donde vamos a colocar los electrodos y donde se va a introducir la disolución de estudio.

El modelo de la celda electroquímica es → 50 mL, Princeton Applied Research.



Figura 42. Celda electroquímica.

- Electrodo de referencia (RE)

Se utilizará un electrodo de disolución $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$. Se coloca a la izquierda del electrodo de trabajo en la celda electroquímica. Está sumergido en una disolución de KCl para mantenerlo mientras no se utiliza, por tanto se enjuaga con agua desionizada antes de introducirlo en la disolución de estudio.



Figura 43. Electrodo de referencia.

- Electrodo de trabajo (WE)

Los electrodos de trabajo que se han utilizado en este tipo de procedimiento han sido los electrodos de CPE y los biosensores fabricados que se han descrito en los anteriores apartados. Se coloca en el medio en la celda electroquímica, entre el RE y el AE.



Figura 44. Electrodo de trabajo.

- Electrodo auxiliar o contraelectrodo (AE)

Como contraelectrodo, para cerrar el circuito, se ha utilizado una placa de platino que se sujeta con unas pinzas y se introduce en la celda. Antes de utilizarla hay que purificarla, por tanto, la placa de platino se quema con un soplete y se enfría con agua desionizada. Y se sujeta con las pinzas, estas nunca pueden estar húmedas o tocar la disolución ya que si eso pasa las medidas no son correctas. La posición del AE es a la derecha del WE en la celda electroquímica.



Figura 45. Placa de platino.

- Cocodrilos

Para conectar los electrodos con el potenciostato se necesitan unas pinzas. La pinza de color verde representa la toma de tierra y no se conecta a ningún electrodo, la pinza de color negro se conecta al contraelectrodo (AE), la de color rojo al electrodo de trabajo (WE) y la de color azul al electrodo de referencia (RE).

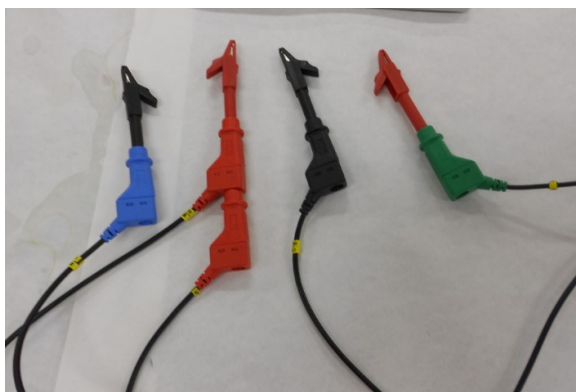


Figura 46. Cocodrilos.

Por tanto la disposición final de la celda será la que se observa en la Figura 47. Disposición celda electroquímica.:

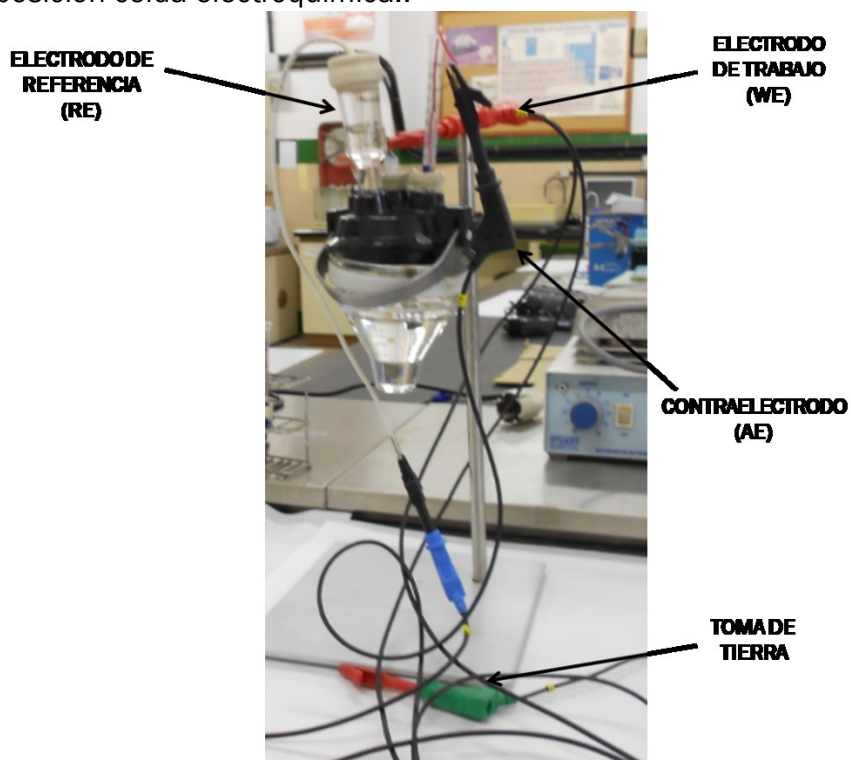


Figura 47. Disposición celda electroquímica.

▪ Potenciostato

Es el dispositivo electrónico que se utiliza para establecer y controlar el potencial de los electrodos y registrar la corriente para cada valor del potencial y los datos que registra los traslada al ordenador.

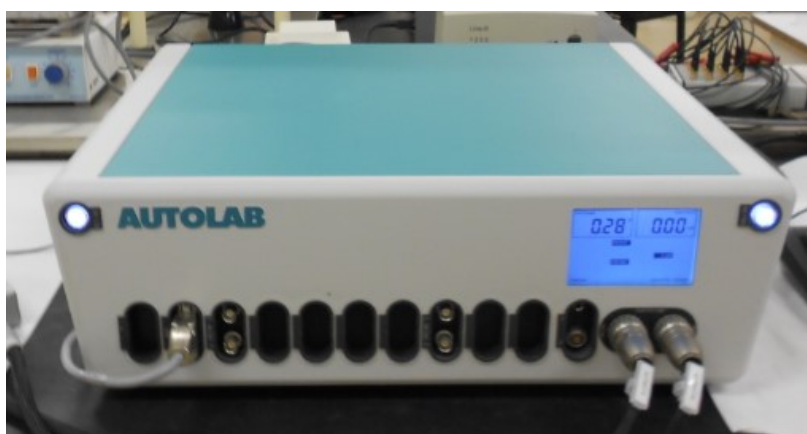


Figura 48. Potenciostato.

- Ordenador

Le llegan los datos registrados procedentes del potenciostato y con el software que tiene instalado, los trata y los procesa.

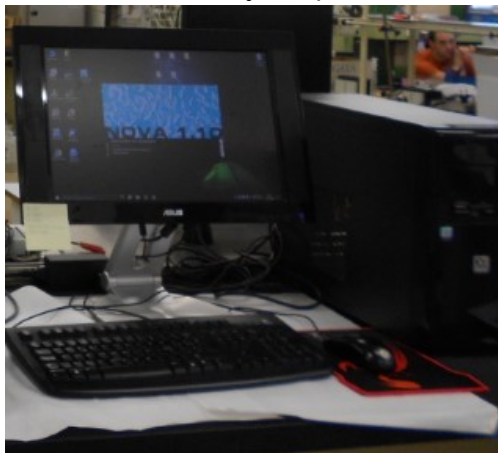


Figura 49. Ordenador.

- Software

El Software utilizado para la representación y generación de los datos registrados es el NOVA 1.10.1.9 (Metrohn autolab B.V.).



Figura 50. Icono NOVA 1.10.

Finalmente la disposición de los elementos en conjunto para llevar a cabo las voltametrías con los sensores y biosensores de CPE es la de la Figura 51. Disposición conjunto de elementos para VC.:



Figura 51. Disposición conjunto de elementos para VC.

b. Disoluciones utilizadas

Para realizar las mediciones de este trabajo, se han elegido distintas disoluciones. Vamos a mencionarlas en este apartado.

- Disolución de cloruro potásico (KCl)

Esta disolución tiene como volumen 1000 mL con una concentración de 0.1 M.

Para obtenerla se disuelven 0.7518 gramos de KCl ((CAS 120-80-9). Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) en agua ultra pura desionizada, obtenida con el desionizador de agua que mostramos en el apartado 3.1.6.a.



Figura 52. Disolución de KCl.

Los electrodos miden esta disolución y se comprueba que funcionan de manera adecuada.

Además el electrodo de referencia contiene KCl, y se prepara cuando se quiere fabricar el RE.

- Disolución de Buffer fosfato

También llamada disolución tampón fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$), es una disolución amortiguadora de concentración 0.01M y pH=7.

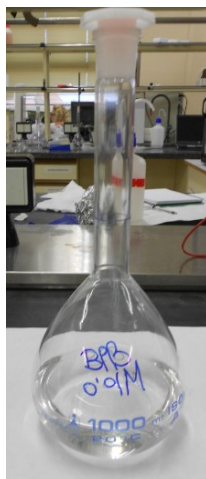


Figura 53. Disolución de Buffer.

Para obtenerla se disuelven **0.732 gramos** de Dihidrogenofosfato sódico (NaH_2PO_4 , pureza>99%, Sigma-Aldrich) y **0.54 gramos** de Hidrogenofosfato sódico (Na_2HPO_4 , pureza>99%, Sigma-Aldrich) en un matraz de volumen **1000 mL con agua desionizada**.

La disolución Buffer fosfato se utiliza en este trabajo para la preparación de las enzimas, para fabricar los biosensores, como se ha explicado en el apartado 3.1.4.

Esta solución es ideal para preparar las enzimas ya que aporta un pH neutro (pH=7).

Esta disolución se puede utilizar hasta semanas después de su preparación guardándolo en el frigorífico.

- Disolución de ferrocianuro

Esta disolución es una mezcla de Ferro-ferricianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/3}$) en KCl.



Figura 54. Disolución de ferro-ferri.

Para obtenerla, se emplea una mezcla de **0.1842 gramos de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 \cdot H_2O$ 5 mM** y **0.1663 gramos de $K_3 [Fe(CN)_6]$ 5 mM**. Y se disuelve en una **disolución de KCl 0.1 M**.

- Solución de glutaraldehído 2.5% w/w ($C_5H_8O_2$)

Esta disolución se va a utilizar para la preparación de los biosensores como se ha explicado en el apartado 3.1.4. El glutaraldehído se emplea para inmovilizar las enzimas mediante “cross-linking”. Se usa para poner en contacto los vapores con los sensores con la enzima depositada.

Se prepara adicionando **9 mL** de glutaraldehído comercial (**Glu**) ($C_5H_8O_2$, Alta Aesar) **diluido al 50%** en un matraz de **200 mL de $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$** a pH 7. Se divide en alícuotas.

Esta solución puede usarse varias veces, pero hay que cubrirla con parafilm, y mantenerla congelada.

c. Voltametría cíclica

Los sensores de pasta de carbono (modificados y sin modificar) y los biosensores que se han diseñado y fabricado en este trabajo son sensores voltamétricos, por tanto se ha llevado a cabo la técnica de la voltametría cíclica para medir las disoluciones con los sensores en los diferentes ensayos.

Los parámetros cambian según el tipo de sensor y el analito a analizar. Para llevar a cabo esta técnica se ha utilizado el software Nova 1.10.1.9 (Metrohn autolab B.V.).

A continuación se va a describir el procedimiento que se lleva a cabo en el software para obtener los resultados que se desean.

Al abrir el programa Nova 1.10 aparece la pantalla que muestra la Figura 55. Programa (Nova 1.10) para CV.:

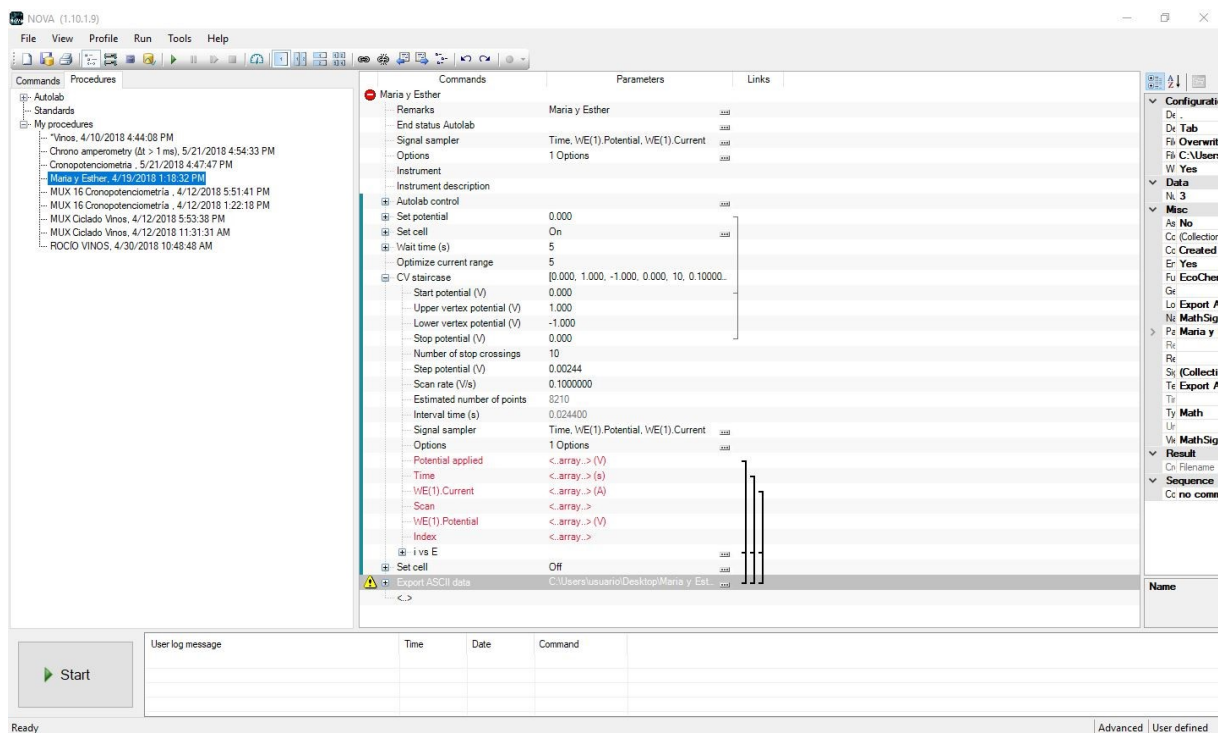


Figura 55. Programa (Nova 1.10) para CV.

Se empieza estableciendo los valores que se necesitan, que son los tres valores de potencial, el valor inicial y los valores de los extremos de la medición. También se fija el número de ciclos que se quieren ejecutar, y la dirección de la carpeta donde se quieren almacenar los datos en un “archivo .txt”.

El número de ciclos que se van a ejecutar serán la mitad del número de veces que se pasa por el punto $V=0$.

El número de ciclos que se han fijado normalmente en la mayoría de las CV que se han realizado han sido **5 ciclos**.

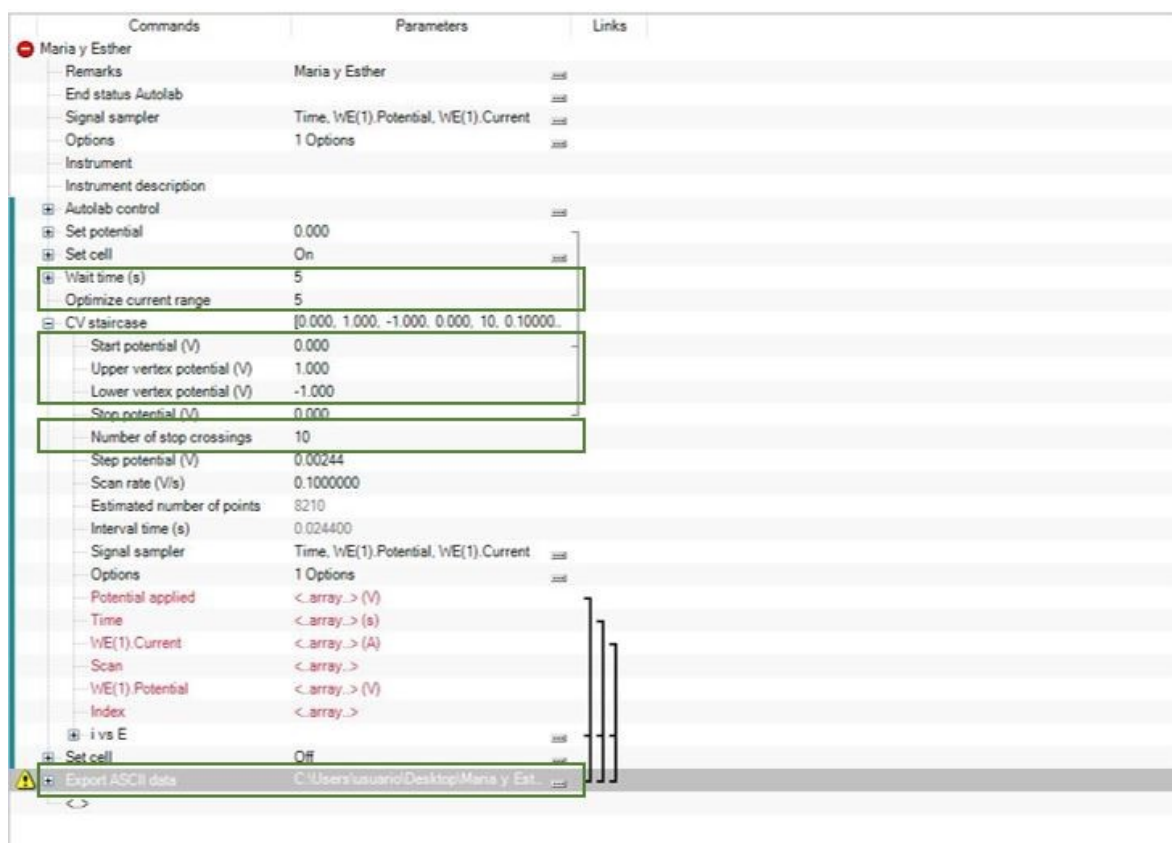


Figura 56. Señalización de los valores de definición de la CV.

Después de haber establecido los valores convenientes, se prepara y se pone a punto el montaje del circuito y cuando está todo listo, se pulsa el botón “Start” y así comienza el tiempo de estabilización, al finalizar este tiempo, empieza la voltametría cíclica (CV).

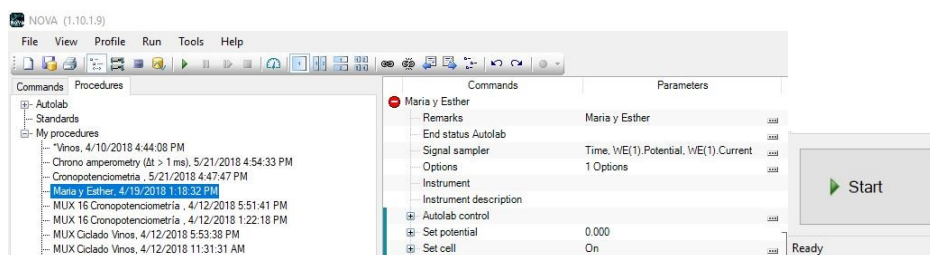


Figura 57. Botón “Start”, para el inicio de la CV.

Finalmente, cuando termina la CV, se adquiere una gráfica en el software y un archivo “.txt” con los valores de dicha gráfica para su análisis.

Un ejemplo de gráfica es la Figura 58. Gráfica de CV. Sensor de grafito en disolución de KCl 0.1M.:

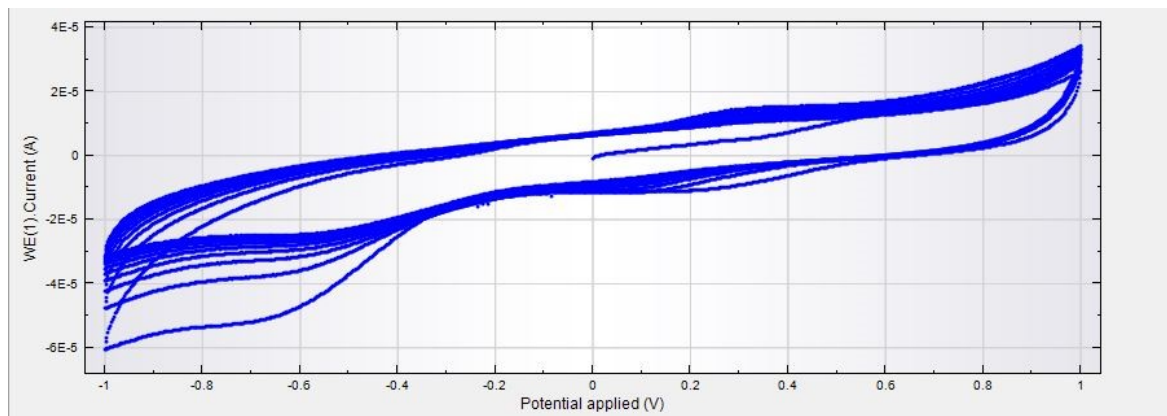


Figura 58. Gráfica de CV. Sensor de grafito en disolución de KCl 0.1M.

3.2. Diseño y preparación de sensores potenciométricos

Se ha fabricado una red de sensores potenciométricos. En este apartado se va a explicar el procedimiento experimental para la fabricación de esta red de sensores, los materiales que se han necesitado y los tipos de membranas y su elaboración. Además de las disoluciones en las que se han puesto a prueba.

3.2.1. Materiales utilizados

Los materiales utilizados para la fabricación de la red de sensores potenciométricos son:

- **Tubos de metacrilato**

Se necesitan tubos de metacrilato de diferentes diámetros. En este trabajo se han fabricado dos tubos de tamaño pequeño, dos tubos de tamaño mediano y otros dos tubos de tamaño grande.

A estos tubos, se les ha realizado agujeros a lo largo de ellos. Cuatro filas de agujeros y en cada fila 5 agujeros. Dichos agujeros se han elaborado con una broca. Los agujeros se caracterizan porque tienen una superficie en forma de cuenco esférico y en la base se encuentra el pequeño agujero.

Se adjunta una fotografía que se muestra en la Figura 59. Tubo de metacrilato con agujeros., de uno de los tubos de mayor tamaño con los agujeros ya realizados:



Figura 59. Tubo de metacrilato con agujeros.

- **Tapas para los tubos de metacrilato**

Las tapas son del mismo material que los tubos. Son de metacrilato también, y tienen el mismo diámetro que el tubo al que se van a acoplar.

Se han fabricado tapas para los tubos de tamaño grande y de tamaño mediano, ya que los tubos de tamaño pequeño son sólo una pieza.

Con las tapas solo se cierra un extremo del tubo, que va a ser la base de este.

En la Figura 60. Tubo con tapa. se puede ver la tapa y el lugar donde va a insertada al tubo.



Figura 60. Tubo con tapa.

- **Cables**

Los cables que se usan para esta red de sensores son de cobre o estaño (Cu/Sn).

Son cables de menor diámetro que los utilizados en los sensores voltamétricos, ya que tienen que introducirse en los pequeños agujeros del tubo.



Figura 61. Cables.

- **Pasta epoxi de plata**

Es un tipo de pegamento, llamado laca de plata.

Consta de una parte de alta viscosidad (llamada parte A), y de un líquido (llamado parte B).

Para que esta sea eficaz hay que realizar la mezcla de ambos componentes. La proporción es 10:1, por cada **1 gramo de parte A**, se adiciona **0.1 gramos de parte B**. Se mezclan los dos componentes (PA y PB), hasta que queda una pasta homogénea y ligeramente viscosa. Y ya estaría listo para colocarlo en el lugar que sea requerido. Es necesario meterlo al **horno** una vez aplicado para que la pasta epoxi de plata endurezca, aproximadamente **2 horas a 70°C**.

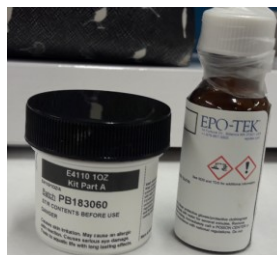


Figura 62. Epoxi de plata.

- **Pegamento de cianocrilato**

Se utiliza pegamento de cianocrilato (“Loctite”), para que de esta forma se puedan fijar los cables mejor, como se explicará en el apartado 3.2.3.



Figura 63. Pegamento de cianocrilato

- **Cloroformo**

Triclorometano (CHCl_3), es un compuesto químico líquido incoloro y de olor fuerte.

Se va a utilizar para adherir la tapa y el tubo como se explicará más adelante.



Figura 64. Cloroformo.

Para la fabricación de la red de sensores potenciométricos también se necesitan fabricar unas membranas con el material correspondiente con el que se fabrican cada una de ellas. Esto se va a explicar en el siguiente apartado.

3.2.2. Tipos de membranas

La red de sensores potenciométricos consta de 20 membranas, son el elemento sensible. Se colocará una membrana de cada tipo en cada uno de los 20 agujeros que hay en el tubo de metacrilato.

Cada **membrana** consta de tres componentes con las siguientes proporciones de cada uno:

- **Plastificante** (hay 4 diferentes, se les denominará con un número a cada uno). Proporción → **65% = 0.26 gramos**
- **Aditivo** (hay 5 distintos, se les nombrará con una letra a cada uno). Proporción → **3% = 0.012 gramos**
- **PVC de alto peso molecular**. Proporción → **32% = 0.128 gramos**

Los materiales que se utilizan para la fabricación de las membranas son los siguientes:

- Balanza analítica de precisión (Precisa 125A)
- Espátulas y cucharas
- **THF** (tetrahidrofurano, que se usará como disolvente)
- Pipetas y cuentagotas
- Viales (donde se pesarán los compuestos, se mezclarán y se almacenarán las membranas en estado líquido, una vez fabricadas y antes de utilizarlas)

A continuación se va a proporcionar la Tabla 1. Plastificantes. con los **plastificantes** que se han utilizado:

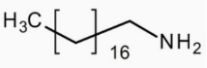
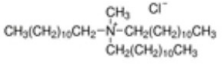
		Nombre	Fórmula	Fórmula	Peso molecular (g/mol)
Plastificantes	1	Octadecylamine	$C_{18}H_{39}N$		269.51
	3	Oleyl alcohol	$C_{18}H_{36}O$		268.48
	5	Tridodecylmethyl ammonium chloride	$C_{37}H_{77}ClN$		572.47
	6	Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$		282,47

Tabla 1. Plastificantes.

Seguidamente se va a proporcionar la Tabla 2. Aditivos. con los **aditivos** que se han utilizado:

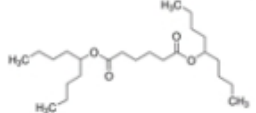
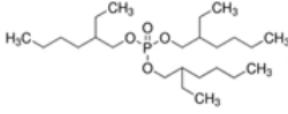
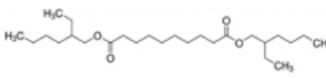
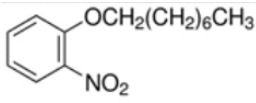
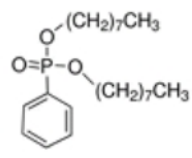
		Nombre	Fórmula	Fórmula	Peso molecular (g/mol)
Aditivos	B	Bis(1-butylpentyl) adipate	$C_{24}H_{46}O_4$		398.62
	C	Tris(2-ethylhexyl) phosphate	$C_{24}H_{51}O_4P$		434.63
	D	Dibutyl sebacate	$C_{18}H_{34}O_4$		314.47
	E	2 Nitrophenyl octylether	$C_{14}H_{21}NO_3$		251.30
	F	Dioctyl phenyl phosphonate	$C_{22}H_{39}O_4P$		382.52

Tabla 2. Aditivos.

