



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

*Diseño, desarrollo y puesta a
punto de lenguas electrónicas
voltamétricas y potenciométricas
de interés en la industria láctea*

Autora:

De Torre Herrera, Esther
Grado en Ingeniería Química

Tutora:

García Cabezón, Ana Cristina

Departamento:

CMeIM/EGI/ICGF/IM/IPF

Cotutora:

Celia García Hernández

Valladolid, Marzo 2019.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Ana Cristina García Cabezón la posibilidad de hacer este trabajo con ella que ha sido un auténtico placer, también a la gente de ambos laboratorios por todo lo que me han aportado y ayudado.

En segundo lugar, a todos los que me he encontrado a lo largo de estos años de carrera, en especial a Marta, compañera, amiga y más que digna sucesora.

A María Valdespino por aguantarme y apoyarme en los malos momentos y por estar en los buenos. Por todas las horas que hemos estado metidas en el laboratorio y las risas y lágrimas que hemos compartido.

A todos mis amigos, especialmente mis mellizas, Ana M^a y Esther Puerto, que no llevan mi sangre, pero se han ganado que las quiera como a unas hermanas y las considere familia.

Para acabar a mi familia, incluidos los miembros de cuatro patas (Bicho†, Murkie, Thor). A mi hermana Mónica y mis dos monstruitos Mateo y Naomi, a mi hermano Dani al que me encanta volver loco dándole guerra y a mi hermana Diana que es mi hermana, mi amiga, que me aguanta todos los días con mis cosas buenas y malas y a quien aspiro a parecerme, aunque sea sólo un poquito.

Y finalmente a mis padres (Félix y Josefa†), que sin ellos no hubiera llegado hasta aquí, que han sido, son y serán siempre lo más importante en mi vida y los mejores del mundo.

Muchas gracias a todos.

Resumen

Este trabajo ha consistido en el diseño, desarrollo y puesta a punto de dos tipos de lenguas electrónicas (una de tipo voltamétrico y otra de tipo potenciométrica) para su aplicación en productos de interés en la industria de alimentación. La lengua voltamétrica consta de una base de grafito que se ha modificado mediante la deposición de enzimas específicas. En el caso de la lengua potenciométrica se depositan diferentes membranas de tipo plástico con aditivos y plastificantes específicos sobre una base de resina de plata.

Se realiza una preevaluación del funcionamiento de ambas lenguas en disoluciones patrón (KCl o disoluciones que emulan sabores, etc.) y en muestras lácteas variadas.

Posteriormente se analizan cuantitativamente muestras de diferentes tipos de productos lácteos a base de leche de vaca, con diferentes contenidos en lactosa, en grasa o con aditivos especiales de las que se dispone de datos químicos contrastados, para determinar la capacidad de discriminación de nuestras lenguas electrónicas y así como para estudiar la correlación entre las respuestas medidas y los datos químicos para evaluar la capacidad de nuestro sistema para predecir las características de estos productos lácteos.

Para finalizar se realiza el tratamiento estadístico de todas las muestras lácteas analizadas.

Palabras clave

Sensor, biosensor, potencimetría, voltimetría, lengua electrónica, leche.

Abstract

This work has consisted of the design, development and tuning of two types of electronic languages (one of voltammetric type and another of potentiometric type) for its application in products of interest in the food industry. The voltammetric tongue consists of a graphite base that has been modified by the deposition of specific enzymes. In the case of the potentiometric tongue, different plastic type membranes with specific additives and plasticizers are deposited on a silver resin base.

A pre-evaluation of the functioning of both languages is performed in standard solutions (KCl or solutions that emulate flavors, etc.) and in varied dairy samples.

Subsequently, samples of different types of milk products based on cow's milk are analyzed quantitatively, with different contents in lactose, in fat or with special additives for which chemical data are available in order to determine the discrimination capacity of our electronic languages. and also, to study the correlation between the measured responses and the chemical data to evaluate the capacity of our system to predict the characteristics of these dairy products.