Ahora se va a proporcionar la Tabla 3. Cantidades experimentales de los componentes de las membranas con las cantidades experimentales, es decir que se han pesado para fabricar cada membrana de **aditivos** y de **plastificantes**:

Plastificante	Aditivo	g plastif.	% plastif	g aditivo	% aditivo	g PVC	% PVC
1	B	0.2595	65.05	0.0148	3.71	0.1246	31.23
	C	0.2652	65.87	0.0149	3.70	0.1225	30.42
	D	0.2727	66.72	0.0133	3.25	0.1227	30.02
	E	0.2891	65.05	0.0126	2.83	0.1427	32.11
	F	0.2874	67.51	0.0148	3.47	0.1235	29.01
Plastificante	Aditivo	g plastif	% plastif	g aditivo	% aditivo	g PVC	% PVC
3	B	0.2584	64.53	0.0138	3.36	0.1262	30.73
	C	0.2597	66.28	0.0124	3.00	0.1490	36.10
	D	0.2622	65.56	0.0135	3.03	0.1733	38.89
	E	0.2582	64.90	0.0130	3.21	0.1284	31.70
	F	0.2825	67.94	0.0136	3.29	0.1318	31.91
Plastificante	Aditivo	g plastif	% plastif	g aditivo	% aditivo	g PVC	% PVC
5	B	0.2707	64.95	0.0134	3.26	0.1307	31.79
	C	0.2513	64.81	0.014	3.43	0.1297	31.77
	D	0.2588	63.89	0.0144	3.53	0.1328	32.58
	E	0.2637	64.82	0.0144	3.55	0.1285	31.63
	F	0.2676	63.45	0.0215	5.19	0.1298	31.35
Plastificante	Aditivo	g plastif	% plastif	g aditivo	% aditivo	g PVC	% PVC
6	B	0.2670	64.95	0.0134	3.26	0.1307	31.79
	C	0.2646	64.81	0.0140	3.43	0.1297	31.77
	D	0.2604	63.89	0.0144	3.53	0.1328	32.58
	E	0.2633	64.82	0.0144	3.55	0.1285	31.63
	F	0.2627	63.45	0.0215	5.19	0.1298	31.35

Tabla 3. Cantidades experimentales de los componentes de las membranas

Para construir las 20 membranas, para cada una se pesa en un vial el aditivo (B, C, D, E, F), se adiciona también el plastificante correspondiente (1, 3, 5, 6) y se adiciona también pesándolo el PVC de alta densidad. Se añade unas gotitas de **THF** (tetrahidrofurano) que hace la función de disolvente. Se agita en el vial cerrado con un tapón y se conservan. Una vez que se quieran utilizar para colocarlos en el soporte del sensor, si está demasiado viscoso se añade alguna gota más de THF.

En el siguiente apartado, se especificará como se colocan las membranas en el sensor.

3.2.3. Fabricación de los electrodos

Para fabricar la red de sensores potenciométricos que se han diseñado en este trabajo, primeramente se preparan los tubos de metacrilato. Esto consiste en perforar los tubos, cada perforación consiste en un pocillo y un agujero. Se realizan 4 columnas de agujeros con 5 agujeros en cada columna, un total de 20 agujeros en cada tubo.

A continuación, se insertan los cables en los agujeros (hay que pelar los extremos de cada cable). Una vez insertados los cables en los correspondientes agujeros, hay que fijarlos. Esto se consigue poniendo una gotita de pegamento de cianocrilato (“Loctite”) entre el cable y el agujero para fijarlo (sin que pase a la parte interior del tubo).

Cuando todo esto está listo, se fabrica la mezcla de la pasta epoxi con la descripción y las proporciones que se facilitaron en el apartado 3.2.1. Una vez elaborada esta mezcla se pone cubriendo los agujeros para fijar permanentemente el cable con el tubo, y para que además la pasta epoxi haga de conductor. Al colocarla en los pocillos hay que tener cuidado no se pase al interior del tubo y no salga al exterior del pocillo del agujero, además hay que asegurarse de que rellene bien todo el hueco. Hay que dejarlo secar y para que esta endurezca y polimerice correctamente se introduce al horno 2 horas a 70°C (no se puede elevar la temperatura del horno ya que a mayor temperatura el metacrilato del tubo se dañaría).

Para completar el soporte del sensor a los tubos de tamaño grande y mediano, se les coloca en la base una tapa de metacrilato también. Esta se fija untando ligeramente el contorno de la tapa con cloroformo e introduciéndola rápidamente al tubo. En los tubos de tamaño pequeño no se acopla tapa porque son una sola pieza.

El resultado del soporte sería el que se observa en la Figura 65. Soporte de los sensores.:



Figura 65. Soporte de los sensores.

El siguiente paso para preparar los sensores es colocar las membranas en los soportes.

Las membranas ya fabricadas con el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2., ya están listas para colocarlas en el soporte. Hay que tener en cuenta que si alguna de ellas está demasiado viscosa se le adicionan unas gotas de THF (tetrahidrofurano) para diluirla.

Para colocar las membranas en el soporte se coge cada una de ellas con un cuentagotas (distinto para cada membrana para que no haya contaminación), y se van colocando en los cuencos de cada agujero. Para ellos se tumba el soporte y se fija para que no se mueva ya que las membranas son líquidas hasta que se secan. Una vez puestas las gotas de las primeras cinco membranas en la primera columna se deja secar y cuando estas están secas se repite la operación dos veces más, haciendo que el total de veces que se colocan gotas de cada membrana en cada hueco sean 3 (es decir, tres gotas de cada membrana en cada hueco). Cuando las membranas de la primera columna están totalmente secas se procede a girar el soporte y a colocar las 5 siguientes membranas de la siguiente columna y se repite el proceso, hasta que se completan todas las columnas del soporte.

Es importante no tocar las membranas una vez secas y colocadas en el soporte, además es importante mantener las membranas en disolución una vez que están en estado sólido, y colocadas en el soporte. Por eso los sensores siempre se guardan en un vaso de precipitados lleno de KCl 0.1M que es la disolución que va a mantener las membranas.

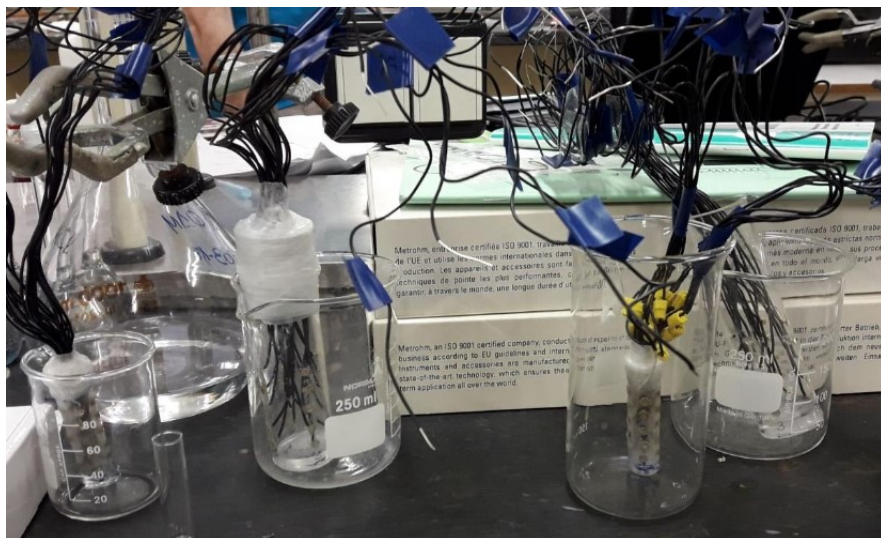


Figura 66. Sensores potenciométricos sumergidos en KCl 0.1M.

Otra cosa que hay que tener en cuenta, es que cada membrana hay que tenerla identificada siempre, por eso se numeran y se anillan los cables, de esta forma se facilita la identificación de cada una de ellas.

3.2.4. Mejoras de la lengua potenciométrica

Las mejoras que se han realizado en este sensor han sido de tipo funcional, para conseguir que sea más cómodo el sensor a la hora de utilizarle y para conseguir que funcione correctamente en todo momento.

Las mejoras que se han llevado a cabo han sido las siguientes:

- La protección de los cables con un recubrimiento en forma de espiral, que los agrupa y los protege.
- Se han unido los cables con un conector de tipo macho-hembra. Para la unión de estos con el conector se ha utilizado una soldadura con estaño. Este conector va a posibilitar que sea más fácil la conexión con el multiplexor.



Figura 67. Protección de cables y conector.

3.2.5. Ensayos potenciométricos

La red de sensores potenciométricos diseñada y fabricada, se va a utilizar para medir y caracterizar diferentes disoluciones patrón así como las sustancias de interés en la industria de la alimentación que se quieren analizar y diferenciar unas de otras.

Con la disolución de KCl se va a entrenar el sistema y a probar la red de sensores, después se utilizará la red de sensores como si fuera una lengua para distinguir entre disoluciones de distintos “sabores” tipo. Y finalmente, se medirán zumos con leche y vinos.

Se van a mencionar y describir los elementos utilizados en el procedimiento de medición, las disoluciones y el proceso de preparación de los productos alimentarios que se quieren estudiar. También las particularidades y la descripción completa del proceso de medida.

a. Elementos utilizados

Se va a enumerar los elementos del laboratorio que son necesarios para efectuar el montaje y las mediciones que se van a realizar en el desarrollo experimental con la red de sensores potenciométrica.

Material de laboratorio

Todos estos elementos se han mostrado en el apartado 3.1.6.a.

- Vasos de precipitados
- Matraces
- Guantes de laboratorio
- Tijeras
- Espátulas y cucharillas
- Balanza analítica de precisión (Precisa 125A)
- Parafilm
- Probetas
- Polímetro
- Desionizador de agua.

El desionizador de agua que ya se mostró en el apartado 3.1.6.a, es necesario ya que se necesita agua desionizada para lavar el material antes y después de las medidas y para preparar las disoluciones.

Además otros elementos que se va a utilizar son:

- Agitador magnético

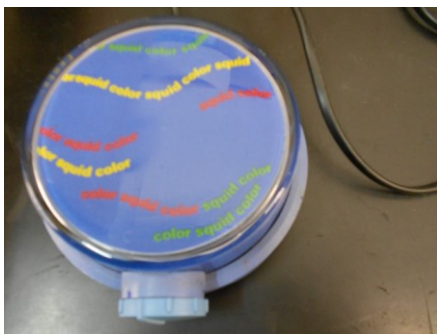


Figura 68. Agitador magnético.

- Electrodo RE comercial

Es un electrodo de referencia de disolución $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ saturado. Se coloca a la izquierda del electrodo de trabajo en la celda electroquímica. Está sumergido en una disolución de KCl para mantenerlo mientras no se utiliza, por tanto se enjuaga con agua desionizada antes de introducirlo en la disolución de estudio. A diferencia de los sensores voltamétricos, para las medidas de los sensores potenciométricos se ha optado por usar un RE comercial por su comodidad a la hora de colocarlo en la celda electroquímica.



Figura 69. Electrodo RE comercial.

- Electrodo WE

El electrodo de trabajo que se va a utilizar en este procedimiento es el diseñado en este proyecto descrito en apartados anteriores.



Figura 70. Electrodo de trabajo potenciométrico.

- Celda electroquímica

La celda electroquímica se va usar con los sensores potenciométricos va a ser una celda artesanal que se ha fabricado también por nosotros. Consiste en un vaso de precipitados y como tapa se va a colocar un cartón dándole forma del vaso de precipitados (con ese diámetro) y realizando dos agujeros con el tamaño de los electrodos para introducirlos y sujetarlos.

La tapa se va a plastificar para evitar que se estropee si se moja.



Figura 71. Tapa celda electroquímica.

El montaje de la celda electroquímica quedará de la forma que muestra la Figura 72. Montaje celda electroquímica sensor potenciométrico.:

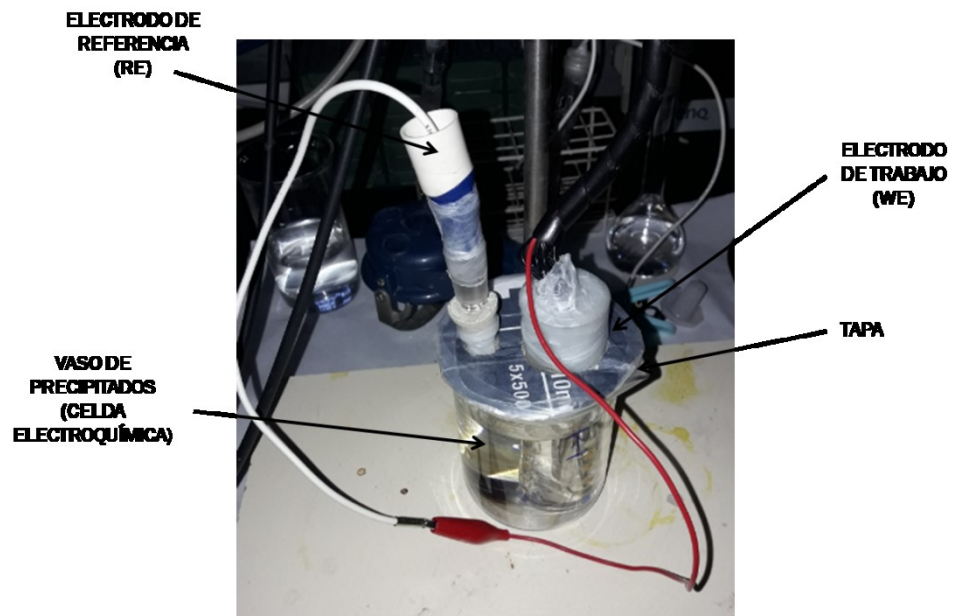


Figura 72. Montaje celda electroquímica sensor potenciométrico.

- Multiplexor

Son circuitos combinacionales con varias entradas y una salida de datos. En este trabajo se han necesitado dos, cada uno nos permite realizar 20 medidas simultáneas, ya que se querían medir los potenciales de 40 membranas diferentes con la disolución de estudio (es decir 40 señales diferentes, 2 redes con 20 señales).

El multiplexor tiene un conector que se conecta al conector del WE. Además los dos multiplexores de los que se ha dispuesto se introducen y se conectan con el Data Logger, que es el registrador de los datos.



Figura 73. Multiplexor.



Figura 74. Unión de los conectores.

- Data Logger

Es un dispositivo electrónico que tiene la función de registrar datos en el tiempo, en nuestro caso el potencial, por medio de instrumentos y sensores propios conectados externamente como es el caso de este trabajo.

El Data Logger está conectado al multiplexor y al ordenador, es el intermediario entre ambos.



Figura 75. Data logger.

- Ordenador
Le llegan los datos registrados procedentes del Data Logger y con el software que tiene instalado, los trata y los procesa.

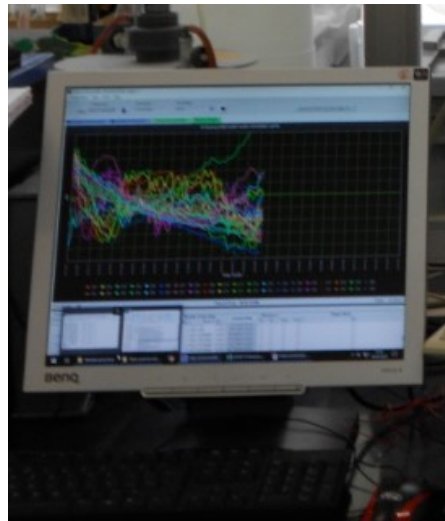


Figura 76. Ordenador.

- Software
El Software utilizado para la representación y generación de los datos registrados es el Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies).

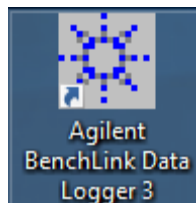


Figura 77. Icono Software Benchlink Data Logger 3.

Finalmente la disposición de los elementos en conjunto para llevar a cabo la potenciometría con la red de sensores potenciométricos es la observada en la Figura 78. Disposición conjunto de elementos para potenciometría.:

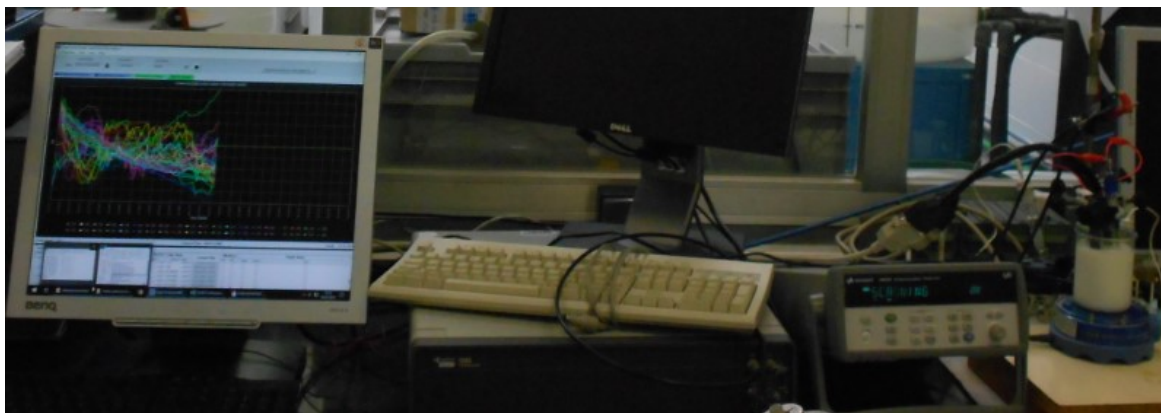


Figura 78. Disposición conjunto de elementos para potenciometría.

b. Disoluciones utilizadas

Para realizar las mediciones de este trabajo, se han elegido distintas disoluciones. Se van a indicar en este apartado.

- Disolución de cloruro potásico (KCl)

Esta disolución tiene como volumen 1000 mL con una concentración de 0.1 M.

En el apartado 3.1.6.b. se explicó cómo obtenerla.

Los electrodos miden esta disolución y se comprueba que funcionan de manera adecuada.

Con la red de sensores potenciométricos se ha intentado recrear una “lengua”, es decir se ha intentado que el sensor identificase y distinguiese entre 5 compuestos distintos que representan los sabores: dulce, salado, amargo, ácido y umami. Seguidamente se van a describir las disoluciones que se han elaborado para fabricar las diferentes sustancias patrón en esta tarea.

- Disolución de Glucosa

La disolución de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) se va utilizar como **sabor dulce**.

Para elaborar esta disolución, sabiendo que el peso molecular de la glucosa es 180.156 g/mol, y que el volumen de la disolución tiene que ser **250 mL** con una concentración de **10^{-2} M**, se calcula el peso que se necesita adicionar de glucosa que es **0.4504 gramos**.

Por tanto se mezcla 0.4504 gramos en agua desionizada hasta llegar al volumen de 250 mL y se agita bien la disolución. Así se obtiene esta.

- Disolución de Cloruro sódico

La disolución de cloruro sódico (NaCl) más conocido comúnmente como sal, se va utilizar como **sabor salado**.

Para elaborar esta disolución, sabiendo que el peso molecular del NaCl es 58.44 g/mol, y que el volumen de la disolución tiene que ser **250 mL** con una concentración de **10^{-2} M**, se calcula el peso que se necesita adicionar de NaCl que es **0.1461 gramos**.

Por tanto se diluyen 0.1461 gramos en agua desionizada hasta llegar al volumen de 250 mL y se agita bien la disolución.

- Disolución de Ácido cítrico

La disolución de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), se va utilizar como **sabor ácido**.

Para fabricar esta disolución, sabiendo que el peso molecular del ácido cítrico es 192.124 g/mol, y que el volumen de la disolución tiene que ser **250 mL** con una concentración de **10^{-2} M**, se calcula el peso que se necesita adicionar de ácido cítrico que es **0.4803 gramos**.

Por tanto se mezclan 0.4803 gramos en agua desionizada hasta llegar al volumen de 250 mL y se agita la disolución.

- Disolución de Urea

La disolución de urea (CH_4N_2O) se va utilizar como **sabor amargo**.

Para realizar esta disolución, sabiendo que el peso molecular de la urea es 60.06 g/mol, y que el volumen de la disolución tiene que ser **250 mL** con una concentración de **10^{-2} M**, se calcula el peso que se necesita adicionar de urea que es **0.15015 gramos**.

Por tanto se mezcla 0.15015 gramos en agua desionizada hasta llegar al volumen de 250 mL y se agita bien la disolución. Así se obtiene dicha disolución.

- Disolución de glutamato monosódico.

La disolución de glutamato monosódico ($C_5H_8NNaO_4$), más conocido comúnmente como sal sódica del ácido glutámico. Se va utilizar como **sabor Umami**.

Para realizar esta disolución, sabiendo que el peso molecular del glutamato monosódico es 169.111 g/mol, y que el volumen de la disolución tiene que ser **250 mL** con una concentración de **10^{-2} M**, se calcula el peso que se necesita adicionar de glutamato monosódico que es **0.46785gramos**.

Por tanto se mezcla 0.46785 gramos en agua desionizada hasta llegar al volumen de 250 mL y se agita bien la disolución. Así se obtiene dicha disolución.

c. Potenciometría

La lengua electrónica que se ha diseñado y fabricado en este trabajo trabaja con sensores potenciométricos, y por tanto se utiliza la medida del potencial a circuito abierto, para medir las disoluciones con la red de sensores en los diferentes ensayos. Se realiza un registro durante un cierto tiempo y una vez que se observa un potencial estable en las 20 membranas se selecciona el potencial final de medida que se aplicará en el tratamiento estadístico de los datos.

Los parámetros cambian según el tipo de sensor y el analito a analizar. Para llevar a cabo esta técnica se ha utilizado el software **Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies)**.

Seguidamente, se va a describir el procedimiento que se lleva a cabo en el software para obtener los resultados que se desean.

Primeramente hay que configurar el software y esto se realiza añadiendo una configuración específica para el aparato, para ello se siguen las instrucciones del tutorial que el aparato proporciona. Después de haberlo configurado, se ejecuta el programa y emerge la siguiente pantalla que se observa en la Figura 79. Pantalla de inicio del software. (puede haber variaciones, en función de los nombres elegidos en la configuración y de los aparatos conectados).



Figura 79. Pantalla de inicio del software.

Se debe seleccionar y configurar los nombres de los canales en los que se va a operar. Hay que realizarlo en la pestaña con el nombre “Configure Channels”, se pueden nominar cada entrada como se desee.

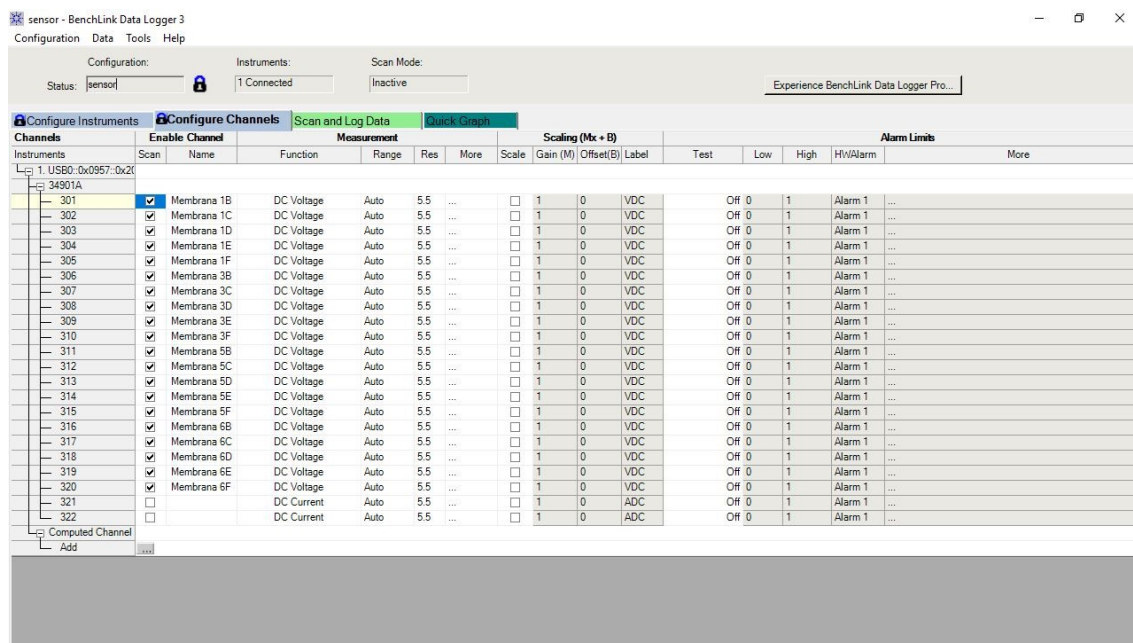


Figura 80. Designación de los canales de medida.

Posteriormente, se accede a la pestaña “Scan and Log Data” como muestra la Figura 81. Acceso a la configuración para la toma de medidas.:

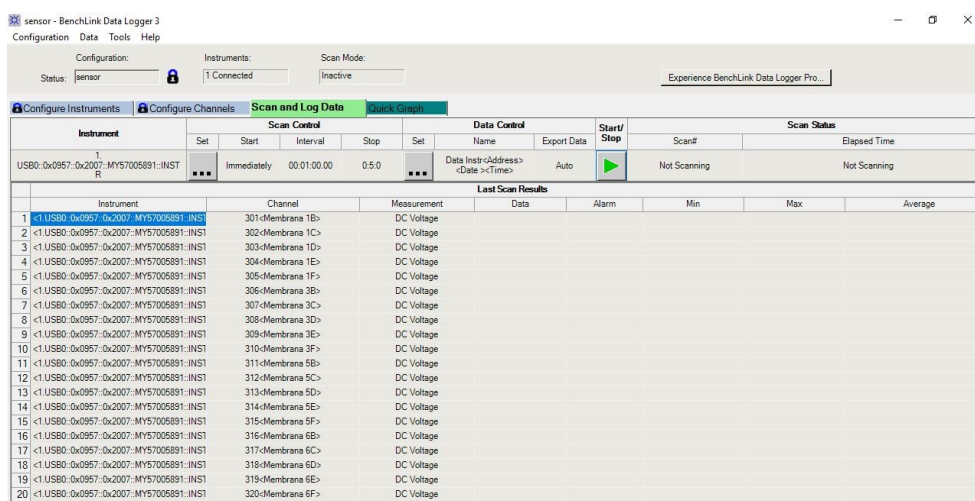


Figura 81. Acceso a la configuración para la toma de medidas.

En esta pantalla es donde se fijará el tiempo de cada ensayo y el número de medidas a realizar. Para efectuar esto se pueden modificar variables como:

- Momento de inicio
- Intervalo (cada cuanto tiempo se va a tomar y representar un valor).
- Momento de parada

Scan Control for Instrument<USB0::0x0957::0x2007::MY57005891::INSTR>

When Start Button Pressed, Start Scanning

- ☒ Immediately
- ☐ On External Trigger
- ☐ On Alarm
 - Alarm 1
- ☐ At Time
 - Date: 15/06/2018
 - Time: 12:09:54

Interval (Time Between Scans)

HH: 0 MM: 0 SS: 5 mSec: 0

Stop Scanning

- ☐ By Pressing Stop Scan Button
- ☐ After N Scans
 - 8
- ☒ Elapsed Time
 - HH: 0 MM: 4 SS: 0
- ☐ At Time
 - Date: 15/06/2018
 - Time: 13:07:54

Buttons: Apply to all Instruments, OK, Cancel, Help

Figura 82. Configuración para la toma de medidas.

Ya definidas estas variables se presiona el botón “Start” y se comienza a medir. En la pestaña “Quick graph”, se puede ver el gráfico, que será como la Figura 83. Gráfico de las medidas.:

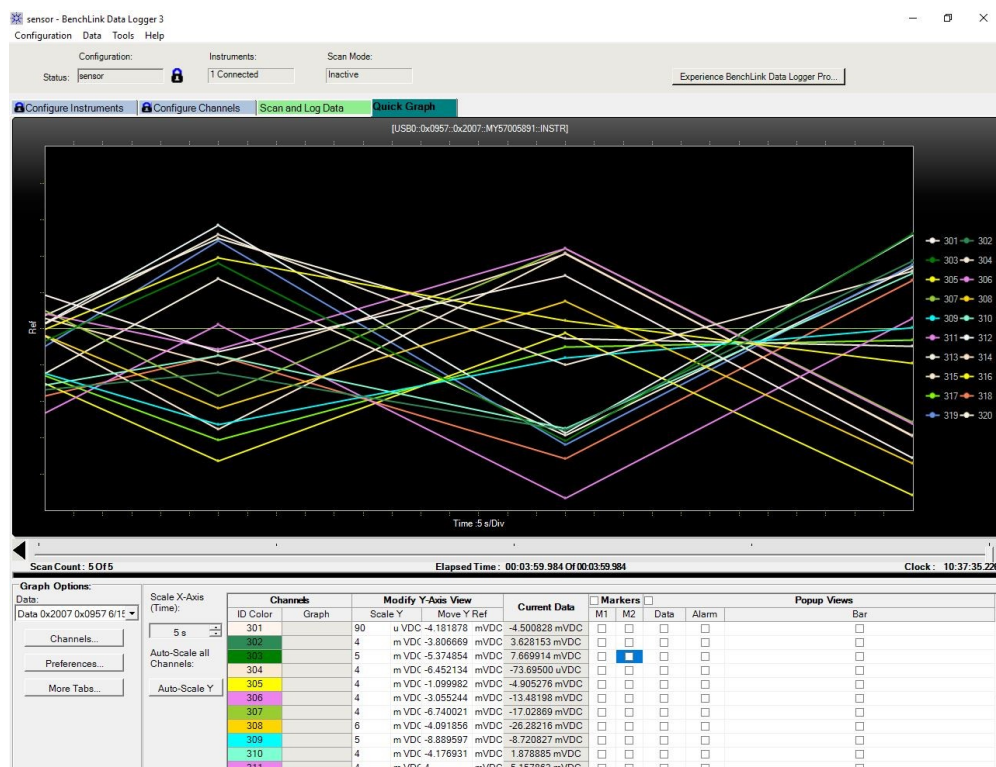


Figura 83. Gráfico de las medidas.

En la pestaña se pueden modificar la visualización de puntos en las medidas en vez de líneas, cambiar los colores de los sensores, etc...

Cuando se ha terminado de medir se muestra la siguiente ventana (Figura 84. Almacenamiento de datos.) para poder guardar los resultados:

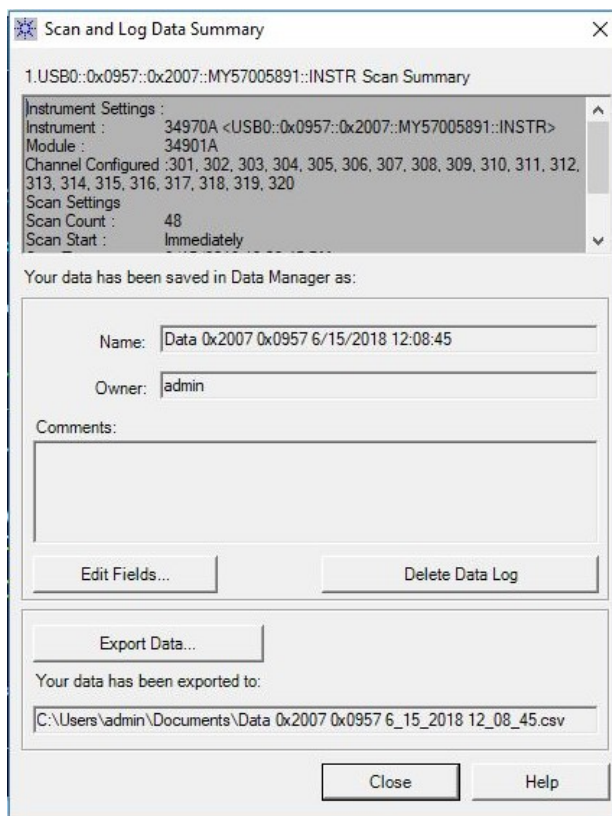


Figura 84. Almacenamiento de datos.

Se obtiene un archivo ".csv", y eligiendo la opción "Export Data" se puede guardar en la ubicación que se desee con el nombre que se elija.

Al pulsar el botón emergerá una ventana que permite escoger que datos se quieren almacenar y otras variables. Cuando se ha establecido lo que se quería se pulsa el botón "Export to File" y se abre una ventana que permite elegir la carpeta destino y el nombre que se desea (Figura 85. Pasos para almacenar la información obtenida.):

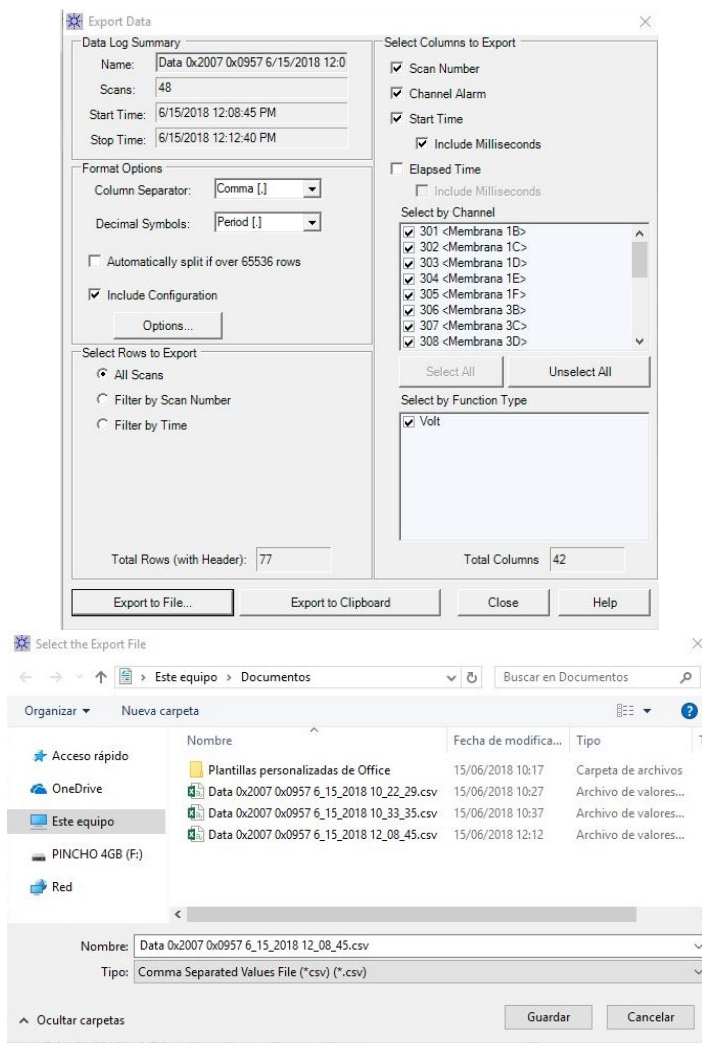


Figura 85. Pasos para almacenar la información obtenida.

Finalmente se van cerrando las ventanas y guardando lo que nos indique, así se finaliza el registro potenciométrico de los sensores que forman la lengua.

3.3. Análisis quimiométrico

El análisis quimiométrico es una técnica analítica que se basa en la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos sobre las medidas de las muestras estudiadas para extraer información de forma eficiente y útil de los datos químicos [31].

El tratamiento de datos multivariante es una herramienta estadística muy utilizada para el análisis de alimentos y bebidas, como es el caso de este trabajo. La finalidad de esto es aislar las características que distinguen unas muestras de otras. En el caso de este trabajo, distinguir entre variedades de vinos, variedades de zumos y variedades de sabores de disolución.

Al medir los alimentos o bebidas con sensores voltamétricos o con la red de sensores potenciométricos como los que se han diseñado y fabricado en este proyecto, se obtiene una gran cantidad de datos (numerosas respuestas). El análisis estadístico multivariante de datos se emplea para facilitar la visualización y la correlación de todos estos datos de modo que aplicando esta podamos obtener de una forma más sencilla el máximo de información.

El tratamiento estadístico de los datos mediante sistemas multivariantes se lleva a cabo en varias fases: Reducción de dimensionalidad, procesamiento de datos y reconocimiento de patrones.

En este proyecto se han utilizado algunos métodos estadísticos que son los que se van a describir seguidamente.

3.3.1. PCA

El análisis de componentes principales (PCA), es un método de análisis estadístico que se utiliza con el fin de discriminar entre muestras muy similares difíciles de distinguir. Se fundamenta en reducir las dimensiones de un conjunto de datos. Este procedimiento registra la mejor representación con mínimos cuadrados y así se consigue un grupo de variables no correlacionadas linealmente.

Este tipo de análisis se ha utilizado para tratar los datos obtenidos de las medidas de los sensores voltamétricos que se han elaborado en este trabajo. Para el tratamiento de estos datos se ha empleado el programa informático **Matlab**. Son necesarios unos Scripts determinados, donde se encuentra el algoritmo que debe llevar a cabo el programa. El algoritmo tiene como objetivo separar las muestras mediante los datos, voltamograma registrado en los sensores CPE y biosensores modificados con tirosinasa y glucosa oxidasa. La respuesta, son gráficas en 2D y 3D que nos permiten diferenciar los valores muy similares que hemos registrado en nuestras muestras. También el programa suministra una matriz de datos que es imprescindible para hacer la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), que es otro análisis estadístico que se ha llevado a cabo en este trabajo para el tratamiento de datos.

3.3.2. LDA

El análisis de discriminación lineal (LDA), es una técnica de análisis estadística cuyo objetivo es buscar una combinación lineal de características que nos permita la máxima diferenciación entre nuestras muestras. Este análisis se ha utilizado para el tratamiento de datos obtenidos con la red de

sensores potenciométrica que se ha elaborado en este trabajo. Es la técnica correspondiente a la PCA utilizada en los sensores voltamétricos.

El programa con el que se ha llevado a cabo este procedimiento ha sido **IBM SPSS Statics**. Este programa aporta gráficas en 2D y valores referentes a las funciones de correlación.

3.3.3. PLS

La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) es un procedimiento estadístico con el objetivo de encontrar una regresión lineal por medio de la proyección de las variables de predicción y las variables observables.

Se quiere encontrar relaciones entre dos matrices de datos, que son en este caso:

- $X \rightarrow$ Datos medidos.
- $Y \rightarrow$ Datos químicos a correlacionar.

Para ellos se necesita la matriz obtenida en la técnica que se realizó previamente a esta, tratando los datos de los sensores voltamétricos que es la PCA. Introduciendo la matriz mencionada y los datos químicos de la muestra en el programa informático **Unscrambler X** se obtiene una correlación que posibilita hacer predicciones entre los datos medidos por nuestros sensores y los datos químicos medidos uno a uno a través de técnicas analíticas mucho más costosas.

3.3.4. MLR

La regresión lineal múltiple (MLR) es un método estadístico que se basa en reconocer las variables independientes, comparar y comprobar modelos causales y pronosticar valores de una variable. Esta técnica se realiza posterior a la LDA, con los datos tratados de la red de sensores potenciométricos. Es el procedimiento correspondiente a la PLS.

Para ello se requieren los programas **The Unscrambler X**, **IBM SPSS Statics** y **Matlab**, y como se acaba de mencionar los datos tratados de la LDA, junto con los datos químicos de la muestra.

3.3.5. Funcionamiento de trabajo de los métodos PLS y MLR

Los métodos estadísticos PLS y MLR ya definidos anteriormente se emplean para obtener relaciones entre dos matrices de datos que como se mencionó anteriormente pertenecen a:

- $X \rightarrow$ Datos medidos.
- $Y \rightarrow$ Datos químicos a correlacionar.

Para proceder a conseguir esto se necesita un procedimiento de análisis que es el que se va a describir a continuación:

1. Por medio de los datos químicos y los datos medidos (de los distintos sensores de las redes de sensores que se han fabricado) se consigue un modelo llamado “CALIBRACIÓN”. Los parámetros correspondientes a la calibración se muestran en color azul en los gráficos.
2. Seguidamente se ejecuta una “VALIDACIÓN” del modelo por medio del procedimiento “leave one out”, conocido también como “PREDICCIÓN”. Los parámetros correspondientes a la validación se muestran en color rojo en los gráficos.
3. Se exponen los distintos gráficos o rectas de calibrado y sus parámetros más relevantes como son R^2 , RMSE, Slope (que es la pendiente de la recta), Offset (corresponde con el valor en el eje Y donde comieze la recta). En el método PLS también se obtiene el valor del “factor” que es el número de variables latentes.

Para la evaluación de la calidad de las correlaciones que se han conseguido hay que fijarse en los siguientes parámetros (mencionados anteriormente) que se van a describir:

- $R^2 \rightarrow$ es el coeficiente que determina la calidad del modelo para replicar los resultados y la proporción de la variación de los resultados que se puede explicar por este. Tiene que aproximarse lo máximo posible a la unidad. Cuanto más cerca este de la unidad mejor se ajusta el sistema a la recta obtenida en el modelo.

Es importante tener en cuenta que:

$$R^2_C > R^2_P$$

Dónde:

$R^2_C \rightarrow R^2$ de calibración

$R^2_P \rightarrow R^2$ de predicción

Si R^2 es igual o mayor que 0.95 el valor es bueno, y por tanto si R^2_c y R^2_p tiene ese valor o superior quiere decir que se considera que la recta es buena y el modelo permite la predicción.

- **RMSE** → es el error cuadrático medio que mide la cantidad de error que hay entre dos conjuntos de datos (en este caso entre el modelo y la predicción). Compara un valor predicho con un valor observado o conocido. Al ser un tipo de error tiene que tener un valor lo más bajo posible. Es un error relativo y por ello se tiene que considerar el orden de magnitud del dato químico.
- **Variables latentes** → son parámetros que el sistema tiene que introducir de forma adicional, por tanto cuantas menos se precisen el modelo será más sencillo y mejor.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este capítulo se mostrarán los resultados experimentales obtenidos en los distintos ensayos potencioestáticos y voltamétricos obtenidos en las diferentes disoluciones con los sensores diseñados y fabricados durante el TFG.

Se describirá la respuesta voltamétrica obtenida con los sensores de CPE y los biosensores de tirosinasa y glucosa oxidasa, en las distintas disoluciones. También se describirán las comparativas entre unos y otros sensores con objeto de determinar el efecto de las enzimas, y estudiar la variación de la señal obtenida con el tiempo de envejecimiento de las bebidas que se han medido.

Se mostrarán las respuestas de la red de sensores potenciométricos obtenidas, en las diferentes disoluciones. Además se explicarán las comparativas entre unos y otros sensores, y las modificaciones de las señales obtenidas en función del tipo de bebida medida en función de su origen y su grado de envejecimiento.

Asimismo, se exponen los resultados del análisis estadístico de los datos que se han medido y que se tratan con diferentes programas para obtener correlaciones con los datos químicos de las muestras, todo esto se describirá en los siguientes apartados.

4.1. Características y acondicionamiento de los sensores

En este apartado se va a exponer el acondicionamiento de los sensores fabricados en este trabajo, en las distintas disoluciones para caracterizarlos y comprobar su correcto funcionamiento. De esta forma se va a ver la reacción de cada sensor en las distintas muestras de ensayo (muestras patrón, blancos) y así se conocerá la reacción característica de cada electrodo y con ello el punto de inicio de cada sensor.

El **acondicionamiento** de una señal es un proceso de adquisición de datos que se basa en la ejecución electrónica de esta, con los dispositivos apropiados, para conseguir rangos de voltajes o corrientes adecuados a las características del diseño. En el acondicionamiento de señales se convierte un tipo de señal eléctrica o mecánica (que es la señal de entrada) en otro tipo de señal (que es la señal de salida). El objetivo es amplificar la señal y convertirla en otro tipo de formato para leer que sea compatible con el control de los equipos que se están utilizando. El acondicionamiento de la señal ayuda a obtener medidas precisas y conseguir una resolución mayor en la medición. Se produce una inmunidad al ruido más elevada en la medida.

La **caracterización** de un sensor se fundamenta en el cálculo de la ecuación característica de su comportamiento. Esto alude a la ecuación que determina la causa de cambio en la variable de salida, normalmente una variable eléctrica, en relación a la variable de entrada. La caracterización de los sensores es fundamental para la interpolación de valores. Una adecuada caracterización origina medidas con buena exactitud [32].

4.1.1. Voltamétricos

Se va a comenzar con la caracterización de los sensores voltamétricos. Estos sensores se van a acondicionar en dos tipos de disoluciones, la primera va a ser en KCl (cloruro potásico) y la segunda va a ser una disolución de ferro-ferricianuro que comúnmente se utiliza como solución redox tipo. Estas disoluciones ya se describieron en el Capítulo 3.

Una vez comprobado que los sensores ya fabricados tienen conductividad con el polímetro, y por tanto están correctamente fabricados se ensayan en las disoluciones mencionadas.

Se han elegido estas disoluciones por algunas razones. La disolución de KCl se ha elegido porque es una disolución donde no hay especies de oxidación reducción lo que nos permite conocer el comportamiento del sensor en un electrolito base y detectar posibles defectos de fabricación y la disolución de ferro-ferri se ha elegido porque sí que tiene reacciones redox perfectamente conocidas que nos permiten conocer su capacidad como sensor.

a. Ensayos en KCl

En la siguiente figura se va a observar el voltamograma del sensor de grafito CPE sin modificar en la disolución de KCl.

Esta gráfica se ha obtenido con los datos registrados por el programa “NOVA 1.10”, y tratándolos con el programa “Origin8”.

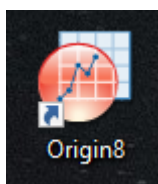


Figura 86. Icono Software Origin8.

El voltamograma obtenido es el de la Figura 87. Voltamograma de sensor de CPE en KCl.:

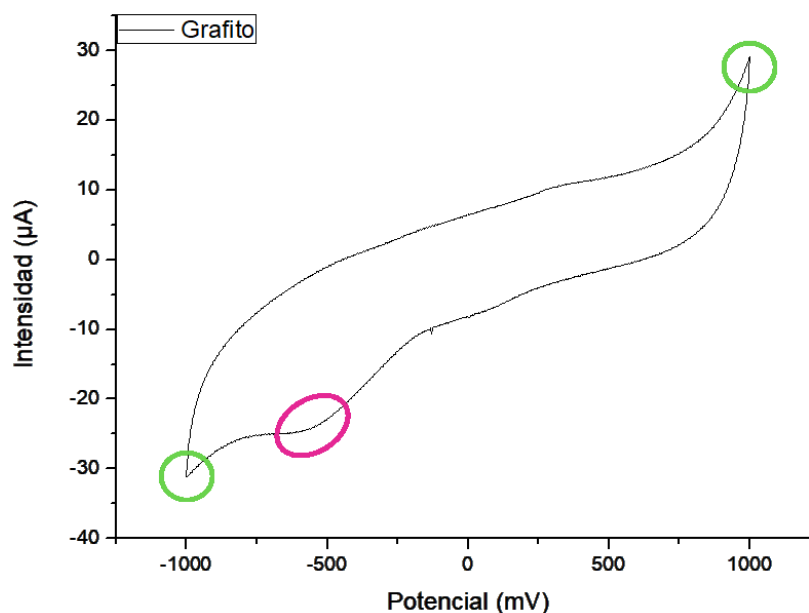


Figura 87. Voltamograma de sensor de CPE en KCl.

En el voltamograma se puede observar que en el eje de las abscisas (eje X) se encuentra el potencial con unidades de mV, y en el eje de las ordenadas (eje Y) están los valores de la corriente con unidades de μA . La gráfica es el último ciclo de la VC, que es el ciclo en el que ya se mantiene estable la medida, ya se ha comentado que es el primer ciclo el que presenta un comportamiento ligeramente distinto.

El potencial que se ha fijado se mueve de -1000 a 1000 mV y es ahí donde vemos los bordes o extremos del ciclo que están señalados con dos círculos verdes. El punto a -1V es el pico característico de la disolución del agua en presencia de oxígeno.

Por otro lado en el punto de potencial de -500 mV, se encuentra un pequeño pico que está señalado con un círculo rosa, que podría ser un proceso específico del sensor en este medio pero que dada su baja intensidad no debe interferir con las señales mucho más intensas de los analitos.

Por último hay que señalar que no existen picos específicos porque no hay actividad redox en la disolución de KCl.

b. Ensayos en Ferro-ferri

En la Figura 88. Voltamograma de sensor CPE en ferro-ferri. se va a observar el voltamograma del sensor CPE sin modificar en la disolución de ferro-ferri.

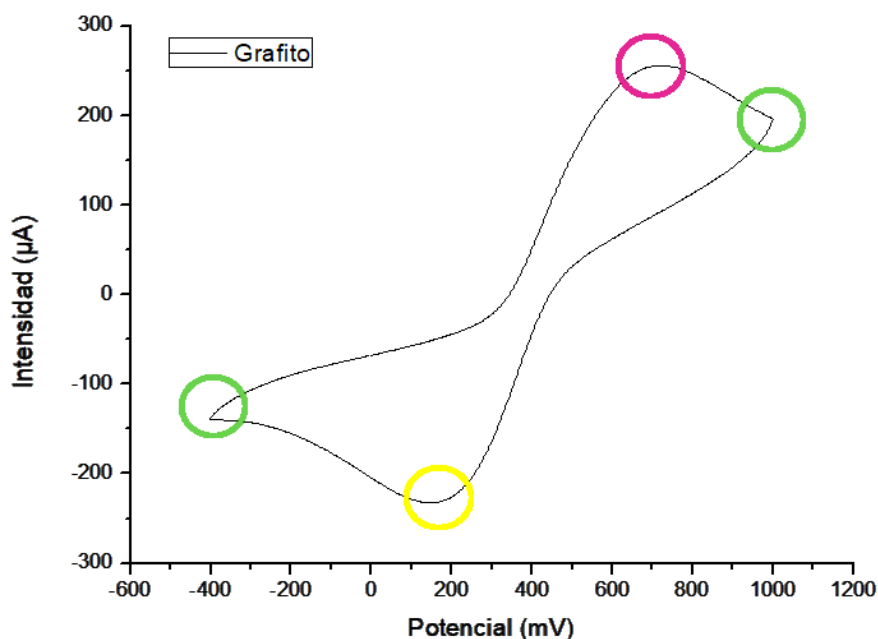


Figura 88. Voltamograma de sensor CPE en ferro-ferri.

En el voltamograma se observa como antes que en el potencial (eje X) en mV se enfrenta a la corriente (eje Y) en µA. La gráfica es el último ciclo de la VC (ciclo con estabilidad de la medida).

El voltamograma presenta varios picos de oxidación-reducción que indican que el sensor es capaz de detectar la oxidación y reducción de hierro II a hierro III, y además con intensidades de corriente elevadas. El potencial se ha fijado entre -400 a 1000 mV y es ahí donde se ven los bordes o extremos del ciclo que están señalados con dos círculos verdes.

Como hemos dicho a diferencia de los que ocurre con la disolución de KCl hay picos específicos correspondientes a la reacción redox con la disolución de ferro-ferri. En el barrido anódico aparece un pico señalado con un círculo de color rosa correspondiente a la oxidación de la reacción Fe II a Fe III, que se produce a un potencial de 700 mV, mientras que en el barrido se indica con un círculo de color amarillo, representa la reducción de la especie Fe III a Fe II, originada a un potencial de 200 mV.

4.1.2. Potenciométricos

Primeramente se va acondicionar la red de sensores potenciométricos en una disolución de KCl (cloruro potásico) con objeto de comprobar el correcto funcionamiento de la red de sensores. Seguidamente se va utilizar la red de sensores potenciométricos de modo conjunto y medidas simultáneas, lengua electrónica, para comprobar la capacidad para distinguir entre 5 sabores básicos. Estos cinco sabores van a ser 5 disoluciones que ya se explicó su elaboración en el Capítulo 3.

Se han elegido estas disoluciones por los siguientes motivos: La disolución de KCl se ha seleccionado porque es el electrolito base que se emplea para disolver los vinos que nos permite aumentar su conductividad iónica, por otra parte es una disolución donde no hay especies de oxidación-reducción que puedan interferir, y las disoluciones de los 5 sabores se han elegido porque se quiere poner a prueba la red de sensores y ver si discrimina entre las diferentes disoluciones puras que emulan los sabores básicos.

a. Ensayos en KCl

En la siguiente figura se va a poder ver la gráfica obtenida tras los registros potenciométricos de la red de sensores potenciométricos en la disolución de KCl una vez que se ha comprobado una alta estabilidad en la medida de este potencial se selecciona el valor final de potencial para cada una de los veinte sensores que constituyen la lengua.

Esta gráfica de la Figura 89. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en KCl. se ha conseguido con los datos registrados por el programa “**Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies)**”, y tratándolos con el programa “**Excel**”.

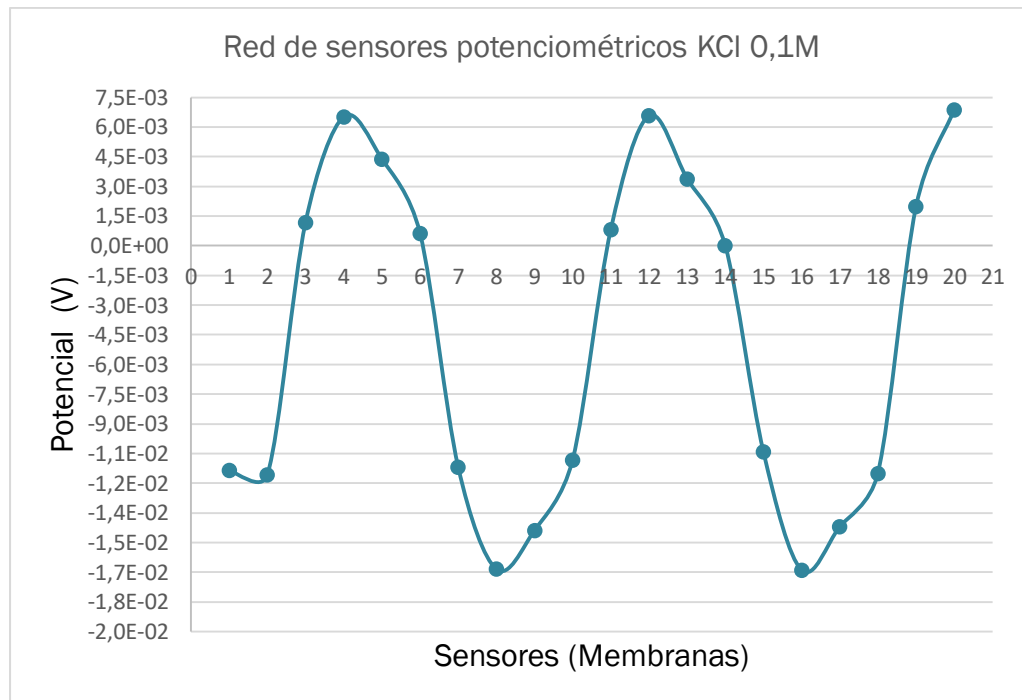


Figura 89. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en KCl.

Esta gráfica muestra la **huella dactilar** de los veinte sensores que constituyen la red de sensores en KCl, y se toma como punto de partida de la red. Se puede observar que cada una de las 20 membranas da un potencial.

También se ha comprobado que la red tenga alta **repetitividad**, para ello se han realizado varias medidas sin que se observen diferencias mayores del 5% en los datos de potencial registrados al final del barrido, salvo excepciones como se puede observar en la siguiente Figura 90. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en KCl, repetitividad.:

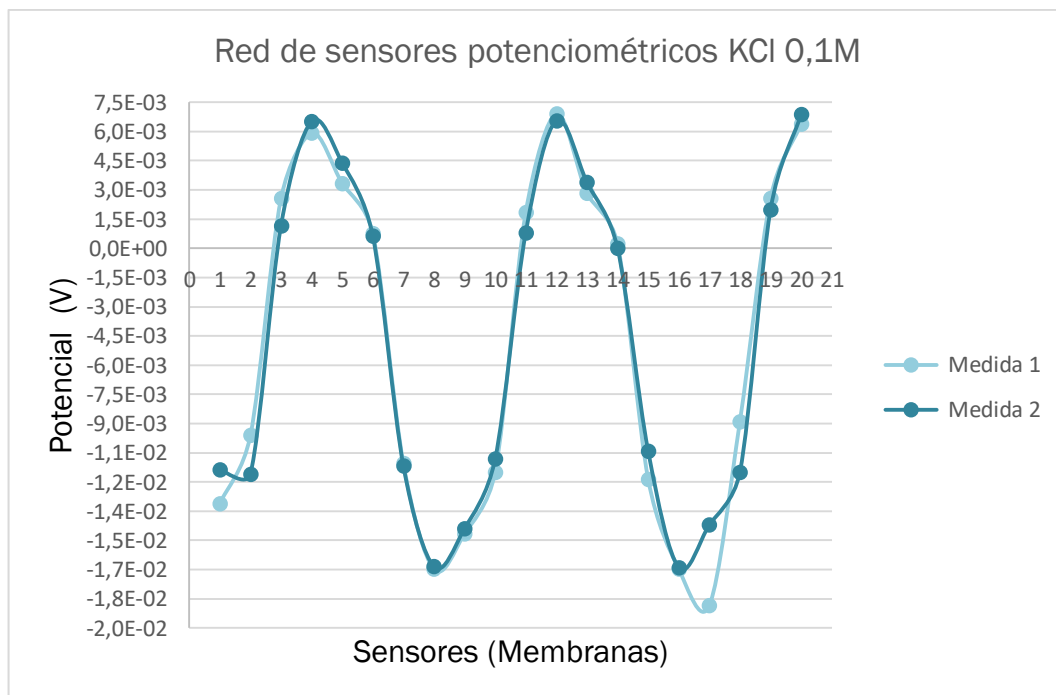


Figura 90. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en KCl, repetitividad.

En la gráfica, Figura 90. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en KCl, repetitividad., se puede observar que el mismo sensor repitiendo la medida tiene una repetitividad bastante buena. Casi la totalidad de las membranas coinciden en el mismo potencial que la primera medida. Esto quiere decir que el sensor es **fiable**.

Además como ya se ha explicado durante el trabajo en los anteriores capítulos, se han fabricado tres tamaños de esta red de sensores (grande, mediano y pequeño). En cada ensayo se utilizan **dos redes** de sensores de cada tamaño, en total cuarenta sensores de modo que hay dos idénticos y eso nos permite descartar algún valor en caso de que una membrana no funcione correctamente. Para conocer la reproducibilidad de los sensores, teniendo en cuenta que son dos redes físicamente distintas que además están montadas sobre soportes de diferente tamaño, podemos utilizar la siguiente gráfica, Figura 91. Gráfica de potenciometría de dos redes de sensores potenciométricos en KCl, reproducibilidad.:

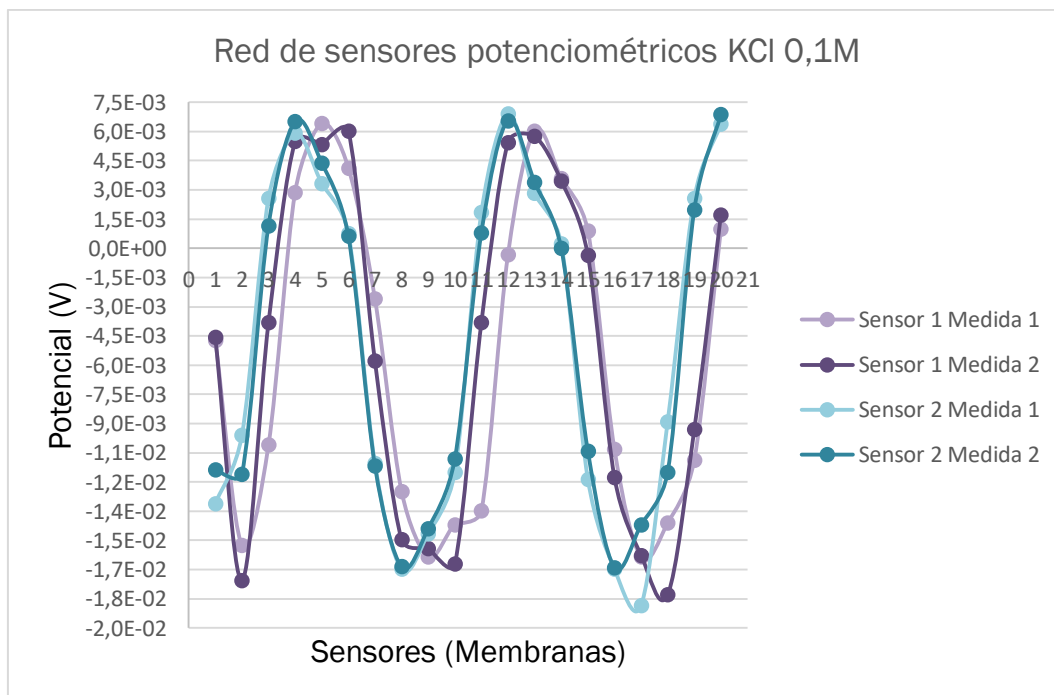


Figura 91. Gráfica de potenciometría de dos redes de sensores potenciométricos en KCl, reproducibilidad.

La gráfica muestra que las dos redes además de tener repetitividad cada una de ellas con la repetición de sus medidas (por eso cada red tiene medida 1 y medida 2), también tienen **buena reproducibilidad**. Ya que coinciden los potenciales de las 20 membranas de cada red de sensores. Cada red de sensores, sensor 1 y sensor 2, se refiere a cada tubo de metacrilato con las 20 membranas.

b. Mediciones para diferenciación de cinco sabores

A continuación, en este apartado se van a exponer los resultados obtenidos por la red de sensores potenciométricos utilizada como una lengua para distinguir entre los 5 sabores tipo. Se va a comprobar que discriminan las 5 disoluciones puras.

I. Dulce

Como disolución emulando el sabor dulce se va a optar por una disolución de glucosa. Ya explicada su fabricación en el Capítulo 3, como el resto de disoluciones para este procedimiento.

II. Salado

Como disolución emulando el sabor salado se va a elegir una disolución de cloruro sódico (NaCl).

III. Ácido

Para la disolución del sabor ácido se opta por una disolución de ácido cítrico.

IV. Amargo

El sabor amargo lo va a representar una disolución de urea.

V. Umami

Y el sabor umami, que se explica como el “regusto” que se queda en la boca después de comer algo, esto lo produce el compuesto glutamato monosódico que vamos a diluir en agua desionizada y con ello como se explicó en el Capítulo 3, se va a conseguir la disolución que va a formar el 5 sabor.

Seguidamente se va a mostrar la gráfica, Figura 92. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en las disoluciones de los 5 sabores., en la que la red de sensores va medir las disoluciones de los 5 sabores:

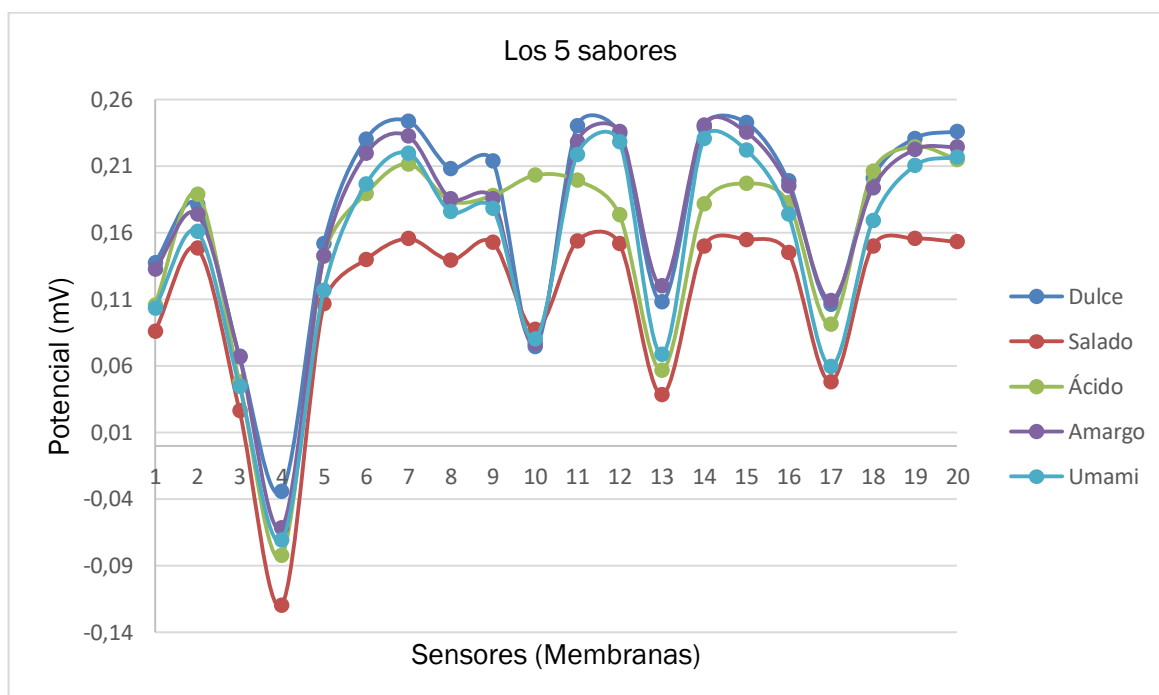


Figura 92. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en las disoluciones de los 5 sabores.

En la gráfica potenciométrica se ve la huella dactilar de cada uno de los 5 sabores, y la diferencia entre los sensores específicos (es decir, la diferencia entre las 20 membranas).

En general, observamos que todos los sensores tienen un comportamiento específico que es diferente del resto y que sigue el mismo patrón en las cinco disoluciones patrón. Al margen de este comportamiento general podemos observar algunas otras características que se comentan a continuación:

- El potencial correspondiente al sensor número 4 (membrana 4) es que muestra para todas las disoluciones el menor valor de potencial y es el sabor salado el que destaca por que es el sabor que más disminuye significativamente el potencial respecto al resto de sensores.
- A partir de la membrana 5 hasta la 9 los potenciales registrados para todas las disoluciones tienen valores de potencial más elevados si bien se ve que el sabor salado tiene un potencial más bajo significativamente que el resto de sabores.
- En el sensor 10 se observa que todas las disoluciones dan lugar a valores bajos de potencial exceptuando el ácido que es la que más destaca ya que se registran valores de potencial mucho más elevados que en el resto y más altos que para otros sensores en los que se registraban valores de potencial superiores para otros sabores.
- También se percibe que el comportamiento del sabor dulce que es la glucosa y del sabor umami que es el glutamato monosódico son siempre muy similares, esto es debido a que son del mismo grupo de compuestos orgánicos y por tanto es lógico que los valores de potencial se asemejen.

Aunque hay disoluciones como la del ácido cítrico (sabor ácido) y el cloruro sódico (sabor salado) que se distinguen más del resto por su comportamiento con los sensores, se ve claramente que se pueden distinguir los 5 sabores con la red de sensores, pues es capaz de distinguirlos a la perfección.

Los datos recogidos con el software “Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies)” y tratados con “Excel” también se han tratado con otro programa “**IBM SPSS Statics**”.

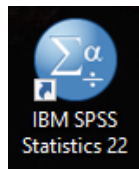


Figura 93. Icono Software IBM SPSS Statics.

Que ha proporcionado una LDA (análisis de discriminación lineal) que nos permite concluir que la red de sensores potenciométricos es capaz de realizar la diferenciación de los cinco sabores, Figura 94. Gráfica LDA 5 sabores.:

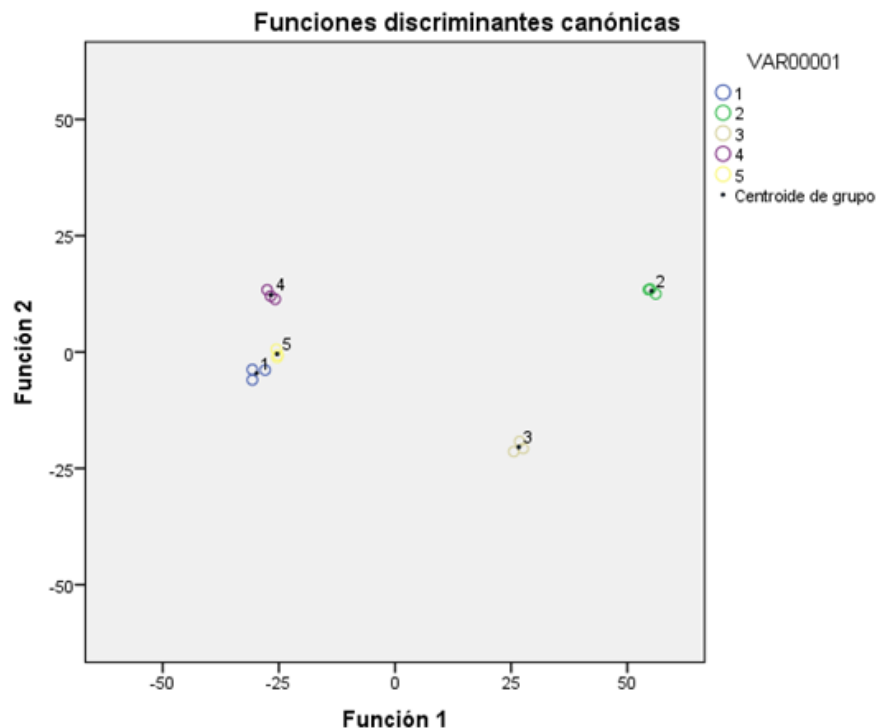


Figura 94. Gráfica LDA 5 sabores.

Se puede observar claramente la discriminación de cada uno de los sabores entre ellos. El número 2 pertenece al sabor salado (NaCl) y queda arriba a la derecha muy diferenciado del resto. El número 3 pertenece al sabor ácido y se encuentra en el lado derecho pero en la parte de abajo del plano, con una gran diferenciación del resto también. El número 4 pertenece al sabor amargo (la urea), y se encuentra en el lado izquierdo en la parte superior. Finalmente el número 1 representa el sabor dulce (la glucosa) y el número 5 el sabor umami (glutamato monosódico) que se encuentran muy próximos en la parte centro-izquierda de la gráfica. Estos dos últimos sabores quedan tan próximos porque como ya se ha comentado anteriormente pertenecen a la misma familia de compuestos orgánicos. Se puede concluir que la discriminación en el plano obtenida por la LDA es muy buena y diferencia los 5 sabores con buen resultado.

4.2. Análisis en zumos lácteos

En el siguiente apartado se van a describir los resultados experimentales que se han obtenido con los sensores diseñados en este proyecto, probándolos en zumos lácteos. El estudio va a consistir en el análisis de dos muestras de zumo que son iguales, en cuanto a composición y método de procesado, pero que se diferencian en que una de ellas está alterada, se le va a denominar

problema (P) y a la otra muestra se la nombra con el control (C). El objetivo de estudio es conocer si nuestro sistema de sensores es capaz de distinguir un zumo de otro, diferenciando claramente el zumo problema. Para realizar este estudio se han utilizado los dos tipos de sensores diseñados en este trabajo. Otro objetivo que se plantea es el estudio de los dos zumos control y problema con el tiempo, lo que hemos denominado envejecimiento.

4.2.1. Sensores voltamétricos

Se va a comenzar midiendo con los sensores voltamétricos. Primero se va a medir con los sensores CPE sin modificar, y después con los biosensores.

Primeramente se van a llevar a cabo las medidas con las muestras de zumos recién abiertas (Día 0), y finalmente se volverán a medir las muestras habiéndolas dejado envejecer abiertas durante 4 días (Día 4), para ver si los sensores consiguen distinguir el efecto del tiempo sobre los zumos y determinar si las dos muestras problema y control envejecen de la misma manera.

El estudio se realiza directamente sobre los zumos pero también se van a disolver las muestras en KCl para ver si mejora la respuesta.

Además se tratarán los datos con algunos programas para ver como son los resultados finales y las capacidades de discriminación de los sensores.

a. Respuesta de los sensores en zumos

Se van a observar los voltamogramas obtenido con “Origin8”.

Inicialmente se van a medir las dos muestra de zumo con el sensor CPE sin modificar en bruto (es decir, sin diluir).

- Sensor grafito (CPE) en zumo en bruto

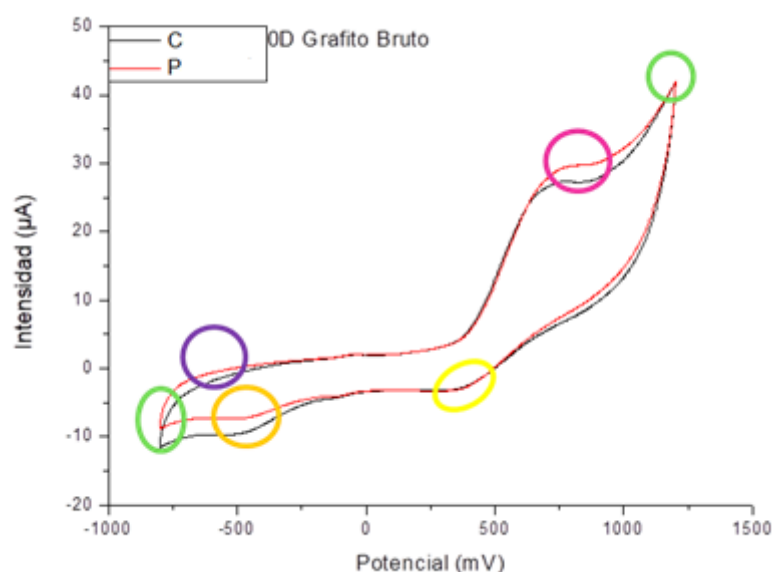


Figura 95. Voltamograma CPE en zumo bruto.

Se observa en el voltamograma, Figura 95. Voltamograma CPE en zumo bruto., los extremos señalados con los dos círculos verdes. En el potencial 750 mV indicado con un círculo rosa aparece un pico en el barrido anódico que se relaciona con la oxidación de alguna de las sustancias químicas que constituyen zumo que se está midiendo y también hay una pequeña oxidación en el potencial -600 mV señalada con un círculo morado, de alguna otra especie que tienen las muestras de zumo y que se oxida a potenciales muy negativos. En el valor de potencial 350 mV indicado con un círculo amarillo, es una reducción de una especie o de un grupo de compuestos y en el valor de potencial -500 mV, señalada con un círculo naranja, es la curva específica del sensor pero hay alguna especie de la muestra P de zumo que potencia la intensidad.

Es importante ver que el sensor diferencia bastante bien el zumo control (C) que pertenece a la curva negra de la muestra de zumo con alteraciones que es la curva roja esta última tiene las intensidades de corriente mayores en los potenciales que se han comentado, Figura 95. Voltamograma CPE en zumo bruto..

En el extremo inferior se ve que la muestra C tiene una corriente de valor -13 µA, mientras que la muestra P tiene una corriente de -9 µA. Y esto se repite durante todo el ciclo, en la deformación de la oxidación al potencial de 750 mV la muestra C tiene una corriente de 25 µA, mientras que la muestra P tiene un valor de 30 µA.

Con esto se concluye que el sensor de grafito CPE sin modificaciones midiendo el medio en bruto funciona correctamente con buenos resultados, diferenciando claramente las dos muestras.

- Sensor grafito (CPE) en zumo diluido en KCl.

Seguidamente, se va a comentar el voltamograma del sensor de grafito sin modificaciones en las muestras de zumo C y P pero diluidas en KCl, Figura 96. Voltamograma CPE en zumo diluido en KCl..

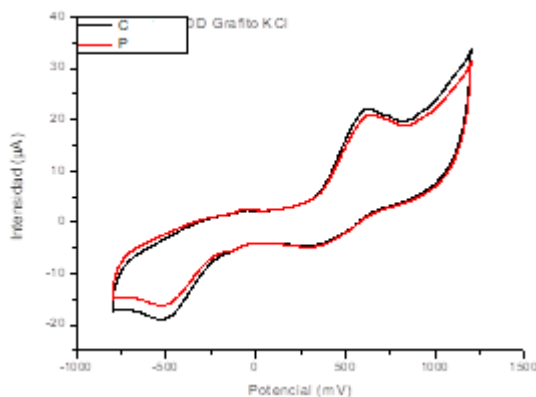


Figura 96. Voltamograma CPE en zumo diluido en KCl.

En este voltamograma, Figura 96. Voltamograma CPE en zumo diluido en KCl., se observa que los picos de oxidación y reducción cambian. La leve oxidación que había en el potencial -600 mV ya no se produce, en cambio el pico de oxidación del potencial 750 mV es mucho más pronunciado. También es más pronunciado el pico que especifica el sensor del potencial -500 mV.

Se ve que también se distinguen bien las dos muestras de zumo, aunque se discriminaban mejor con las muestras en bruto.

A continuación se pueden observar en la siguiente gráfica, Figura 97. Voltamograma CPE en zumo bruto y diluido en KCl., los voltamogramas del sensor de grafito de las dos muestras en bruto y diluidas:

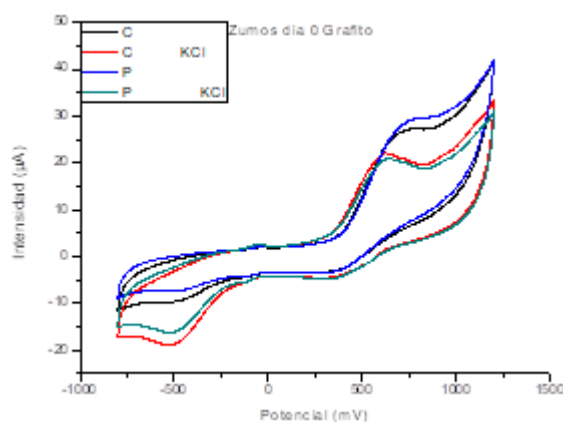


Figura 97. Voltamograma CPE en zumo bruto y diluido en KCl.

Se percibe que las intensidades de las muestras diluidas son siempre menores que las de las muestras en bruto. Y que se distinguen ligeramente mejor las muestras en bruto. Hay que señalar que la forma del voltamograma siempre es la misma aunque la muestra este en bruto o diluida.

- Biosensor de GOx en zumo bruto.

Ahora se va a probar el biosensor de GOx (glucosa oxidasa) en las dos muestras de zumo C y P, para ver como distingue.

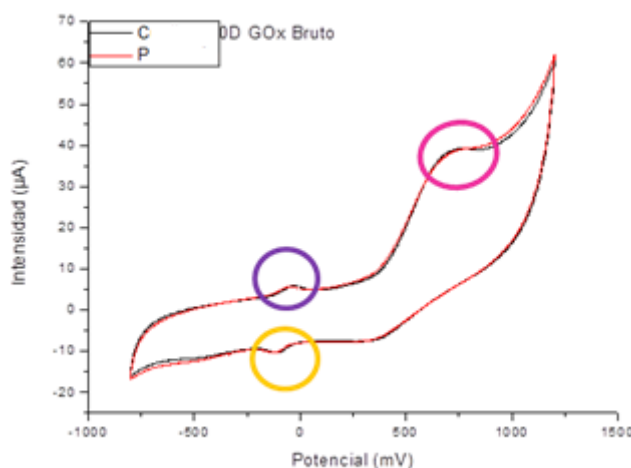


Figura 98. Voltamograma Biosensor GOx en zumo bruto.

Se observa en la Figura 98. Voltamograma Biosensor GOx en zumo bruto., que el biosensor tiene otros picos característicos en el voltamograma que el sensor CPE sin modificar.

Hay dos picos bien pronunciados, señalados con dos círculos morado y naranja, que son característicos del biosensor de GOx. Además también hay una curva pronunciada de oxidación señalada con un círculo rosa, esta también se producía en el sensor de grafito sin modificar.

Se ve que el biosensor distingue las dos muestras porque la muestra P (curva roja), tiene intensidades más amplias (en la oxidación intensidades mayores y en la reducción intensidades menores) que la muestra C (curva negra). Aun así se concluye que el biosensor funciona pero parece que a simple vista distingue menos las muestras que el sensor CPE sin modificar, esto podría ser porque las dos muestras tienen contenidos en azúcar muy similares y por tanto la diferencia entre ellas hay que buscarla fuera del contenido en azúcares.

- Biosensor de GOx en zumo diluido en KCl.

Seguidamente, se va a llevar a cabo la medición del biosensor de GOx en las dos muestras de zumo C y P diluidas en la disolución de KCl (Figura 99. Voltamograma Biosensor GOx en zumo diluido en KCl.).

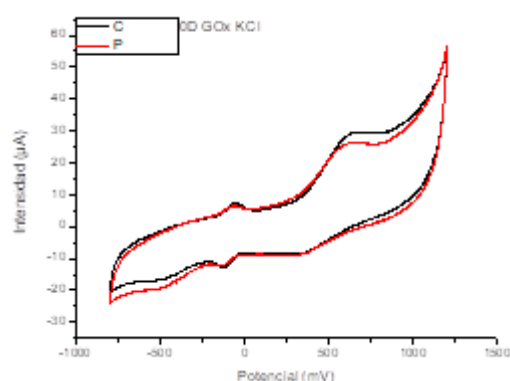


Figura 99. Voltamograma Biosensor GOx en zumo diluido en KCl.

En este caso los picos característicos coinciden con el voltamograma de las muestras en bruto, pero sí que se aprecia una ligera mejora de la discriminación del biosensor con la muestra diluida, pero en los picos característicos de la enzima entorno a cero voltios vuelven de nuevo a coincidir problema y control.

En la siguiente gráfica (Figura 100. Voltamograma biosensor de GOx en zumo bruto y diluido en KCl.) se pueden ver los 4 voltamogramas del biosensor de grafito en las dos muestras en bruto y diluidas:

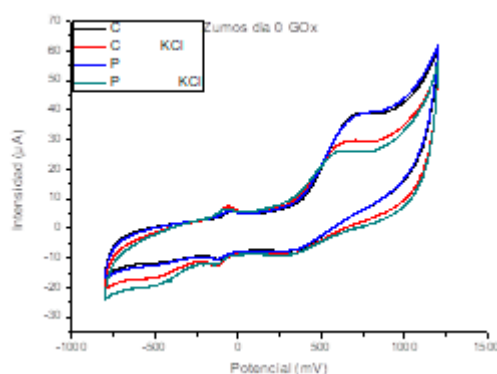


Figura 100. Voltamograma biosensor de GOx en zumo bruto y diluido en KCl.

En la Figura 100. Voltamograma biosensor de GOx en zumo bruto y diluido en KCl., se observa que las intensidades de las muestras diluidas son siempre más bajas que las de las muestras en bruto. Y que se discriminan bastante mejor las muestras diluidas en KCl. Hay que apuntar también que la forma del voltamograma es la misma este la muestra en bruto o diluido en KCl.

Finalmente, se van a proporcionar las gráficas de los dos sensores juntos para su **comparativa**.

- Sensor de grafito sin modificar y con el biosensor de GOx en zumo en bruto:

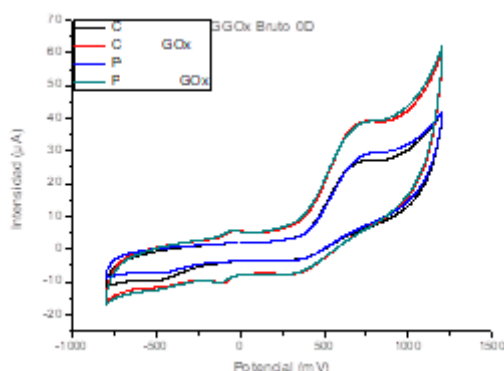


Figura 101. Voltamograma sensor CPE sin modificar y biosensor de GOx en zumo bruto.

Se observa en la Figura 101. Voltamograma sensor CPE sin modificar y biosensor de GOx en zumo bruto. que las intensidades del biosensor de GOx son mucho más amplias que las del sensor de CPE sin modificar. Además los voltamogramas muestran que las muestras de zumos en bruto se diferencian mejor con el sensor CPE sin modificar, ya que con el biosensor se distinguen pero van más solapadas. Y se ven en cada voltamograma los picos específicos de cada sensor, que se han explicado más detalladamente anteriormente.

- Sensor de grafito sin modificar y con el biosensor de GOx en zumo diluido en KCl:

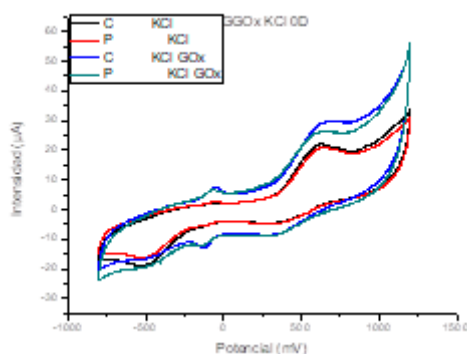


Figura 102. Voltamograma sensor CPE sin modificar y biosensor de GOx en zumo diluido en KCl.

Se puede percibir en la Figura 102. Voltamograma sensor CPE sin modificar y biosensor de GOx en zumo diluido en KCl. que nuevamente las intensidades de los voltamogramas de los biosensores tienen intensidades más amplias al igual que ocurre en las muestras en bruto. Mientras que ahora se observa que con las muestras de zumo diluidas los sensores que distinguen mejor con los biosensores, al contrario que en las muestras en bruto.

Finalmente se concluye que los sensores CPE sin modificar y los biosensores de GOx funcionan correctamente en las muestras de zumo, y distingue siempre entre la muestra control (C) y la muestra problema (P), aunque según si las muestras se encuentran diluidas o en bruto un tipo de sensor funciona mejor en un caso que en otro. Además como se ha ido describiendo detalladamente, se ven los picos característicos de cada sensor en todos los voltamogramas.

b. Discriminación mediante PCA

Los datos registrados y obtenidos de las voltametría con el software “NOVA 1.10”, se han tratado con el programa “MATLAB R2014b (32-bit)”:



Figura 103. Icono Software MATLAB R2014b.

Con Matlab se va a realizar el análisis de componentes principales (PCA) que ya se explicó en el Capítulo 3 apartado 3.3, en qué consistía. El objetivo es que mediante este análisis estadístico se consiga discriminar una muestra de la otra (la muestra P de la muestra C). Las respuestas van a ser gráficas en 2D y en 3D con la discriminación de cada muestra.

Para obtener las PCA se han tomado los valores registrados de las voltametrías de los sensores CPE sin modificar y de los biosensores de GOx unidos como si formaran ambos sensores una **red de sensores voltamétricos**, para mejorar la discriminación.

El resultado de las muestras de los zumos en bruto obtenido es el de la siguiente Figura 104. PCA en 3D zumos bruto con sensor CPE y biosensor GOx.:

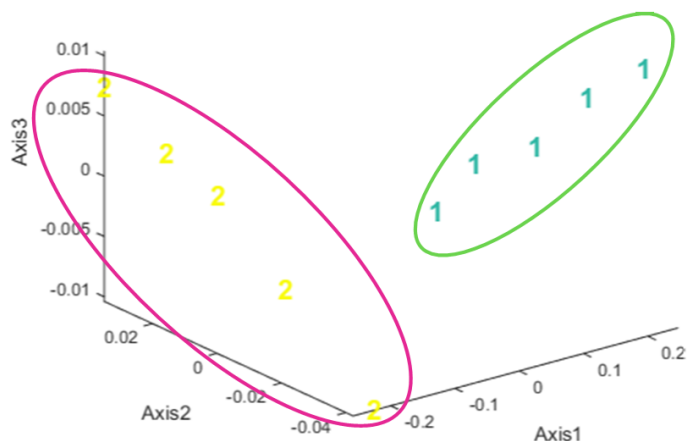


Figura 104. PCA en 3D zumos bruto con sensor CPE y biosensor GOx.

Donde el **número 1** representa a la muestra de **zumo en bruto de Control (C)**, mientras que el **número 2** pertenece a la muestra de **zumo en bruto Problema (P)**.

La gráfica es la proyección en 3D, donde se ve que la red de sensores voltamétricos distinguen perfectamente una muestra de otra, quedando la muestra C al lado derecho y la muestra P al lado izquierdo de la gráfica.

Se puede hacer una apreciación de la **deriva** de la muestra número 2, que es la muestra de control, pero no es muy relevante ya que los ejes tienen una escala pequeña.

La gráfica de la Figura 104. PCA en 3D zumos bruto con sensor CPE y biosensor GOx. se ha elaborado teniendo en cuenta de forma conjunta los dos barridos de oxidación y reducción. Y los cinco números que aparecen de cada muestra (es decir, 5 unos y 5 doses) representan las 5 medidas de cada muestra.

Por último se va a proporcionar la Tabla 4. Porcentaje componentes en PCA zumos en bruto sensor CPE y biosensor GOx. con el porcentaje de varianza que cubre cada componente (eje). Es una medida cuantitativa de la importancia tiene cada eje en la distribución.

Zumo en bruto (OD)		1º componente	2º componente	3º componente
Muestra: P + C	Todo			
Sensor: CPE +	(oxidación			
biosensor GOx	+ redcción)	98,8326	1,0839	0,0751

Tabla 4. Porcentaje componentes en PCA zumos en bruto sensor CPE y biosensor GOx.

En cada eje de la gráfica se representa una componente (de la ecuación que representa el punto en el espacio). El porcentaje es una forma de indicar la importancia que tiene cada eje en la distribución espacial, si un porcentaje de algún eje es muy pequeño significa que no tiene gran importancia y que con dos ejes se obtiene la misma diferenciación, es decir en 2D.

A continuación se va a mostrar la Figura 105. PCA en 3D zumos diluido con sensor CPE y biosensor GOx. correspondiente con la PCA de las muestras diluidas en KCl también el día 0 (OD), pero con la misma red de sensores voltamétricos, el sensor de CPE sin modificar y el biosensor modificado con GOx.

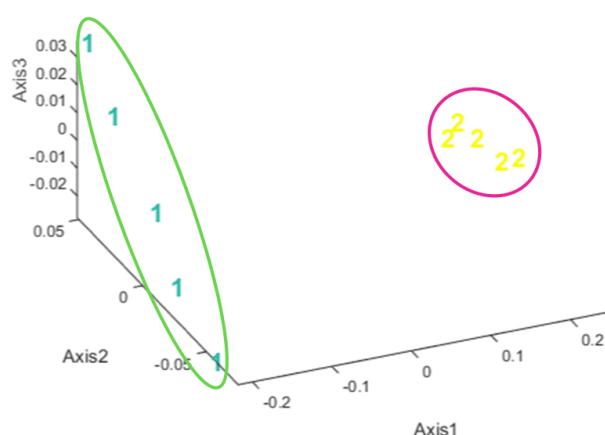


Figura 105. PCA en 3D zumos diluido con sensor CPE y biosensor GOx.

Donde el **número 1** representa a la muestra de **zumó diluido en KCl de Control (C)**, mientras que el **número 2** pertenece a la muestra de **zumó diluido en KCl Problema (P)**.

La gráfica es la proyección en 3D, donde se observa que la red de sensores voltamétricos se distinguen perfectamente ambas muestras, sin embargo a diferencia de las muestras de zumo en bruto, ahora la muestra C (nº1) ocupa el lado izquierdo de la gráfica y la muestra P (nº2) ocupa el lado derecho.

En este caso con el zumo diluido las medidas de la red de sensores en la PCA agrupan la muestra P mucho más que en las muestras en bruto y donde se encuentra la deriva en este caso es en la muestra C, aunque la escala es muy pequeña y la deriva apenas tiene importancia.

En esta gráfica está contenida la información suministrada por el barrido de oxidación y por el de la reducción. Con cinco ensayos para cada muestra.

Se adjunta la Tabla 5. Porcentaje componentes en PCA zumos diluidos en KCl sensor CPE y biosensor GOx. con el porcentaje de componentes en la PCA en los zumos diluidos con la red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor de GOx):

Zumos en bruto (4D)		1º componente	2º componente	3º componente
Muestra: P + C Sensor: CPE + biosensor GOx	Todo (oxidación + reducción)	94,9060	3,8807	1,0941

Tabla 5. Porcentaje componentes en PCA zumos diluidos en KCl sensor CPE y biosensor GOx.

Por tanto, podemos concluir que tanto en bruto como diluidos en KCl los sensores voltamétricos siguen distinguiendo perfectamente entre la muestra problema y la muestra control.

c. Correlaciones con los datos químicos, PLS

En este apartado se van a correlacionar los datos de las medidas tomadas de las muestras de estudio con los datos químicos suministrados por la empresa que nos ha proporcionado las muestras. Para ellos se van a tratar los datos con un programa llamado “Unscrambler X”.

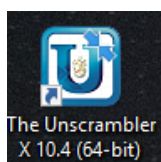


Figura 106. Icono Software Unscrambler X.

Los datos medidos que se han registrado con el software “NOVA 1.10”, se han tratado con “Origin8” y con “Matlab”, en este último se consigue una matriz que es fundamental ya que es la que se va a introducir en el software “The Unscrambler X”.

Una vez obtenida e introducida la matriz de los datos medidos, otros datos fundamentales que hay que introducir son los datos químicos de las muestras de estudio, estos son:

- % ACA (grado de acidez)
- pH
- Bx corregido
- Sedimento
- Viscosidad

Con ello el programa correlaciona todos los datos y se consiguen las **PLS** que son las regresiones de mínimos cuadrados parciales que como ya se explicó en el Capítulo 3, es un procedimiento estadístico con el objetivo de encontrar una regresión lineal por medio de la proyección de las variables de predicción y las variables observables (datos medidos y datos químicos a correlacionar).

Las respuestas obtenidas son las siguientes que se muestran en la Figura 107. PLS zumos correlación con todos los parámetros:

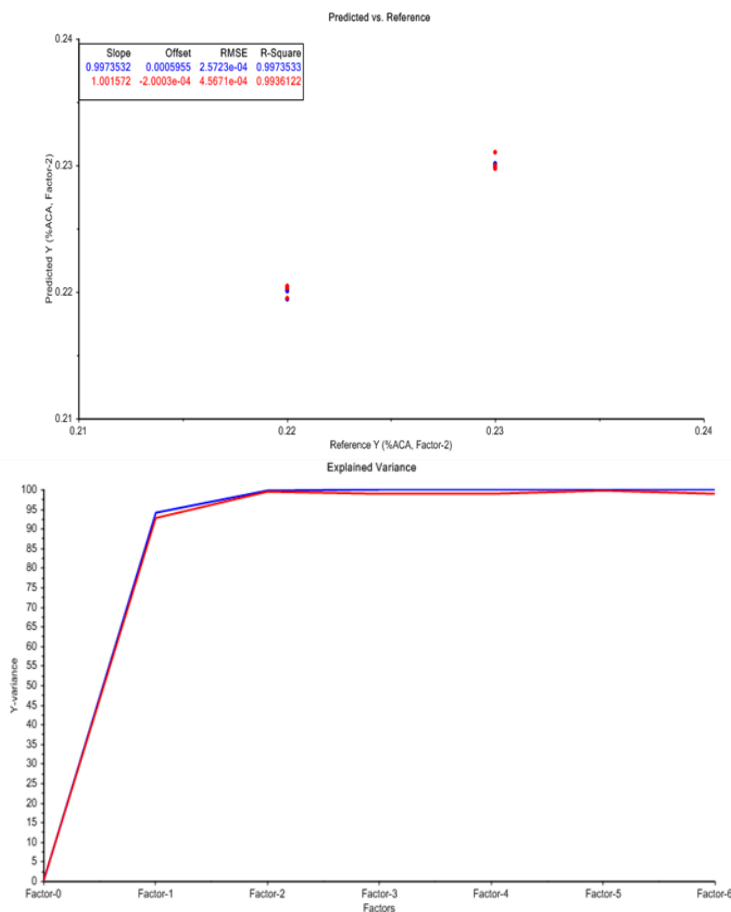


Figura 107. PLS zumos correlación con todos los parámetros

En la gráfica se observa que tanto el modelo de calibración que se corresponde con el color azul como el modelo de la predicción que corresponde con el color rojo, dan excelentes correlaciones entre los datos químicos y los datos proporcionados por el sensor.

Los datos químicos con conforman el modelo, valores de color azul, se introducen para entrenar el sistema de modo que cuando se metan los datos medidos por el sensor que conformará la predicción, valores rojos, el programa nos proporcione los datos químicos predichos, la diferencia entre los valores predichos y los reales es lo que se analiza en el modelo.

A continuación se va a facilitar la Tabla 6. Valores PLS en zumos. con los resultados detallados para cada uno de los datos químicos suministrados y el valor del modelo calibración y la predicción conseguido, y así se podrán comentar más minuciosamente los resultados obtenidos de este tratamiento:

	CALIBRACIÓN		PREDICCIÓN	
	R ²	RMSE	R ²	RMSE
Acidez (%ACA)	0,9973	2,57x10 ⁻⁴	0,9936	4,57x10 ⁻⁴
pH	0,9973	2,57x10 ⁻⁴	0,9936	4,57x10 ⁻⁴
Brix	0,9973	5,15 x10 ⁻⁴	0,9936	9,13x10 ⁻⁴
Sedimentos	0,9973	5,659x10 ⁻³	0,9936	0,0101
Viscosidad	0,9973	1,286x10 ⁻³	0,9936	0,0023
Todos los parámetros	0,9973	2,57x10 ⁻⁴	0,9936	4,57x10 ⁻⁴

Tabla 6. Valores PLS en zumos.

En el Capítulo 3 apartado 3.3 se explicó que significa cada parámetro.

Además tiene **Factor 2** (número de variables latentes), esto indica la bondad del sistema.

Se obtiene una buena recta de calibrado de la predicción que se ajusta al modelo. Por tanto los resultados son buenos y la predicción es válida la discriminación y la red de sensores voltamétricos es útil.

d. Efecto de envejecimiento

En este apartado se van a analizar los datos obtenidos con los sensores voltamétricos una vez que las muestras han sufrido un envejecimiento, es decir una vez abiertos los zumos se han dejado que envejezcan y cambien con ello las propiedades. La finalidad que se quiere observar es que los sensores sigan distinguiendo la muestra P de la muestra C y que se siga discriminando una de otra al hacer el tratamiento de datos, y ver si los resultados se modifican en los dos zumos control y problema del mismo modo.

Se van a observar los voltamogramas obtenido con “Origin8”.

- Sensor grafito (CPE) en zumo en bruto día 0 (OD) y envejecido (4D).

Se ha medido cada muestra envejecida con el sensor CPE sin modificar y a continuación se proporciona una comparación de cada muestra C y P por separado con la medida correspondiente del zumo en bruto sin envejecimiento, para observar cómo cambia el voltamograma en cada caso:

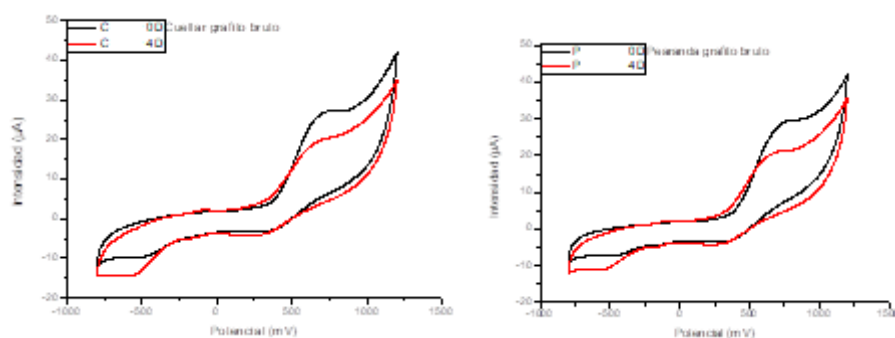


Figura 108. Voltamogramas sensor CPE sin modificar zumos en bruto OD y envejecidos (4D).

En la Figura 108. Voltamogramas sensor CPE sin modificar zumos en bruto OD y envejecidos (4D)., a la izquierda se encuentran los dos voltamogramas de la muestra de Control el día 0 (OD) representada por el color negro y la misma muestra envejecida día 4 (4D) representada por el color rojo. El sensor es capaz de diferenciar entre las dos medidas, las dos medidas tienen la misma forma, pero las intensidades de la muestra envejecida son menores, siempre son más bajas que las del OD. A la derecha están los voltamogramas de la muestra Problema donde también la muestra de OD está representada en negro y la muestra 4D se representa en rojo. Y pasa lo mismo que con la muestra C, los voltamogramas de la muestra P tienen la misma forma entre ellos, pero las intensidades son más bajas en el envejecimiento, por tanto vemos que el sensor es capaz de diferenciar el envejecimiento de la muestra OD.

- Sensor grafito (CPE) en zumo diluido en KCl día 0 (OD) y envejecido (4D).

Las medidas de las muestras envejecidas con el sensor CPE sin modificar se muestran seguidamente en la Figura 109. Voltamogramas sensor CPE sin modificar zumos diluidos en KCl OD y envejecidos (4D)., como se ha expuesto anteriormente, se presenta una comparación de cada muestra C y P por separado con la medida correspondiente del zumo esta vez diluido en KCl OD y envejecido 4D, para observar cómo varía el voltamograma:

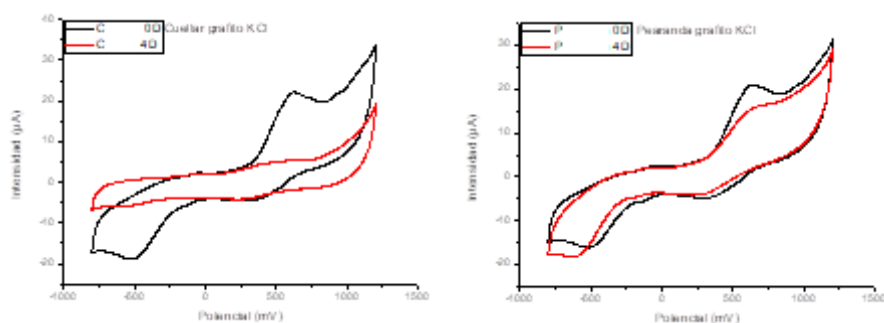


Figura 109. Voltamogramas sensor CPE sin modificar zumos diluidos en KCl OD y envejecidos (4D).

Como comentarios a estas gráficas de la Figura 109. Voltamogramas sensor CPE sin modificar zumos diluidos en KCl OD y envejecidos (4D)., se puede decir que a la izquierda se encuentran los voltamogramas de la muestra C el día 0 (OD) representada por el color negro y la misma muestra envejecida día 4 (4D) representada por el color rojo. El sensor es capaz de diferenciar entre las dos medidas, pero se observa que el voltamograma del zumo envejecido es muy plano y tiene poca intensidad, apenas se observan picos de oxidación y reducción nítidos, por lo tanto esto hace pensar que los resultados de la muestra en bruto son mejores. A la derecha están los voltamogramas de la muestra P donde también la muestra de OD está representada en negro y la muestra 4D se representa en rojo. Lo que ocurre en este caso es que los voltamogramas tienen la misma forma entre ellos, pero las intensidades son más bajas en el envejecimiento, aunque se solapan bastante entre ellos. El sensor es capaz de diferenciar las muestras también diluidas en KCl, aunque los resultados de las muestras en bruto parecen a simple vista mejores.

- Biosensor GOx en zumo en bruto y diluido en KCl, envejecido (4D).

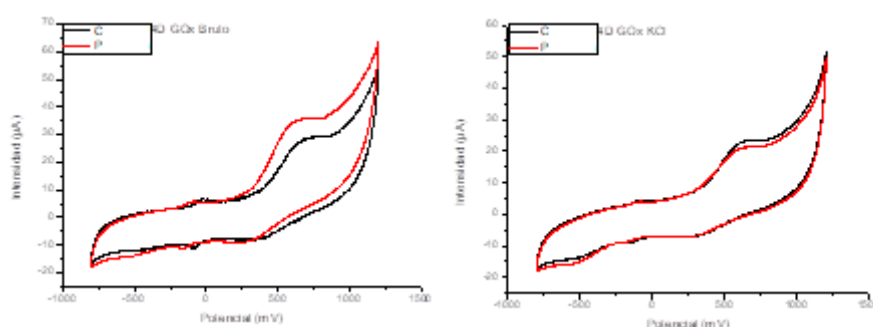


Figura 110. Voltamogramas biosensor GOx zumos en bruto y diluidos en KCl envejecidos (4D).

Los voltamogramas que se exponen corresponden a las medidas del biosensor GOx en las muestras C y P de zumo envejecido en bruto a la derecha y a la izquierda las muestras de C y P de zumo envejecido diluido en KCl.

En la del zumo en bruto envejecido (4D) se ve que el sensor discrimina perfectamente la muestra control (en negro) de la muestra problema (en rojo) donde ambas presentan una forma similar pero la muestra problema tiene intensidades más elevadas.

A la derecha se ve la gráfica donde se ven las muestras envejecidas, diluidas y el biosensor también distingue entre C y P pero los voltamogramas están más solapados, con lo que se concluye que las medidas con el biosensor también son mejores cuando la muestra está en bruto.

- **Comparativa** de Sensor CPE y biosensor GOx en zumo en bruto, envejecido (4D).

En la siguiente gráfica (Figura 111. Voltamogramas sensor CPE y biosensor GOx zumos en bruto envejecidos (4D).) se muestran los voltamogramas de los sensores CPE y los biosensores de GOx de las dos muestras C y P envejecidas (4D):

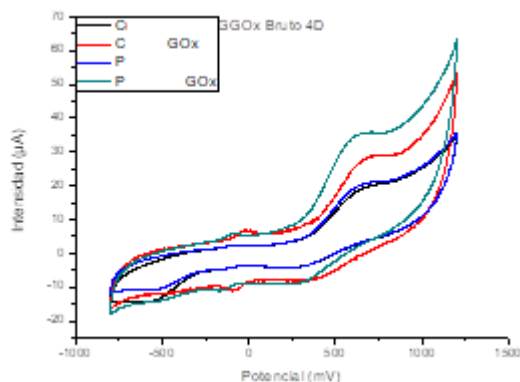


Figura 111. Voltamogramas sensor CPE y biosensor GOx zumos en bruto envejecidos (4D).

Los dos voltamogramas del sensor CPE se ve que tienen la misma forma con sus curvas características aunque se diferencian entre ellas, para el mismo potencial la muestra control (en negro) siempre tiene menores intensidades que la muestra problema (en azul).

Además se observa que los voltamogramas de los biosensores de GOx tienen también la misma forma con sus picos característicos, se observan los picos adicionales de la enzima, y que de nuevo entre ellos se diferencian en que, como pasa con los CPE, la muestra problema (en verde) tiene mayores intensidades que la muestra control (en rojo).

Se puede observar en la gráfica el efecto de la enzima, los biosensores tienen unos voltamogramas más amplios (grandes) con mayores intensidades respecto a los voltamogramas de los sensores CPE y además los biosensores GOx tienen picos adicionales característicos.

CONCLUSIÓN

Con las gráficas expuestas, se concluye que los sensores voltamétricos diseñados (CPE y biosensor de GOx) son capaces de distinguir:

- Entre las muestras de control y problema.
- Entre las muestras día 0 (OD) y envejecidas (4D).
- Y en los voltamogramas se ven las diferencias entre las curvas y picos característicos del sensor CPE y del biosensor de GOx.

Por tanto los sensores tienen un buen funcionamiento y son óptimos para la discriminación de muestras.

Seguidamente se van a facilitar las **PCA** que se han obtenido del tratamiento de datos de las **muestras envejecidas**.

Para conseguir las PCA se han tomado los valores registrados de las voltametrías de los sensores CPE sin modificar y de los biosensores de GOx unidos como si formaran ambos sensores una **red de sensores voltamétricos**, para mejorar la discriminación, como ya se hizo con las muestras de zumo del día 0 (OD). Al igual que en ese caso también se han considerado conjuntamente la rama de oxidación y la de reducción.

El resultado de las muestras de los zumos en bruto OD y 4D (envejecidos) obtenido es la siguiente Figura 112. PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras zumo C y P en bruto, OD y 4D.:

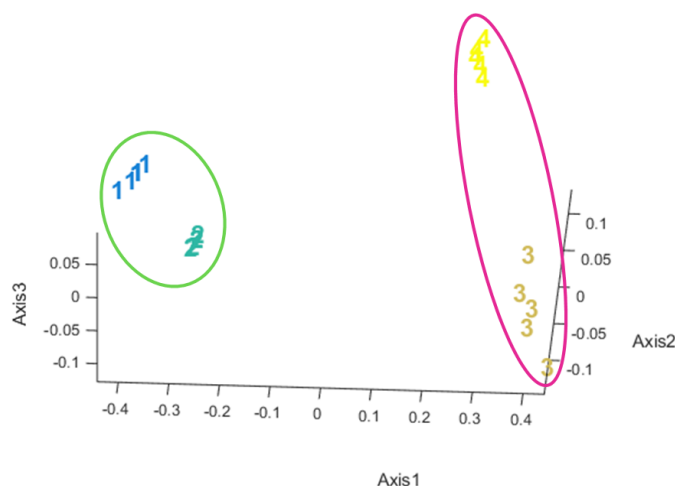


Figura 112. PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras zumo C y P en bruto, OD y 4D.

En la siguiente Tabla 7. Identificación números PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras de zumos en bruto C y P, OD y 4D. se muestra a que representa cada número:

Muestras	Días
----------	------

	0D	4D
Control	1	3
Problema	2	4

Tabla 7. Identificación números PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras de zumos en bruto C y P, 0D y 4D.

Esta PCA contiene 5 medidas de cada muestra y contempla conjuntamente la oxidación y reducción de las muestras.

Como se puede observar en la gráfica de la PCA hay 4 muestras, los números pertenecientes a la muestra del día 0 (0D), (1 y 2) se encuentran en la parte izquierda de la gráfica (señalados con un círculo **verde**), mientras que los números pertenecientes a la muestra 4D (3 y 4) están en la parte derecha de la gráfica (señalados con un círculo **rosa**). Por tanto los sensores distinguen perfectamente el efecto del envejecimiento para las dos muestras, las del día 0 y las envejecidas del día 4.

Se aporta el porcentaje de los componentes en la Tabla 8. Porcentaje componentes en PCA zumos en bruto red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P, 0D y 4D.:

Zumo en bruto 0D y 4D		1º componente	2º componente	3º componente
Muestra: P + C	Todo	86,1882	8,3476	5,1301
Sensor: CPE + biosensor GOx	(oxidación + reducción)			

Tabla 8. Porcentaje componentes en PCA zumos en bruto red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P, 0D y 4D.

Seguidamente, se van a aportar la Figura 113. PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras zumo C y P diluidas en KCl, 0D y 4D. que contiene la PCA de los sensores CPE sin modificar y de los biosensores de GOx unidos formando una **red de sensores voltamétricos**, con las muestras de los zumos 0D y 4D diluidos en KCl:

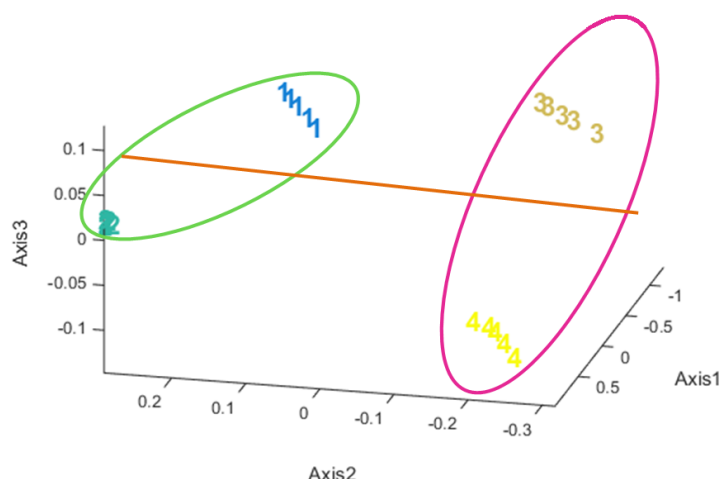


Figura 113. PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras zumo C y P diluidas en KCl, OD y 4D.

En la Tabla 9. Identificación números PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P de zumos diluido en KCl, OD y 4D. se muestra a que representa cada número:

Muestras	Días	
	OD	4D
Control	1	3
Problema	2	4

Tabla 9. Identificación números PCA red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P de zumos diluido en KCl, OD y 4D.

Esta PCA contiene 5 medidas en cada muestra y se ha considerado conjuntamente los barridos de oxidación y reducción de cada ensayo.

En la gráfica de la PCA hay 4 muestras, los números pertenecientes a la muestra del día 0 (OD), (1 y 2) se encuentran en la parte izquierda de la gráfica (señalados con un círculo verde), mientras que los números pertenecientes a la muestra 4D, (3 y 4) están en la parte derecha de la gráfica (señalados con un círculo rosa). Por tanto los sensores distinguen entre las dos muestras, las del día 0 y las envejecidas del día 4.

Además las muestras con los números 1 y 3 son las pertenecientes a la muestra control y se encuentra en la parte superior de la gráfica (parte de arriba de la línea naranja), mientras que las muestra 2 y 4 pertenecientes a la muestra problema están en la parte de debajo de la gráfica (parte de abajo de la línea naranja).

Se aporta el porcentaje de los componentes en la Tabla 10. Porcentaje componentes en PCA zumos diluidos en KCl red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P, OD y 4D.:

Zumoo diluido en KCl OD y 4D		1º componente	2º componente	3º componente
Muestra: P + C	Todo	90,7633	7,8987	1,0884
Sensor: CPE + biosensor GOx	(oxidación + reducción)			

Tabla 10. Porcentaje componentes en PCA zumos diluidos en KCl red de sensores voltamétricos (CPE y biosensor GOx) muestras C y P, OD y 4D.

Se concluye que con el tratamiento de datos la red de sensores voltamétrica consigue una buena discriminación de las muestras. Estos sensores son óptimos para diferenciar entre la muestra control y la muestra problema así como el efecto del envejecimiento. Los ensayos pueden realizarse correctamente tanto en bruto como diluidos en KCl.

4.2.2. Sensores potenciométricos

En este apartado se van a medir las muestras de zumos lácteos con los sensores potenciométricos. Se van a medir las dos muestras de zumo lácteo, la muestra control y la muestra problema. De esta forma se verá el comportamiento de la red de sensores potenciométricos que se han diseñado en este trabajo en un medio como el zumo lácteo, que es un medio complicado ya que presenta bastante acidez.

a. Respuesta de los sensores en zumos

En la siguiente Figura 114. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en zumo lácteo (muestras C y P). se observa los resultados obtenidos en la red de sensores potenciométricos en las muestras de zumo lácteo: Control y Problema.

Esta gráfica se ha conseguido con los datos registrados por el programa “**Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies)**”, y tratándolos con el programa “**Excel**”.

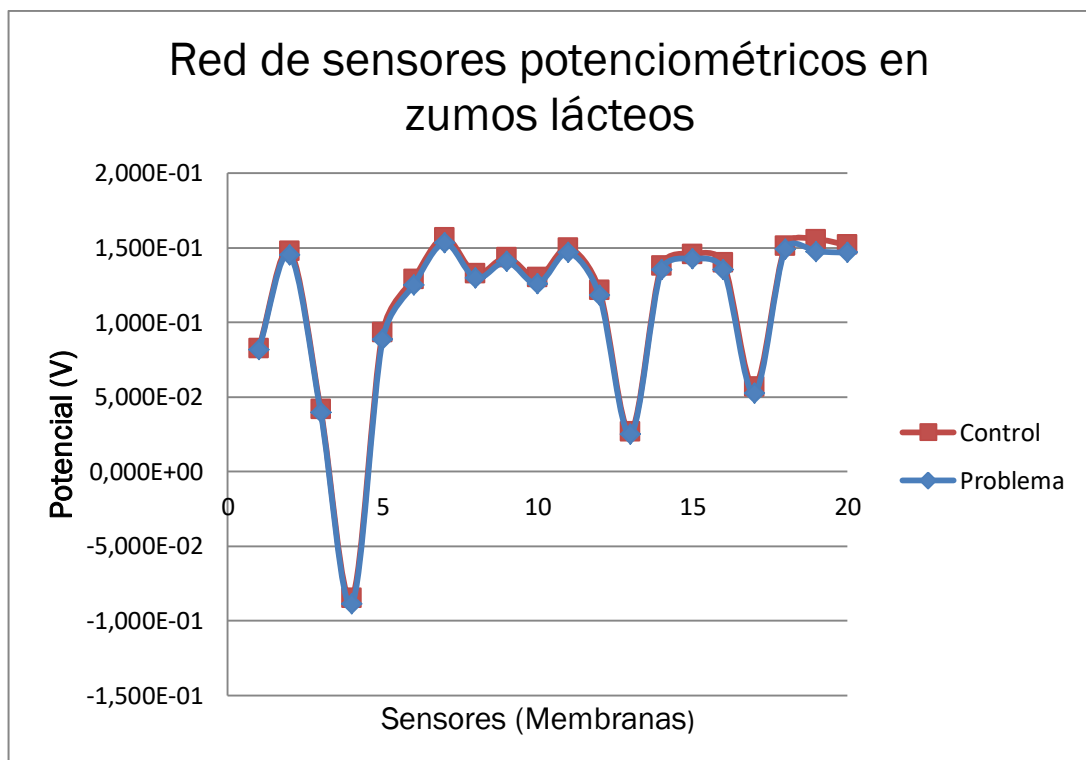


Figura 114. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en zumo lácteo (muestras C y P).

Esta gráfica (Figura 114. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en zumo lácteo (muestras C y P).) muestra la **huella dactilar** de la red de sensores en las muestras de zumo lácteo C y P (control y problema), de esta forma se ve el comportamiento de la red de sensores en un medio como el zumo lácteo que es compleja por su composición y acidez. Hay que tener esto en cuenta ya que con la grasa que puede tener el zumo ya que contiene una parte láctea y que es bastante ácido, puede dañar las membranas (en algunas ocasiones es aconsejable diluir este tipo de muestras en disoluciones de KCl para que no sea tan agresivo el medio). Se puede observar que cada una de las 20 membranas da un potencial.

Como comentario a la gráfica, cada membrana ofrece un potencial característico diferente, que es la huella dactilar de la muestra, pero a simple

vista se observa que ambas muestras se solapan constantemente aunque la muestra control (C) siempre tiene potenciales un poco más elevados que la muestra problema (P).

A pesar de la similitud de datos entre la muestra problema y patrón se pensó aplicar el análisis estadístico para tratar de diferenciar entre ellas no obstante esto no se puede realizar ni el análisis de discriminación lineal (LDA), ni la correlación con los datos químicos (MLR), ya que el problema es que este tratamiento de datos no se puede llevar a cabo dado que solo se cuenta con dos muestras (Control y Problema), por tanto al hacer la inclusión por pasos el programa estadístico elimina una para analizar el resto de muestras y al ser dos muestras es imposible llevarlo a cabo. Como se ha mencionado, la MLR tampoco se puede realizar ya que el análisis LDA es fundamental y previo para la realización de la posterior correlación y obtención de la MLR.

4.3. Análisis en distintas variedades de vinos

En el siguiente apartado se van a mostrar y comentar los resultados experimentales que se han logrado con la red sensores voltamétricos y la red de sensores potenciométricos que se han diseñado y fabricado en este trabajo, midiendo en primer lugar vinos de una misma variedad de uva y diferentes grados de envejecimiento y en segundo lugar la medida de vinos de diferentes variedades de uva para ver si las redes de sensores diseñadas son capaces de diferenciarlos y discriminarlos en función de su variedad y grado de envejecimiento.

El **vino** es una bebida alcohólica que se fabrica a partir de la uva. El proceso implica la fermentación alcohólica total o parcial del zumo de uvas maduras (mosto) por medio de la acción metabólica de levaduras.

El vino está formado por diferentes componentes: el **agua** (82-88%), el **alcohol** (7-17% dependiendo del tipo de vino, el alcohol surge por la fermentación y le da cuerpo y aroma al vino), azúcares (aportan sabor), taninos (aportan color y textura), sustancias volátiles (aportan aroma), ácidos (participan en el sabor del vino).

La cantidad en la que cada uno de estos componentes, que aparecen en el vino, depende: del clima, el suelo y la vid que da las uvas. Estos son factores que influyen en la calidad de la uva y por tanto en la calidad del vino final.

Hay varias formas de **clasificar los vinos**, algunas de estas clasificaciones son por: el color del vino, la edad del vino, el tipo de uva, entre otras.

Dependiendo de la uva utilizada pueden ser vinos tintos, blancos o rosados. Además también dependiendo del tipo de uva de la cual el vino provenga tendrá unas características u otras.

Otra clasificación importante, que atañe a este trabajo es la de la **edad del vino**, existen vinos jóvenes, crianzas, reserva y gran reserva [33].

El procedimiento seguido en este proyecto se va a basar en distinguir entre distintas muestras de vino. Primero entre **4 variedades de vinos jóvenes**, es decir 4 vinos jóvenes de distinto tipo de uva: **garnacha, mencía, tinta de toro y tempranillo**.

Y a continuación la discriminación entre otras **4 variedades de vino de uva tempranillo**, según su **envejecimiento: joven** (6 meses de envejecimiento), **crianza** (12 meses de envejecimiento), **reserva** (3-4 años de envejecimiento) y **gran reserva** (5-6 años de envejecimiento).

Todos los **vinos** que se han estudiado en este trabajo son **tintos**.

Se adjunta la Tabla 11. Vinos jóvenes 4 tipos de uvas. y la Tabla 12. Vinos envejecidos, uva tempranillo. con los tipos de vino que se van a utilizar y las nomenclaturas que se han seguido en la identificación de cada uno de ellos:

Joven (6 meses)	
Tipo de uva (tinto)	Nomenclatura
Tempranillo	A
Tinta de toro	B
Mencía	C
Garnacha	D

Tabla 11. Vinos jóvenes 4 tipos de uvas.

Tipo de uva: Tempranillo (tinto)		
Envejecimiento	Nombre	Nomenclatura
6 meses	Joven	A
12 meses	Crianza	X
3-4 años	Reserva	Y
5-6 años	Gran reserva	Z

Tabla 12. Vinos envejecidos, uva tempranillo.

El objetivo es que los sensores distingan un vino de otro, diferenciando claramente cada tipo de vino en función de su origen y de su grado de envejecimiento.

4.3.1. Sensores voltamétricos

Primeramente se va a medir con los sensores voltamétricos, el sensor CPE sin modificar, a continuación el biosensor GOx (glucosa oxidasa) y seguidamente el biosensor Tyr (tirosinasa). En este caso dado que los fenoles son sustancias

fundamentales que influyen decisivamente en el vino se ha incluido un nuevo sensor modificado con tirosinasa, enzima que cataliza la reacción química de los fenoles a cetonas.

Se van a llevar a cabo las medidas con las 4 muestras de vinos jóvenes de las distintas uvas y después se medirán las 4 muestras de la uva tempranillo de distinto envejecimiento, para ver si los sensores consiguen distinguir cada muestra.

Además se tratarán los datos con algunos programas estadísticos para poder extraer mayor información de los datos obtenidos y visualizar gráficamente los resultados finales y las discriminaciones de los sensores.

a. Respuesta de los sensores en vinos

Se van a mostrar los voltamogramas obtenidos con “Origin8” para los distintos vinos.

MUESTRAS VINOS JÓVENES

Inicialmente se van a medir las 4 muestras de vinos jóvenes con distinto tipo de uva: Garnacha (Gr), Tempranillo (Temp), Tinta de Toro (TT), Mencía (Men) con los 3 tipos de sensores voltamétricos.

- Sensor grafito (CPE) en 4 muestras de vinos jóvenes

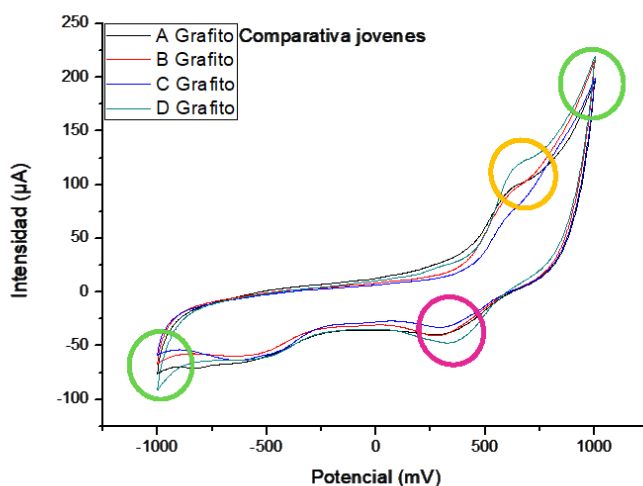


Figura 115. Voltamograma vinos jóvenes sensor CPE.

Se observa en la Figura 115. Voltamograma vinos jóvenes sensor CPE. que durante todo el voltamograma el sensor CPE consigue diferenciar las 4 muestras de los vinos jóvenes si bien en todos los casos el voltamograma

tiene una morfología similar. Los extremos señalados con los dos círculos verdes, son los extremos del barrido y el pico a potenciales más bajos se relaciona con la disolución del agua en presencia de oxígeno, en este punto es donde vemos que el vino D (uva garnacha) tiene una intensidad más baja que el resto. En el potencial 750 mV indicado con un círculo naranja está el pico anódico que corresponde posiblemente a la oxidación de los compuestos fenólicos las muestras (los 4 vinos jóvenes) que se están midiendo. En el potencial 400 mV se produce una reducción de estas especies fenólicas, señalado con un círculo rosa donde se ve que cada vino tiene una intensidad, es otro buen punto para diferenciar cada muestra. Las 4 muestras de vinos jóvenes siguen la misma forma de voltamograma pero cada vino tiene sus propias intensidades en el potencial correspondiente que también se modifica ligeramente en función del vino analizado.

Es importante ver que el sensor diferencia bastante bien las 4 muestras de vino de distinta uva. Los voltamogramas muestran que el vino D (uva Gr) tienen intensidades más amplias es decir en la oxidación intensidades más altas y en la reducción intensidades más bajas; mientras que el C (uva Men) tiene las intensidades menos amplias (tiene las intensidades más pequeñas tanto en la oxidación como en la reducción). El vino B (Uva TT), destaca con intensidades altas en el extremo superior del voltamograma. Y el vino A (Uva Temp) destaca porque tiene intensidades bajas en el extremo inferior del voltamograma.

Con esto se concluye que el sensor de grafito CPE sin modificaciones midiendo los 4 vinos jóvenes funciona correctamente con buenos resultados, diferenciando claramente las 4 muestras.

- Biosensor GOx en 4 muestras de vinos jóvenes

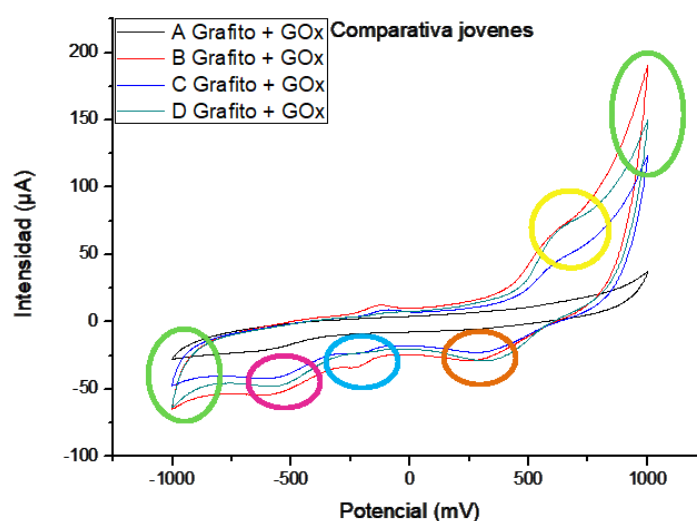


Figura 116. Voltamograma vinos jóvenes biosensor GOx.

Los voltamogramas de la Figura 116. Voltamograma vinos jóvenes biosensor GOx., muestran que el biosensor GOx consigue diferenciar las 4 muestras de los vinos jóvenes. El voltamograma con la línea en negro que corresponde al vino A (Temp), indica que el biosensor GOx da lugar a intensidades mucho más bajas para esta muestra, ya que todo el voltamograma es mucho más plano y sin picos diferenciados. El resto presenta una morfología similar aunque consigue diferenciar los 4 vinos perfectamente.

Los extremos señalados con los dos círculos **verdes**, corresponde a los extremos del barrido, se observa que el vino B (TT) destaca por sus amplias intensidades en ambos extremos, especialmente a los potenciales más negativos correspondiente a la disolución de agua. Y esto sucede durante todo el voltamograma las intensidades de este vino son más grandes que las del resto. Mientras que el vino C (Mencía) con el voltamograma azul tiene las intensidades tiene una intensidad más baja que el resto. En el potencial 750 mV indicado con un círculo **amarillo** aparecen los picos de oxidación de los compuestos fenólicos fundamentalmente y es donde destaca que el vino C tiene menor intensidad que las muestras B y D. En el potencial 400 mV se produce una reducción de estos compuestos, señalado con un círculo **naranja** donde se ve que cada vino tiene una intensidad, a la vez que ocurre lo mismo en el potencial -250 mV señalado con un círculo **azul** que podría corresponder a la reducción de azúcares al igual que en el potencial -500 mV señalado con un círculo **rosa**, son buenos picos para diferenciar cada muestra. Los picos correspondientes a estos en el barrido anódico que indican las reacciones catalizadas por la glucosa oxidasa se muestran en negro. Por tanto, estos últimos serían los picos característicos del biosensor GOx en reducción y oxidación.

Se puede decir que el biosensor GOx midiendo las 4 muestras aporta resultados óptimos a la hora de diferenciar los 4 vinos jóvenes.

- Biosensor Tyr en 4 muestras de vinos jóvenes

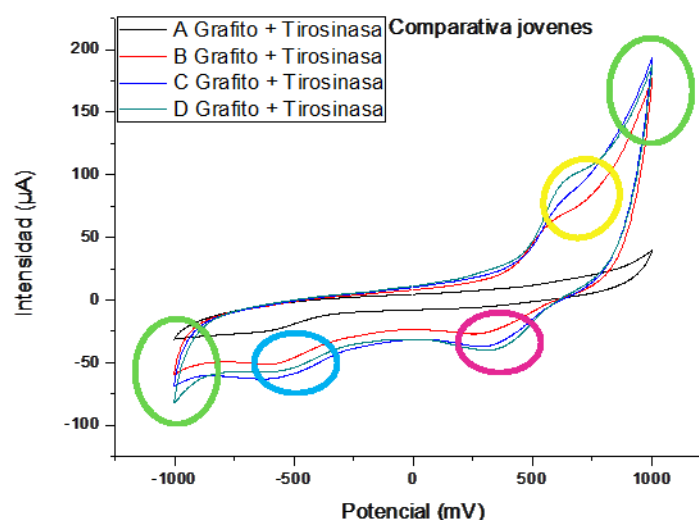


Figura 117. Voltamograma vinos jóvenes biosensor Tyr.

Los voltamogramas de la Figura 117. Voltamograma vinos jóvenes biosensor Tyr., aportan la información respecto al biosensor Tyr, este logra distinguir los 4 vinos jóvenes. El voltamograma con la línea en negro que corresponde al vino A (Temp), indica que también el biosensor Tyr da intensidades menores y voltamogramas menos ricos que el resto, ya que el voltamograma es muy plano y sin apenas señal, como pasaba con el biosensor GOx. El resto tiene una morfología similar aunque consigue diferenciar los 4 vinos claramente.

Los extremos señalados con los dos círculos verdes, donde B, C y D tienen intensidades parecidas pero en el extremo a potenciales más negativos destaca el vino D con la línea en verde ya que tiene la intensidad más baja que el resto.

En el potencial 750 mV indicado con un círculo amarillo que podría corresponder a la reacción de oxidación de los fenoles y las muestras B, C y D cada una tiene un valor de intensidad en el mismo potencial, el vino D destaca por que tiene intensidades más grandes y el vino B con la línea roja tiene intensidades más pequeñas.

En el potencial 400 mV se produce una reducción de las especies, señalado con un círculo rosa y en el potencial -500 mV señalado con un círculo azul son picos de la reacción de reducción y además picos característicos del biosensor Tyr. Esto es lógico ya que la tirosinasa cataliza especialmente la reducción de los compuestos fenólicos.

El biosensor Tyr es capaz de distinguir los 4 vinos jóvenes y presenta buenos resultados.

A continuación se va a adjuntar la Figura 118. Voltamogramas vinos jóvenes por separada con sensor CPE, biosensor GOx y biosensor Tyr. con los voltamogramas de las muestras de los vinos jóvenes por separado con la medida de los tres sensores:

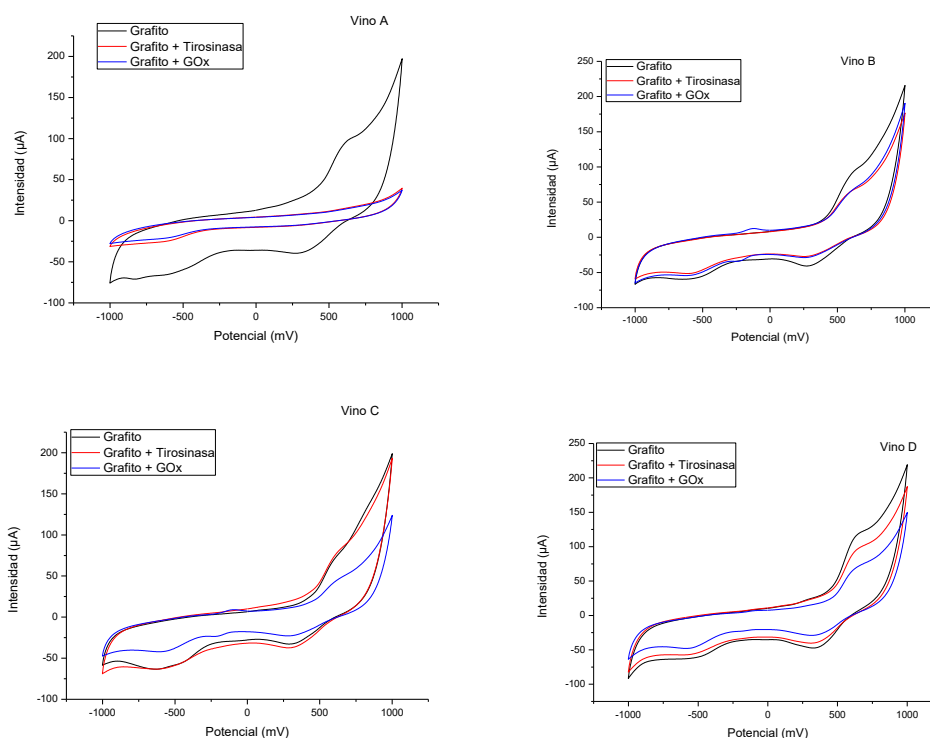


Figura 118. Voltamogramas vinos jóvenes por separada con sensor CPE, biosensor GOx y biosensor Tyr.

Como comentarios a estas gráficas, lo más relevante es que los tres sensores son capaces de distinguir y diferenciar cada vino joven al dar señales características y diferentes del resto. Los biosensores de GOx y Tyr dan una señal muy débil con la muestra de vino A (Temp), que tiene unas intensidades muy bajas durante todo el ciclo, esto se puede ver en la gráfica superior de la izquierda. La gráfica superior de la derecha pertenece al vino B (TT) donde las señales de los biosensores son más parecidas que la del CPE. En la gráfica inferior de la izquierda se observa la muestra de vino C (Men), a destacar que la señal con intensidades inferiores es la del biosensor de GOx. Y finalmente, la gráfica de la esquina inferior derecha, adjunta el vino D (Gr), los tres sensores diferencian muy bien esta muestra, porque cada sensor expone unas intensidades muy distintas del vino.

MUESTRAS VINOS ENVEJECIDOS

A continuación, se van a medir las 4 muestras de vinos según su envejecimiento (dependiendo de la edad): Joven (Jv), Crianza (Cr), Reserva (Rv) y Gran Reserva (Grv), con el mismo tipo de uva: Tempranillo (Temp) con los 3 tipos de sensores voltamétricos.

- Sensor grafito (CPE) en 4 muestras de vinos envejecidos

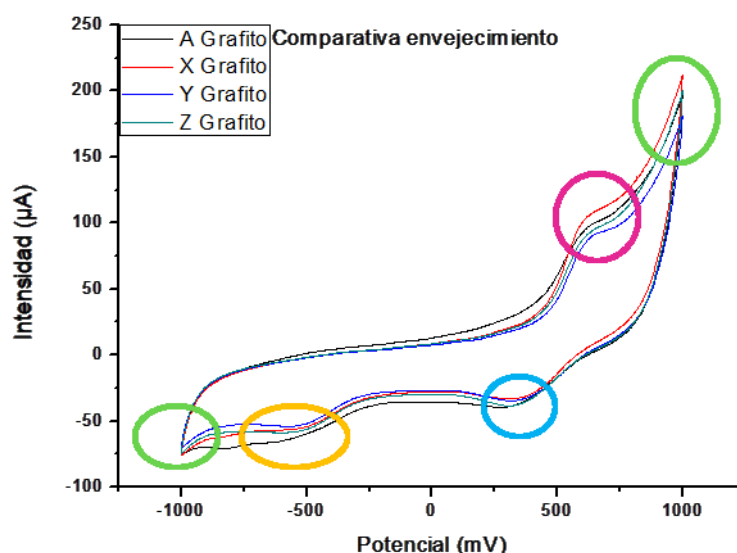


Figura 119. Voltamograma vinos envejecidos sensor CPE.

Los voltamogramas de la Figura 119. Voltamograma vinos envejecidos sensor CPE. muestran un comportamiento muy similar (misma forma) durante todo el ciclo de oxidación y de reducción, esto quiere decir que el sensor deduce que es el mismo tipo de vino (uva tempranillo), pero que cada muestra tiene distintas intensidades y consigue diferenciar el envejecimiento de cada muestra.

En los extremos señalados con los dos círculos **verdes**, se observa que más o menos todos los vinos tienen las mismas intensidades en el extremo inferior, pero en el extremo superior el vino X (Cr) con la curva roja destaca con mayor intensidad que el resto, seguido del vino Z (Grv). En el potencial 750 mV indicado con un círculo **rosa** aparece el pico que corresponde a la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos, donde vuelve a destacar el vino X con mayor intensidad que el resto. En el potencial 400 mV se produce una reducción de las especies, señalado con un círculo **azul** donde se ve los vinos tienen intensidades parecidas. Y en el potencial -500 mV hay otro pico que es característico del sensor donde se muestra que el vino A (Jv) destaca por tener una intensidad más baja que el resto.

El sensor consigue diferenciar el envejecimiento de los vinos, mostrando que tiene los mismo picos característicos ya que se trata del mismo tipo de uva (Temp) pero la intensidad varía ligeramente.

- Biosensor GOx en 4 muestras de vinos envejecidos

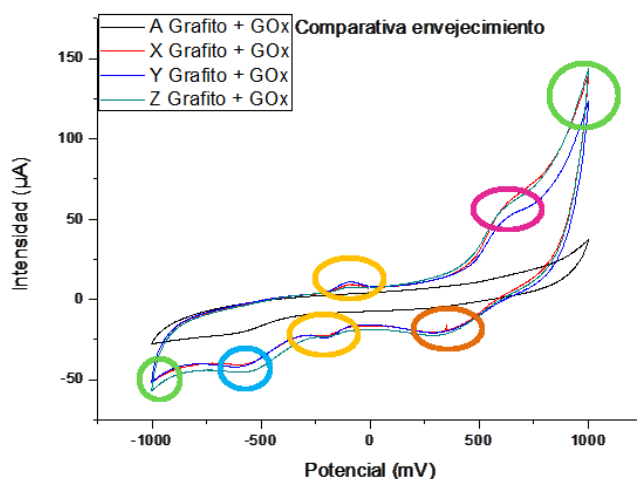


Figura 120. Voltamograma vinos envejecidos biosensor GOx.

Como se puede ver en la Figura 120. Voltamograma vinos envejecidos biosensor GOx. los voltamogramas presentan un recorrido igual (misma forma del ciclo) con diferencias en las intensidades. Esto muestra que los vinos son del mismo tipo de uva (Temp), pero diferencia entre ellos ya que cada muestra de vino manifiesta una intensidad distinta a la del resto. Como pasaba anteriormente con el biosensor de GOx el voltamograma del vino A (Jv) representado con la línea negra, no ofrece una buena señal ya que es plano. A pesar de esto, el biosensor de GOx consigue el objetivo de diferenciar las 4 muestras de vino según su envejecimiento perfectamente.

Los extremos señalados con los dos círculos verdes, se observa que el vino Y (Rv) destaca por su menor intensidad respecto a los vinos A y X, en ambos extremos. Esto sucede durante todo el voltamograma las intensidades de este vino son más pequeñas que las del resto. Mientras que el vino Z (Grv) con el voltamograma verde tiene la intensidad más grande que el resto. En el potencial 750 mV indicado con un círculo rosa se encuentra la deformación de la curva que pertenece a la oxidación y es donde destaca que el vino Y tiene menor intensidad que las muestras X y Z. En el potencial 400 mV se produce una reducción de las especies, señalado con un círculo naranja donde se ve que todos los vinos coinciden con la misma intensidad. Señalados con dos círculos amarillos, se encuentran dos picos que son característicos del biosensor de GOx. Y hay otra deformación de la curva señalada con un círculo azul que también es un pico de la oxidación de reducción.

Concluyendo el comentario de la gráfica, el biosensor de GOx midiendo las 4 muestras aporta buenos resultados de diferenciación de las muestras.

- Biosensor Tyr en 4 muestras de vinos envejecidos

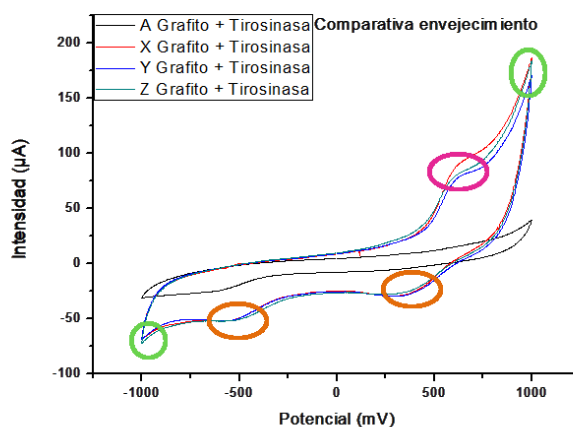


Figura 121. Voltamograma vinos envejecidos biosensor Tyr.

En la Figura 121. Voltamograma vinos envejecidos biosensor Tyr. que se adjunta se exponen los voltamogramas que representan las medidas del biosensor Tyr en las 4 muestras de vinos según su envejecimiento.

El voltamograma con la línea en negro que corresponde al vino A (Temp), indica que el biosensor Tyr no ofrece una buena señal de esa muestra, porque el voltamograma es muy plano y sin apenas señal, como pasaba anteriormente con el biosensor GOx y como ocurría en las medidas de las muestras de vinos jóvenes. Pero logra diferenciar los 4 vinos claramente.

Los extremos señalados con los dos círculos verdes, donde X, Y y Z tienen intensidades parecidas pero en el extremo superior destaca el vino Y con la línea en azul ya que tiene la intensidad más baja que el resto.

En los potenciales 500 mV y -500mV indicados con dos círculos naranjas se encuentran dos deformaciones de la curva que pertenece a la reacción de reducción donde las tres muestras tienen intensidades muy parecidas. Además son picos característicos del biosensor Tyr.

Y como pasaba anteriormente con los otros sensores señalado con un círculo rosa hay otra deformación de la curva que corresponde a la oxidación.

El biosensor Tyr es capaz de distinguir los 4 vinos y presenta buenos resultados.

Seguidamente, se van a agregar los voltamogramas de las muestras de los vinos dependiendo su envejecimiento por separado con la medida de los tres sensores:

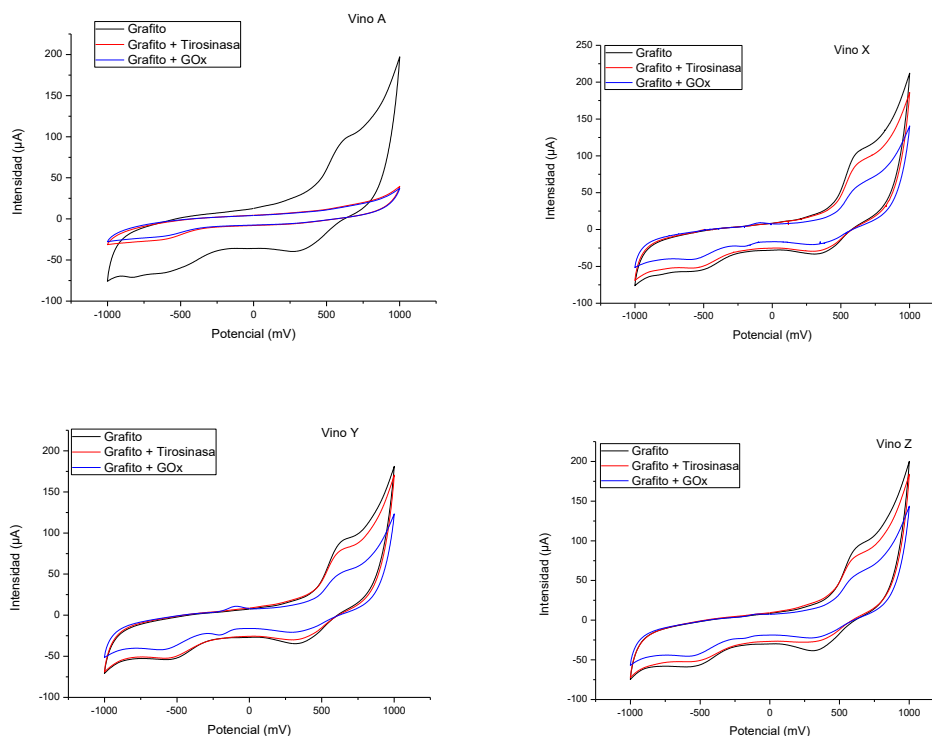


Figura 122. Voltamogramas vinos envejecidos por separada con sensor CPE, biosensor GOx y biosensor Tyr.

Como interpretación de estas gráficas de la Figura 122. Voltamogramas vinos envejecidos por separada con sensor CPE, biosensor GOx y biosensor Tyr., lo más relevante es que los tres sensores consiguen distinguir y diferenciar cada vino por su edad (envejecimiento). Los biosensores de GOx y Tyr dan una señal muy débil con la muestra de vino A (Jv), como ya pasaba con la diferenciación de los vino jóvenes, que tiene unas intensidades muy bajas durante todo el ciclo completo de oxidación/reducción, esto se puede ver en la gráfica superior de la izquierda. La gráfica de la parte superior de la derecha pertenece al vino X (Cr) donde las señales de los biosensores tienen unas intensidades más bajas que las del sensor CPE. En la gráfica inferior de la izquierda se observa la muestra de vino Y (Rv), en las que las señales de los biosensores son de menor intensidad que la del sensor CPE, y especialmente la del biosensor GOx es la de menor intensidad. Y finalmente, la gráfica de la esquina inferior derecha, perteneciente al vino Z (Grv), los tres sensores diferencian muy bien esta muestra como pasaba con las muestras también de los vinos X e Y, y al igual que estos vinos mencionados, en este se sigue el mismo patrón y los biosensores tienen las intensidades ligeramente menores pero picos característicos a otros potenciales diferentes al de carbono sin modificar. Hay que destacar que en cada gráfica los

voltamogramas siguen el mismo patrón y esto significa que los sensores miden correctamente la muestra y cumplen con la huella dactilar de esta.

b. Discriminación mediante PCA

Los datos registrados de las voltametría con el software “NOVA 1.10”, se han tratado con el programa “MATLAB R2014b (32-bit)”.

Con Matlab se va a realizar el análisis de componentes principales (PCA). Con el objetivo de discriminar las muestras unas de las otras, mediante este análisis estadístico. Las respuestas van a ser gráficas en 2D y en 3D, como ya se explicó en el apartado 4.2.1.b.

Los resultados de la PCA se han realizado a partir de los valores registrados de las voltametrías del sensor CPE sin modificar, del biosensor de GOx y del biosensor de Tyr juntos formando una **red de sensores voltamétricos**, para mejorar la discriminación.

MUESTRAS VINOS JÓVENES

El resultado de las muestras de los 4 vinos jóvenes conseguido es el siguiente de la Figura 123. PCA red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr) muestras vinos jóvenes.:

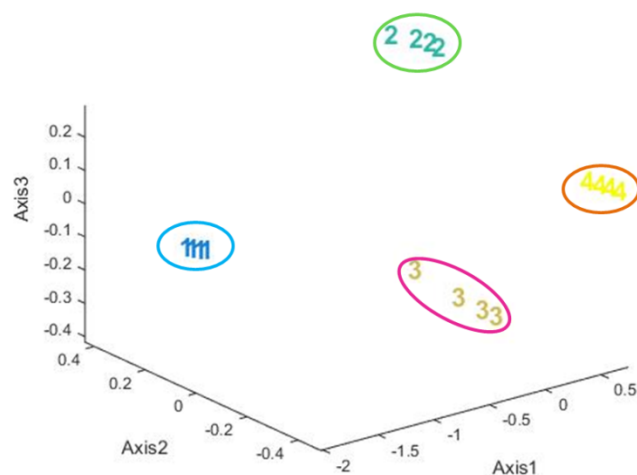


Figura 123. PCA red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr) muestras vinos jóvenes.

Dónde:

Joven (6 meses)		
Tipo de uva (tinto)	Nomenclatura	Nº PCA
Tempranillo	A	1
Tinta de toro	B	2
Mencía	C	3
Garnacha	D	4

Tabla 13. Números PCA vinos jóvenes.

La gráfica es la proyección en 3D, donde se observa que la red de sensores voltamétricos distinguen a la perfección cada una de las muestras quedando colocadas las muestras de la siguiente manera: el número 1 (vino A) al lado izquierdo, el número 2 (vino B) situado en la parte de arriba de la gráfica, el número 3 (vino C) en la parte de debajo de la gráfica y por último el número 4 (vino D), en la parte derecha de la gráfica. Cada vino en un punto cardinal de la gráfica discriminando perfectamente cada uno de los vinos jóvenes.

La gráfica apenas muestra deriva en ninguno de los vinos. En esta PCA está contenida la oxidación y la reducción. Y los cuatro números que aparecen de cada muestra representan los 4 medidas voltametricas de cada muestra.

Se aporta en la Tabla 14. Porcentaje componentes en PCA vinos jóvenes red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr). el porcentaje de cada una de las tres componentes principales observando que si bien la primera componente es la que tiene la mayor parte de la información la segunda y la tercera componente ayudan igualmente a la discriminación:

Vinos jóvenes (4 muestras)		1º componente	2º componente	3º componente
Muestra: Temp + Gr + Men + TT Sensor: CPE + biosensor GOx + biosensor Tyr	Todo (oxidación + redcción)	90,0733	5,3833	4,3084

Tabla 14. Porcentaje componentes en PCA vinos jóvenes red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr).

MUESTRAS VINOS ENVEJECIDOS

Seguidamente, se va mostrar los resultados de la PCA de las 4 muestras de vinos según su envejecimiento, con la misma red de sensores voltamétricos: sensor CPE, biosensor GOx y biosensor Tyr.

El resultado de las muestras de los 4 vinos envejecidos logrado es el siguiente (Figura 124. PCA red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr) muestras vinos envejecidos.):

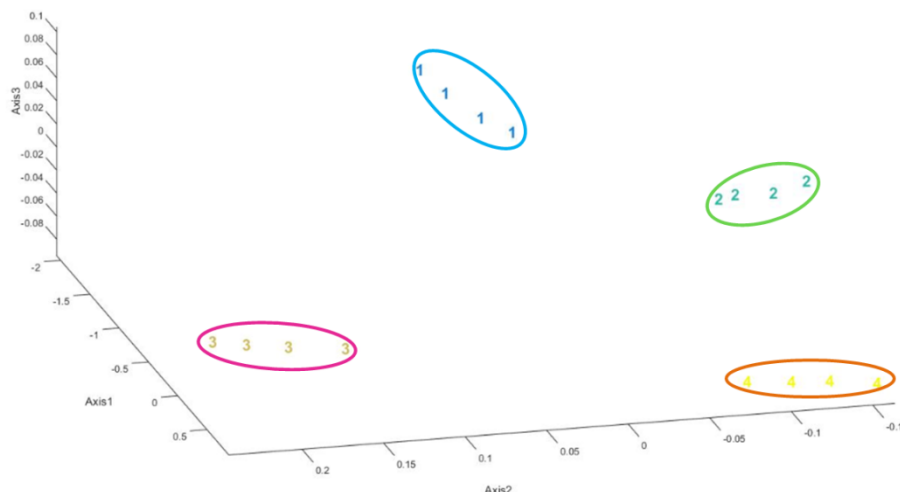


Figura 124. PCA red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr) muestras vinos envejecidos.

Dónde:

Tipo de uva: Tempranillo (tinto)			
Envejecimiento	Nombre	Nomenclatura	Nº PCA
6 meses	Joven	A	1
12 meses	Crianza	X	2
3-4 años	Reserva	Y	3
5-6 años	Gran reserva	Z	4

Tabla 15. Números PCA vinos envejecidos.

La gráfica es la proyección en 3D, donde la red de sensores voltamétricos diferencia muy bien cada una de las muestras de vinos dependiendo de su envejecimiento, quedando situadas de la siguiente manera: el número 1 (vino A) en la parte de arriba a la izquierda de la gráfica, el número 2 (vino X) situado en la parte de arriba a la derecha, el número 3 (vino Y) en la parte de abajo a la izquierda y por último el número 4 (vino Z), en la parte de abajo a la derecha de la gráfica. Cada vino en un extremo de la gráfica discriminando óptimamente cada uno de los vinos según su envejecimiento.

La gráfica muestra ligera deriva en los resultados de los distintos ensayos realizados, pero no hay que tenerla en cuenta ya que la escala es muy pequeña y la deriva también es muy reducida. En estos resultados del análisis está contenida en las ramas de la oxidación y de la reducción. Y los cuatro

números que aparecen de cada muestra representan los 4 ensayos de las voltametrías de cada muestra.

Se aporta el porcentaje de los componentes en la Tabla 16. Porcentaje componentes en PCA vinos envejecidos red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr).:

Vinos envejecidos (4 muestras)		1º componente	2º componente	3º componente
Muestra: Jv + Cr + Rv + Grv	Todo			
Sensor: CPE + biosensor GOx + biosensor Tyr	(oxidación + reducción)	98,4179	1,1720	0,3223

Tabla 16. Porcentaje componentes en PCA vinos envejecidos red de sensores voltamétricos (CPE, biosensor GOx, biosensor Tyr).

Con todos estos resultados se puede concluir que la red de sensores voltamétricos, una vez tratados los datos medidos obteniendo las PCA, se puede observar que esta red discrimina bien las muestras de vinos, tanto las muestras de distinto tipo de uva como las muestras de diferente envejecimiento, en este caso la primera componentes presenta mayor porcentaje de información.

c. Correlaciones con los datos químicos, PLS

Como último apartado de este estudio con los sensores voltamétricos, se ha llevado a cabo la correlación de los datos voltamétricos tomados de las muestras de estudio con los datos químicos suministrados por el proveedor. Todo ello se va a realizar con el software “Unscrambler X”.

Como ya se explicó en el apartado 4.2.1.c. los datos medidos registrados con el software “NOVA 1.10” y tratados con “Origin8” y con “Matlab” (en este último se consigue una matriz), juntos con los datos químicos se introduce todo en el software “Unscrambler X”. Los datos químicos de las muestras de estudio, estos son:

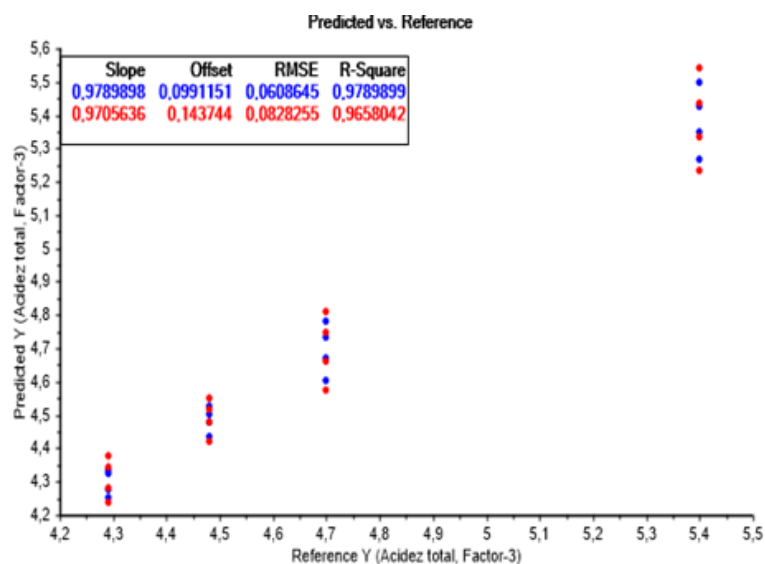
- % ACA (grado de acidez)
- Ácido acético
- SO₂
- Azúcares reductores
- Glucosa + fructosa
- Grado alcohólico

- pH
- L-Málico
- IPT280
- Folin

El software correlaciona todos los datos y se consiguen las correlaciones **PLS** que son las regresiones de mínimos cuadrados parciales (ya descrito en el Capítulo 3). Procedimiento estadístico que consiste en encontrar una regresión lineal por medio de la proyección de las variables de predicción y las variables observables (datos medidos y datos químicos a correlacionar). Se realiza un estudio de validación (datos azules) y posteriormente un modelo de predicción (datos rojos) que se muestra a continuación.

MUESTRAS VINOS JÓVENES

Las respuestas obtenidas de las medidas de los vinos jóvenes son las siguientes que se observan en la Figura 125. PLS vinos jóvenes correlación con todos los parámetros:



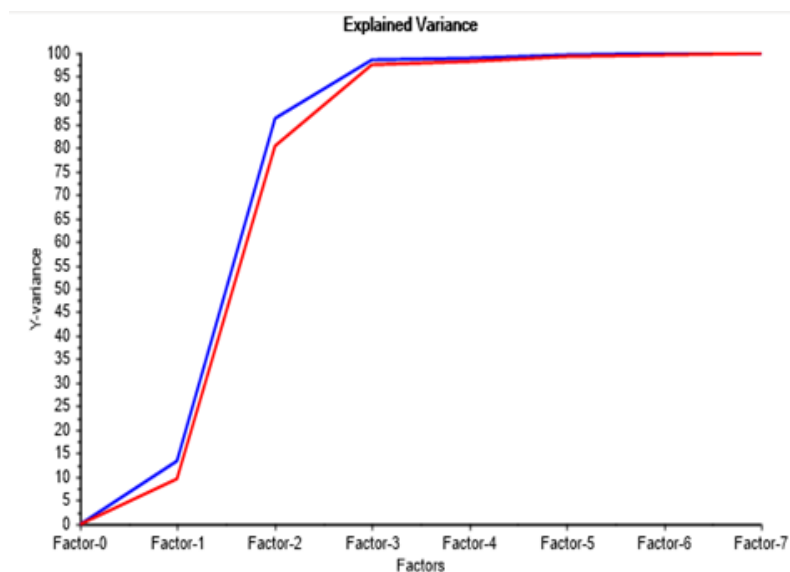


Figura 125. PLS vinos jóvenes correlación con todos los parámetros

En las gráficas se muestra que tanto el modelo que corresponde con el color azul (calibración) como a la predicción que corresponde con el color rojo (validación) dan lugar a correlaciones muy buenas, con un coeficiente de regresión muy alto y con un número de variables bajo excepto en el caso del índice de SO₂ que se necesita un mayor número de variables.

Seguidamente se va a adjuntar la Tabla 17. Valores PLS vinos jóvenes. con los resultados detallados de cada dato químico, el valor del modelo y la predicción. Y se interpretarán los datos más detalladamente. Los resultados obtenidos de este tratamiento de datos son los siguientes:

	CALIBRACIÓN		PREDICCIÓN		Factor
	R ²	RMSE	R ²	RMSE	
Acidez (%ACA)	0,9797	0,0598	0,9662	0,0823	3
Ácido acético	0,9956	0,0031	0,9864	0,0059	3
SO ₂	0,9968	0,9848	0,9921	1,5921	5
Azucares reductores	0,9963	0,2931	0,9883	0,5588	3
Grado alcohólico	0,9885	0,0798	0,9790	0,1151	3
IPT280	0,9876	0,6306	0,9780	0,8990	3
Folin	0,9974	0,3217	0,9937	0,5320	3
Todos los parámetros	0,9789	0,0608	0,9658	0,0828	3

Tabla 17. Valores PLS vinos jóvenes.

Los resultados de la PLS indican que tanto la calibración como la predicción dan resultados satisfactorios. Se obtiene una buena recta de calibrado de la

predicción que se ajusta al modelo. De tal modo que los resultados son óptimos y la predicción es válida, la discriminación y la red de sensores voltamétricos es eficiente.

MUESTRAS VINOS ENVEJECIDOS

Ahora se van a adjuntar la Figura 126. PLS vinos envejecidos correlación con todos los parámetros las respuestas conseguidas de las medidas de los vinos según su envejecimiento:

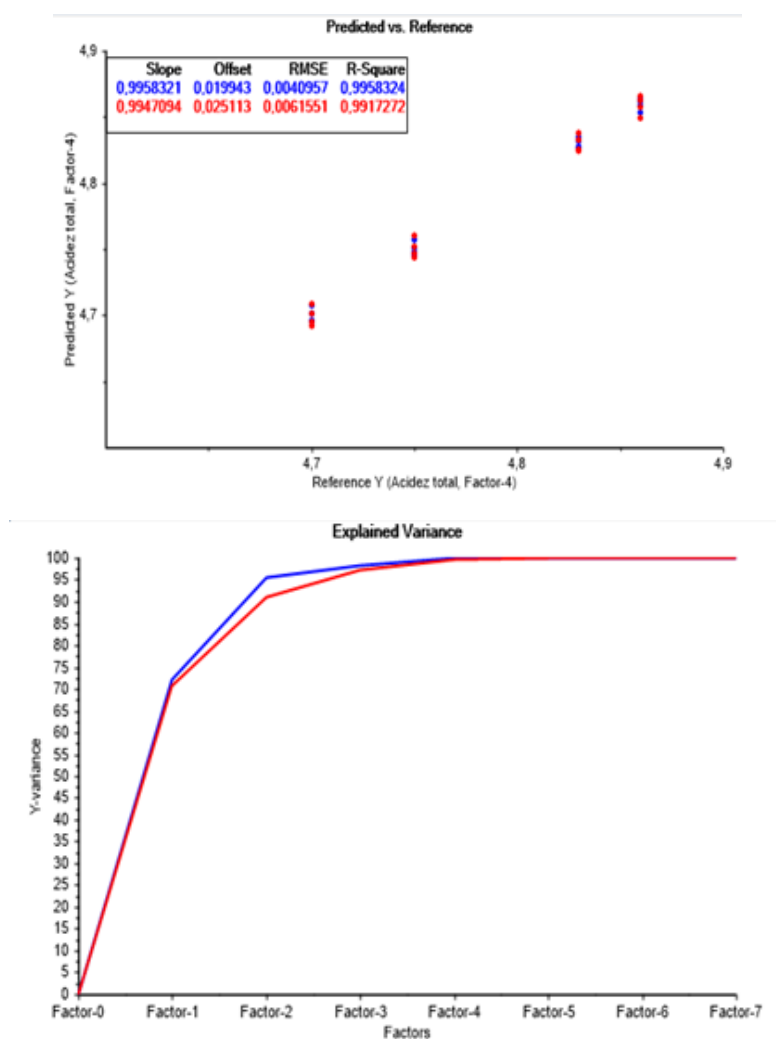


Figura 126. PLS vinos envejecidos correlación con todos los parámetros

Las gráficas presentan el modelo de calibración que corresponde con el color azul y la predicción que corresponde con el color rojo, ambos modelos se asemejan y siguen el mismo perfil, con unos índices de correlación altos.

Se va a agregar la Tabla 18. Valores PLS vinos envejecidos. con los resultados desarrollados de cada dato químico, el valor del modelo de calibración y del modelo de la predicción:

	CALIBRACIÓN		PREDICCIÓN		Factor
	R ²	RMSE	R ²	RMSE	
Acidez (%ACA)	0,9973	0,0032	0,9946	0,0049	4
Ácido acético	0,9969	0,0033	0,9954	0,0043	3
SO2	0,9992	0,7252	0,9986	1,0840	4
Azucares reductores	0,9921	0,4030	0,9915	0,4441	1
Grado alcohólico	0,9975	0,0194	0,9958	0,0269	3
IPT280	0,9980	0,5903	0,9957	0,9341	4
Folin	0,9990	0,2613	0,9977	0,4245	4
Todos los parámetros	0,9958	0,0041	0,9917	0,0061	4

Tabla 18. Valores PLS vinos envejecidos.

Anteriormente se ha explicado el significado de R², RMSE y Factor.

Se obtiene una buena recta de calibrado y también la predicción se ajusta al modelo. Por tanto, los resultados son buenos y la predicción es correcta, la discriminación y la red de sensores voltamétricos es útil para distinguir los vinos no sólo por el tipo de uva sino también por su grado de envejecimiento.

4.3.2. Sensores potenciométricos

Ahora se van a exponer los resultados obtenidos a partir de la red de sensores potenciométricos que posteriormente han sido tratados por métodos estadísticos.

Al igual que en el apartado anterior se van a mostrar las medidas con las 4 muestras de los vinos jóvenes de distintas uvas y seguidamente las medidas de las 4 muestras de la uva tempranillo de distinto envejecimiento. El objetivo es ver si la red de sensores potenciométricos consigue diferenciar cada vino en función del tipo de uva y del grado de envejecimiento.

También se van a tratar los datos registrados de las medidas con otros software para comprobar que se discriminan bien las muestras.

a. Respuesta de los sensores en vinos

Estas gráficas se han conseguido con los datos registrados por el programa “**Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies)**”, y tratándolos con el programa “**Excel**”.

MUESTRAS VINOS JÓVENES

La siguiente Figura 127. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en vinos jóvenes. muestra los valores de potencial medidos al final del ensayo por la red de sensores potenciométricos en las 4 muestras de vinos jóvenes: Temp, TT, Men, Gr.

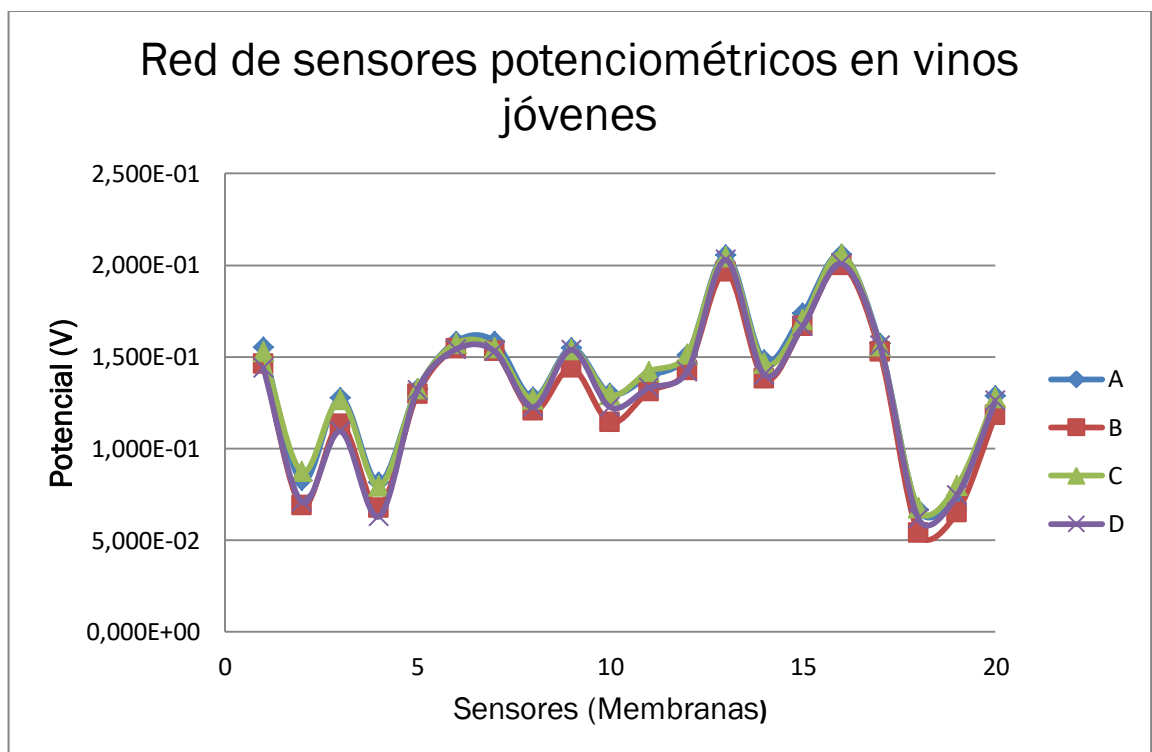


Figura 127. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en vinos jóvenes.

La gráfica, Figura 127. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en vinos jóvenes., presenta la **huella dactilar** de la red de sensores en las 4 muestras de vinos jóvenes, así se ve la actuación de la red de sensores en un medio complejo como el vino donde hay una gran mezcla y variedad de compuestos y que además tiene un fuerte carácter ácido. Esto es importante ya que no podíamos descartar a priori que la acidez y algunos de los componentes del vino pudieran dañar las membranas.

Se observa que cada uno de los 20 sensores (membranas) da como resultado un potencial final distinto. Además, la gráfica muestra que las muestras se

superponen bastante esto es porque la red de sensores identifica que las muestras son parecidas ya que las cuatro son muestras de vinos y además todas ellas con el mismo grado de envejecimiento, jóvenes. Destaca que el vino B (línea roja) tiene potenciales menores que los otros tres vinos, y que el vino A (línea azul) suele tener durante toda la huella dactilar los potenciales más alto que el resto.

Se concluye que cada muestra tiene una huella dactilar característica y con ello que la red de sensores es capaz de diferenciarlos y actuar como lengua electrónica.

MUESTRAS VINOS ENVEJECIDOS

La próxima Figura 128. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en vinos envejecidos. expone los resultados de potencial final registrados por cada uno de los veinte sensores que forman la red de sensores potenciométricos en las 4 muestras de vinos según su envejecimiento: Joven, Crianza, Reserva, Gran Reserva.

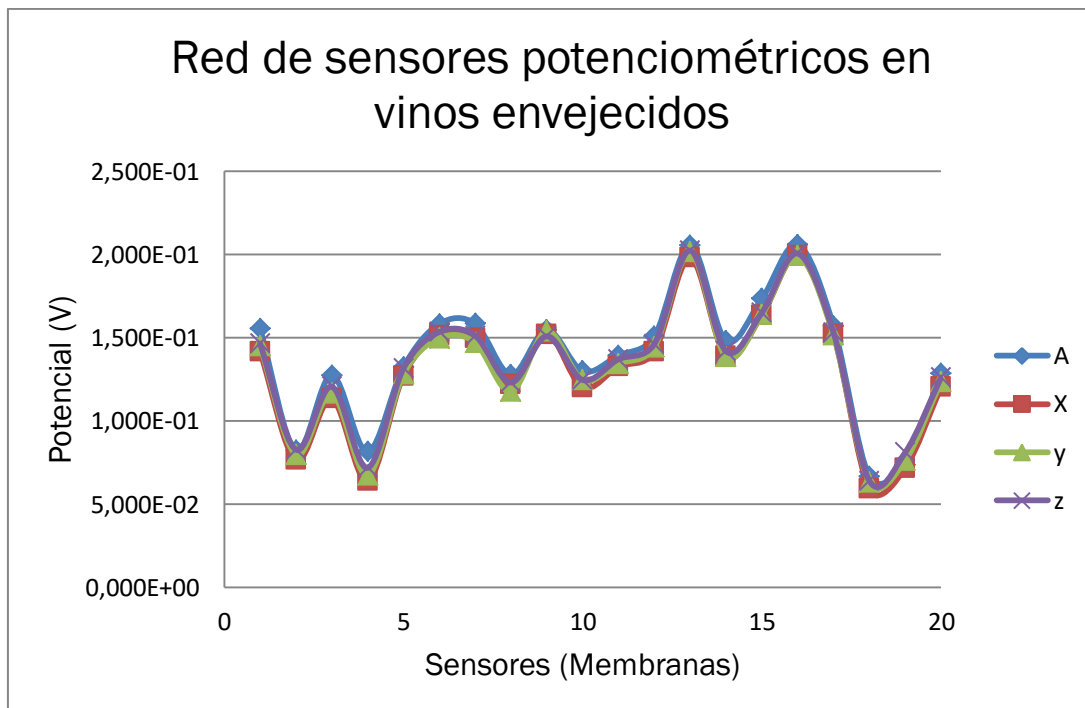


Figura 128. Gráfica de potenciometría de la red de sensores potenciométricos en vinos envejecidos.

De nuevo se observa una señal distinta en cada sensor que configura la **huella dactilar** de la red de sensores en cada una de las 4 muestras esta vez se trata de vinos de idéntica variedad de uva pero diferente grado de envejecimiento.

La gráfica muestra que cada uno de los 20 sensores (membranas) aporta un potencial distinto, como pasaba en el caso anterior de los vinos jóvenes. Otra vez las muestras se solapan debido a que la red de sensores identifica que las muestras son similares porque las 4 son vinos y del mismo tipo de uva: tempranillo. Se puede especificar que el vino A (línea azul) tiene los potenciales mayores que los demás vinos, y que los otros tres vinos que son Cr, Rv y Grv que tienen más envejecimiento que el vino A (Jv) tienen potenciales similares y más bajos que el vino A.

Se puede decir que cada vino tiene una huella dactilar y que la red de sensores potenciométricos es apta para diferenciar cada muestra.

b. Discriminación mediante LDA

Los datos registrados con el software “Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies)” y tratados con “Excel” también se han tratado con otro programa “IBM SPSS Statics”, con el objetivo de conseguir un análisis de discriminación lineal (LDA) para la diferenciación de las muestras de vino.

MUESTRAS VINOS JÓVENES

La siguiente Figura 129. Gráfica LDA vinos jóvenes. muestra los resultados obtenidos del análisis LDA de la red de sensores potenciométricos en las 4 muestras de vinos jóvenes: Temp, TT, Men, Gr.

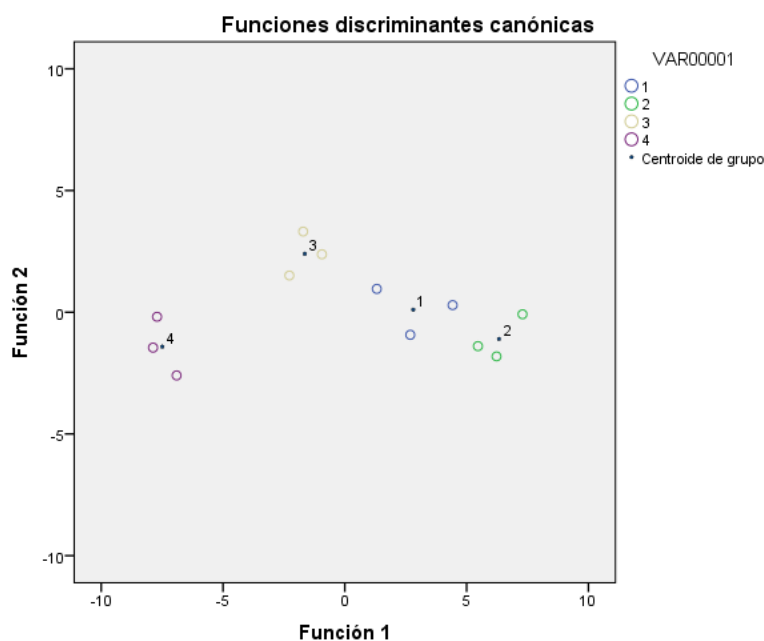


Figura 129. Gráfica LDA vinos jóvenes.

La gráfica muestra la discriminación de cada uno de los vinos jóvenes entre ellos. El número 4 pertenece al vino D (Gr) y está colocado en la parte izquierda más aislado que el resto, muy diferenciado. Esto es debido a que el dato químico de la acidez de este vino es considerablemente mayor que el del resto de vinos y se ve reflejado en la gráfica de la LDA, por ejemplo el valor de la acidez del vino D muestra 5,4g/L frente a al valor 4,29 g/L del vino B. El número 3 pertenece al vino C (Men), está situado en el centro hacía la parte de arriba, la discriminación de la muestra es concluyente. El número 1 pertenece al vino A (Temp) y está también en la zona central de la gráfica entre los vinos 2 y 3, pero está bien diferenciado de estos. Finalmente el número 2 pertenece al vino B (TT), situado en el lado derecho de la gráfica, está próximo a la muestra número 1, pero aun así se discriminan perfectamente.

Se puede ultimar diciendo que la discriminación en el plano obtenida por la LDA es buena y diferencia los vinos jóvenes con buen resultado siendo el vino cuatro el que parece presentar características más diferentes que el resto.

MUESTRAS VINOS ENVEJECIDOS

La Figura 130. Gráfica LDA vinos envejecidos. adjunta, expone los resultados del análisis estadístico LDA de la red de sensores potenciométricos en las 4 muestras de vinos según su envejecimiento: Joven, Crianza, Reserva, Gran Reserva.

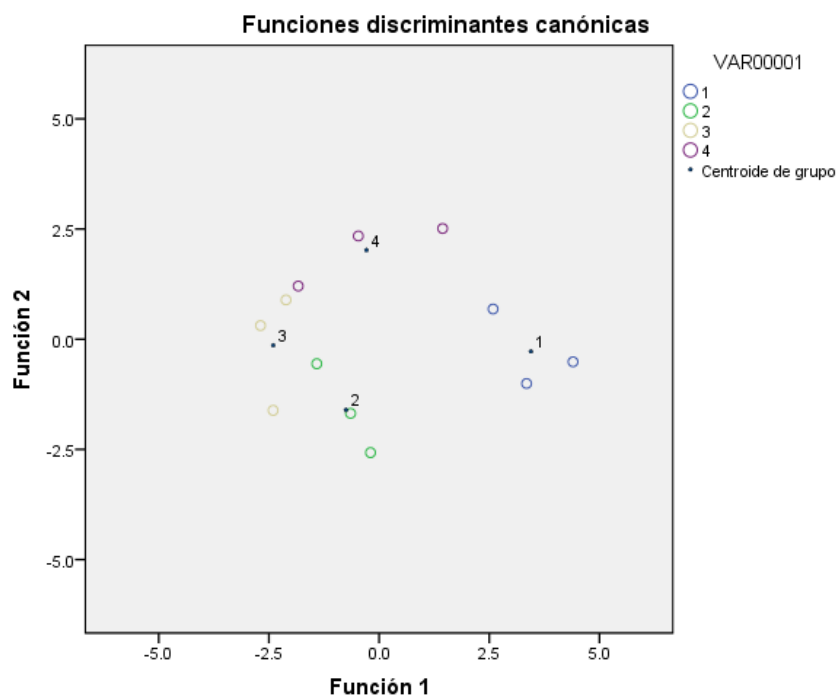


Figura 130. Gráfica LDA vinos envejecidos.

Como comentarios a la gráfica de la LDA, se puede decir que se expone la discriminación de cada uno de los vinos según su envejecimiento. El número 1 representa al vino A (Jv) situado en la parte derecha central más aislado que el resto, esto se puede deber a que es el vino menos envejecido de todos y su diferenciación es más marcada. El número 2 pertenece al vino X (Cr), se encuentra en el centro hacia la parte de abajo, cercano al número 3 que representa al vino Y (Rv) que está ubicado en el centro de la gráfica hacia el lado izquierdo entre los números 2 y 4, ya que su envejecimiento es mayor que el de 2 y menor que el de 4. El número 4 simboliza el vino Z (Grv) y está en el centro parte de arriba de la gráfica.

Se concluye manifestando que la discriminación de estos 4 vinos es muy buena y con lógica, ya que el vino joven que es 1 al ser el menos envejecido está más lejos de los otros tres, y que el vino 3 está en el medio de 2 y de 4, ya que su envejecimiento está en el medio de ambos, van por orden de edad. La discriminación es coherente.

c. Correlación con los datos químicos, MLR

Se va a llevar a cabo la correlación de los datos de las medidas tomadas de las muestras de estudio con los datos químicos. Para ello se van a tratar los datos con el programa “Unscrambler X”.

Se va a explicar de manera breve el procedimiento para la obtención de este tratamiento de datos.

Los datos que se han medido y registrado con el software “Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies)”, se han tratado con los programas “Excel” y “IBM SPSS Statics”, todo esto es necesario realizarlo antes de trabajar en el software que va a producir la correlación con los datos químicos. Pero también es necesario antes de esto generar una matriz con “Matlab”. Una vez obtenido todo esto se introduce en el software mencionado “The Unscrambler X”.

Con todo esto se consigue el tratamiento de datos que se requiere que es la **MLR**, una regresión lineal múltiple. Como ya se explicó en el Capítulo 3, consiste en un método estadístico que se basa en reconocer las variables independientes y comparar los modelos que se construyen con la introducción de los datos químicos al software que son otra parte fundamental para este tratamiento de datos y la correlación.

Los datos químicos que se introducen son los siguientes:

- % ACA (grado de acidez)
- Ácido acético
- Grado alcohólico

Con todo ello el programa intenta fabricar los modelos y posteriormente se consiguen las MLR.

MUESTRAS VINOS JÓVENES

En los vinos jóvenes se van a relacionar los datos medidos con los datos químicos. Se ha seleccionado como datos más característicos la acidez y el grado alcohólico.

Las respuestas obtenidas son las siguientes:

La acidez (Figura 131. MLR vinos jóvenes correlación con la acidez.):

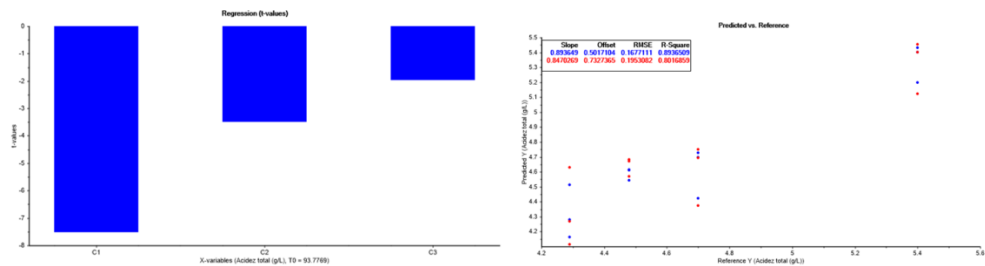


Figura 131. MLR vinos jóvenes correlación con la acidez.

El grado alcohólico (Figura 132. MLR vinos jóvenes correlación con el grado alcohólico.):

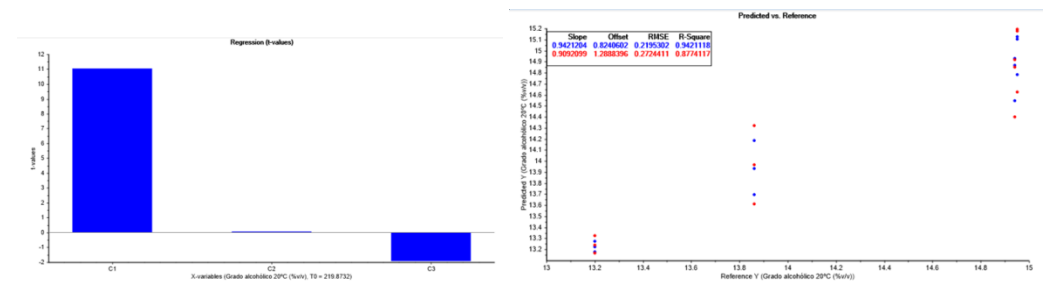


Figura 132. MLR vinos jóvenes correlación con el grado alcohólico.

En las gráficas se observa que el modelo de calibración que corresponde con el color azul y el modelo de predicción que corresponde con el color rojo dan resultados óptimos.

Seguidamente se adjunta la Tabla 19. Valores MLR vinos jóvenes. con los resultados los datos químicos y el valor del modelo de calibración y el modelo de predicción:

	CALIBRACIÓN		PREDICCIÓN	
	R ²	RMSE	R ²	RMSE
Acidez (%ACA)	0,8936	0,1677	0,8016	0,1953
Grado alcohólico	0,9421	0,2195	0,8774	0,2724

Tabla 19. Valores MLR vinos jóvenes.

Los resultados son favorables e indican que nuestro modelo se puede utilizar para predecir los resultados de acidez y grado alcohólico, la predicción es válida, la discriminación y la red de sensores potenciométricos son eficaces en su aplicación a las muestras de vinos.

MUESTRAS VINOS ENVEJECIDOS

Con las muestras de vino según su envejecimiento se van a correlacionar los datos medidos con los datos químicos: acidez y el grado alcohólico.

Las respuestas obtenidas son las siguientes:

La acidez (Figura 133. MLR vinos envejecidos correlación con la acidez.):

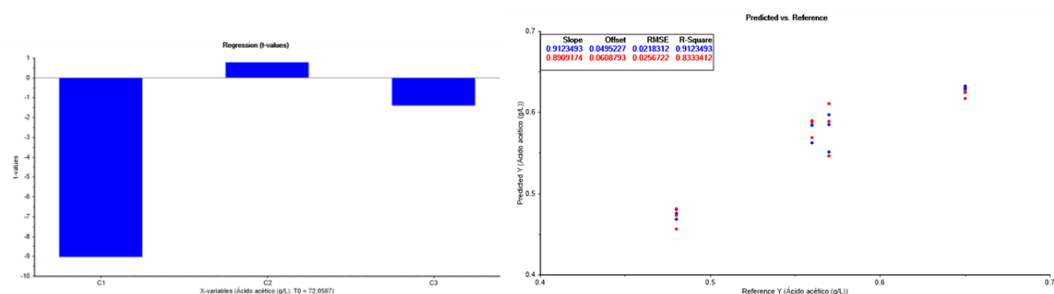


Figura 133. MLR vinos envejecidos correlación con la acidez.

El grado alcohólico (Figura 134. MLR vinos envejecidos correlación con el grado alcohólico.):

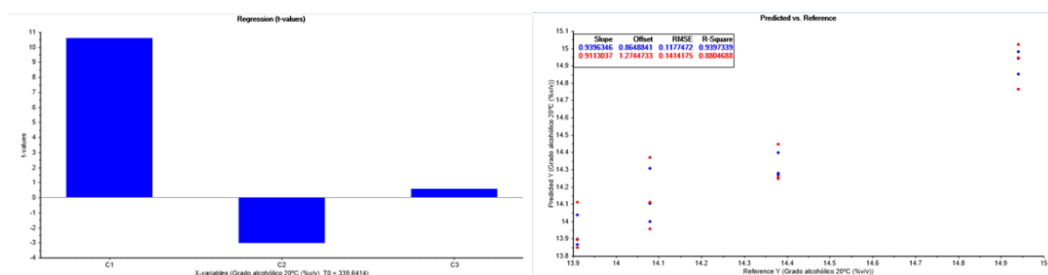


Figura 134. MLR vinos envejecidos correlación con el grado alcohólico.

Una vez más se observa que tanto en calibración como en predicción los ajustes a una línea recta son buenos.

A continuación, se agrega la Tabla 20. Valores MLR vinos envejecidos. con los resultados obtenidos en el modelo de calibración y del modelo de predicción:

	CALIBRACIÓN		PREDICCIÓN	
	R ²	RMSE	R ²	RMSE
Acidez	0,9123	0,0283	0,8333	0,0256
Grado alcohólico	0,9397	0,1177	0,8804	0,1414

Tabla 20. Valores MLR vinos envejecidos.

Se consigue una adecuada correlación tanto en la predicción como en el modelo de calibración. Por tanto, los resultados son buenos y la predicción es apropiada, la discriminación y la red de sensores potenciométricos son válidas para esta aplicación.

4.3.3. Correlación entre los sensores voltamétricos y los potenciométricos

Se puede concluir de los resultados experimentales expuestos en este Capítulo 4, que tanto la red de sensores voltamétrica como la red de sensores potenciométrica han dado buenos resultados en las muestras de vinos.

Ambos tipos de sensores han sido competentes a la hora de distinguir y discriminar los diferentes vinos, tanto en las medidas de los vinos de la misma edad y distinta uva, como en los vinos de diferente envejecimiento y la misma uva.

Los sensores voltamétricos han contribuido con una discriminación por medio de voltamogramas, PCA y las PLS que correlacionaban las medidas tomadas con los datos químicos. Entretanto, la red de sensores potenciométricos ha aportado la huella dactilar de cada sensor en cada muestra y lo ha complementado con el tratamiento de datos de las LDA y la correlación de los datos químicos mediante las MLR.

Se ha comprobado que ambas redes de sensores aunque lleven de formas diferentes la medición electroquímica y tengan distinto diseño, han sido capaces de medir y diferenciar las muestras de estudio.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y POSIBILIDADES FUTURAS

En este capítulo se describirán se expondrán las conclusiones de este trabajo, que son las siguientes:

1. Se ha conseguido desarrollar una red de sensores voltamétricos para la industria de la alimentación capaz de discriminar entre diferentes tipos de vinos en función de su variedad de uva y grado de envejecimiento.
2. Se ha logrado generar una lengua potenciométrica para la industria de la alimentación apta para conseguir una discriminación entre distintos tipos de vino dependiendo de la especie de uva de la que provenga dicho vino y de la edad de este (el envejecimiento del vino).
3. Se ha realizado un análisis quimiométrico a los datos suministrados por las redes de sensores voltamétrica y potenciométrica, que han permitido diseñar un modelo para la determinación de las variables/parámetros de interés en el control de calidad del vino.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. (s.f.). *Alimentación, cifras de la industria alimentaria*. Recuperado el Agosto de 2018, de Alimentación, cifras de la industria alimentaria: <http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/marco-estrategico/>
- [2] Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas. (s.f.). *Alimentación y Bebidas, Sectores*. Recuperado el Agosto de 2018, de Alimentación y Bebidas, Sectores: <http://fiab.es/sector/>
- [3] Vinbot. (s.f.). *Industria del vino*. Recuperado el Agosto de 2018, de Industria del vino: <http://vinbot.eu/wine-industry/?lang=es>
- [4] VWR. (s.f.). *Análisis de alimentos y bebidas*. Recuperado el Agosto de 2018, de Análisis de alimentos y bebidas: https://es.vwr.com/store/content/externalContentPage.jsp?path=/es.vwr.com/es_ES/food_testing.jsp
- [5] Definición.de. (s.f.). *Definición de sensor*. Recuperado el Septiembre de 2018, de Definición de sensor: <https://definicion.de/sensor/>
- [6] Ortega, E. J., & H.C. (s.f.). *Clasificación de sensores*. Universidad Santiago de Cali.
- [7] Pividori, M. I. (2008). *Química bioanalítica: La Química Analítica en la era de la genómica, proteómica y celómica*. Universidad Nacional del Litoral (Facultad de Bioquímica y ciencias biológicas), Química, Santa Fe (Argentina).
- [8] HULANICKI, A., INGMAN, F., & GLAB, S. (1991). Chemical Sensors Definitions and Classification. *Pure&Appl.Chem*, 63(9), 4.
- [9] Gandía Romero, J. M. (2014). *Sensores electroquímicos aplicados al estudio de la corrosión en estructuras de hormigón armado*. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de construcciones arquitectónicas, Valencia.
- [10] Cano Luna, M. (2008). *Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras*. Universidad de Córdoba, Química Física y Termodinámica aplicada. Córdoba: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- [11] Ortiz R., R., Martínez, Y., & Hernández, R. (2006). *Técnicas Electroanalíticas Parte II Voltamperometría*. Universidad de los Andes (Facultad de Ciencias), Química Laboratorio de Análisis instrumental. Mérida: Universidad de los Andes.

- [12] La Guía. (s.f.). *La Guía*. Recuperado el Septiembre de 2018, de La Guía: <https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/potenciostato>
- [13] Real Academia de Ingeniería. (s.f.). *Real Academia de Ingeniería*. Recuperado el Octubre de 2018, de Real Academia de Ingeniería: <http://diccionario.raing.es/es/lema/voltamograma>
- [14] OCW Universidad de Cádiz (UCA). (s.f.). *Principios de Voltametría (Apuntes de Electroquímica)*. Universidad de Cádiz. Cádiz: Universidad de Cádiz.
- [15] Grumezescu, A. M. (Ed.). (s.f.). *Nanobiosensors: Nanotechnology in the Agri-Food Industry* (Vol. 8). ELSEVIER.
- [16] Lin, X., Ni, Y., & Kokot, S. (2013). Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 765, 54-62.
- [17] Thomas, S., Pasquini, D., Leu, S.-Y., & Gopakumar, D. A. (Edits.). (s.f.). *Nanoscale materials in water purification*. ELSEVIER.
- [18] Noguera, M. G. (2013). *Nano/micromaterials and motors in (bio)sensing applications*. Universidad Autónoma de Barcelona (Facultad de Ciencias), Química. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- [19] Montereali, M., Della Seta, L., Vastarella, W., & Pilloton, R. (2010). A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B*, 64, 189-194.
- [20] Apetrei, I., Rodríguez-Méndez, M., & Apetrei, C. a. (2013). Enzyme sensor based on carbon nanotubes/cobalt (II) phthalocyanine and tyrosinase used in pharmaceutical analysis. *Sensors and Actuators B*, 177, 138-144.
- [21] Definicion.DE. (s.f.). *Definicion.DE*. Recuperado el Octubre de 2018, de Definicion.DE: <https://definicion.de/enzima/>
- [22] Universidad de Alcalá (UAH) Madrid. (s.f.). Recuperado el Noviembre de 2018, de http://www3.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/temas/tema-7_catalisis-enzimatica.pdf
- [23] Huang, Y., Zhang, W., Xiao, H., & Li, G. (2005). An electrochemical investigation of glucose oxidase at a CdS nanoparticles modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 817-821.
- [24] Jimenez C., C., & León P., D. E. (2009). Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *VITAE, Revista de la facultad de Química Farmacéutica*, 6(1), 144-154.

- [25] *Sensor potenciométrico*. (s.f.). Recuperado el Noviembre de 2018, de Sensor potenciométrico: <http://sensorpotenciometrico.blogspot.com/>
- [26] Shrikrisshnan, S., & Lakshminarayanan, V. (2012). Electron transfer studies of redox probes in bovine milk. *Journal of Colloid and Interface Science*, 124-131.
- [27] Dias, L. A., Peres, A., Vilas-Boas, M., Rocha, M., Estevinho, L., & Machado, A. (2008). An electronic tongue for honey classification. *Microchimica Acta*.
- [28] Dias, L. A.-B., & Reis, F. &. (s.f.). An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk.
- [29] *Baterías de grafeno*. (s.f.). Recuperado el Noviembre de 2018, de Baterías de grafeno: <http://bateriasdegrafenopara.com/grafito-propiedades-aplicaciones/>
- [30] Ceys. (s.f.). Ceys. Recuperado el Diciembre de 2018, de Ceys: <https://www.mundoceys.com/categoria/6/adhesivos-epoxi-araldite>
- [31] Tarragona, G. d. (s.f.). *Quimiometría: Una disciplina útil para el análisis químico*. Universitat Rovira y Virgili (Departameno de Química Analítica y Química Orgánica), Tarragona (España).
- [32] Universidad de las Américas Puebla (UDLAP). (s.f.). Recuperado el Diciembre de 2018, de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lep/ramos_p_a/capitulo4.pdf
- [33] Tour y vino. (s.f.). Recuperado el Diciembre de 2018, de Tour y vino: <https://www.touryvino.com/el-vino/que-es-el-vino/>
- [34] Sharpe, E., Bradley, R., Frasco, T., Marsh, D., & Andreescu, S. (2014). "Metal oxide based multisensor array and portable database for field analysis of antioxidants". *NCBI*, 193, 552-562.
- [35] Medina-Plaza, C., Revilla, G., Muñoz, R., Fernández-Escudero, J., Barjas, E., Medrano, G., y otros. (2013). Electronic tongue formed by sensors and biosensors containing phthalocyanines as electron mediators. Application to the analysis of red grapes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 17, 1-11.
- [36] *ARQUIMED INNOVACION Industrial*. (s.f.). Recuperado el Septiembre de 2018, de ARQUIMED INNOVACION Industrial: <http://www.arquimed.cl/industrial/category/industria-alimentos-bebidas-y-vitivinicola/alimentos-y-bebidas/>
- [37] *KRÜSS*. (s.f.). Recuperado el Septiembre de 2018, de https://www.kruess.com/documents/Applikationsberichte/AP130710_001_Medicion_Brix_en_la_industria_de_bebidas_ES.pdf

- [38] Agencia Estatal Boletín Oficial. (s.f.). *Código del Sector Vitivinícola*. Recuperado el Diciembre de 2018, de <https://www.boe.es/legislacion/codigos/codigo.php?id=218&modo=1¬a=0&tab=2>