Finally, the statistical treatment of all the milk samples analyzed is carried out.

Keywords

Sensor, biosensor, potentiometry, voltammetry, electronic tongue, milk.

Abreviaturas y acrónimos

BOE: Boletín oficial del estado.

BPB: Disolución de buffer fosfato (Concentración 0.01M y pH = 7).

CE: Contra electrodo o electrodo auxiliar.

CP: Composite de plata.

CPE: Electrodo de pasta de grafito.

CV: Voltametría cíclica.

D: Diámetro.

Ferro - ferri: Disolución de ferro y ferricianuro potásico (Concentración 5mM de $K_3Fe(CN)_6$ y 5mM de $C_6FeK_4N_6 \cdot 3H_2O$ en KCl 0.1M).

GaOx: Enzima galacto-oxidasa (Concentración 5mg/mL y pH = 7).

Gluta: Glutaraldehído al 5%.

GOx: Enzima glucosa oxidasa (Concentración 5mg/mL y pH = 7).

KCl: Disolución de cloruro potásico (Concentración 0.1M).

LDA: Análisis discriminante lineal.

MLR: Regresión lineal múltiple.

PCA: Análisis de las componentes principales.

PLS: Análisis por mínimos cuadrados parciales.

PVC: Policloruro de vinilo de alto peso molecular.

RE: Electrodo de referencia.

SVMR: Máquinas de vectores de soporte para regresión.

THF: Tetrahidrofurano.

WE: Electrodo de trabajo.

%EST: Porcentaje de extracto seco total.

%MG: Porcentaje de materia grasa.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN..... - 1 -

1.1. JUSTIFICACIÓN.....	- 1 -
1.1.1. INDUSTRIA DE LA ALIMENTACIÓN.....	- 1 -
1.1.2. SECTOR LÁCTEO	- 2 -
1.2. OBJETIVOS	- 3 -
1.2.1. GENERALES.....	- 3 -
1.2.2. ESPECÍFICOS.....	- 3 -

CAPÍTULO 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS..... - 5 -

2.1. SENSORES	- 5 -
2.1.1. SENSORES QUÍMICOS.....	- 6 -
a) Sensores voltamétricos.....	- 6 -
I Electrodo de pasta de grafito (CPE).....	- 6 -
II Biosensores. CPE con enzimas.....	- 6 -
b) Sensores potenciométricos	- 6 -
2.2. PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS.....	- 7 -
2.2.1. CELDA ELECTROLÍTICA	- 7 -
2.2.2. VOLTAMETRÍA CÍCLICA (CV).....	- 8 -
2.2.3. POTENCIOMETRÍA	- 11 -
2.3. INDUSTRIA DE LA ALIMENTACIÓN. LÁCTEOS.....	- 11 -
2.3.1. INFORMACIÓN GENERAL	- 11 -
2.3.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.....	- 12 -
a) Apariencia	- 12 -
b) Punto de congelación	- 12 -
c) Punto de ebullición	- 12 -
d) Densidad	- 13 -
e) Viscosidad	- 13 -
f) pH y acidez.....	- 13 -
g) Conductividad eléctrica.....	- 14 -
2.3.3. NORMATIVA, TRATAMIENTOS Y CLASIFICACIONES.....	- 14 -
a) Tratamientos térmicos	- 14 -
b) Clasificación	- 16 -
c) Características de las leches de interés	- 17 -
2.3.4. IMPORTANCIA DE LA LACTOSA.....	- 17 -

CAPÍTULO 3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... - 19 -

3.1. PREPARACIÓN DE SENSORES	- 19 -
3.1.1. CPE	- 19 -
a) Materiales utilizados	- 19 -
b) Preparación del soporte	- 20 -
c) Preparación de la pasta	- 21 -

d) Fabricación de los electrodos	21 -
e) Modificaciones de los CPE	22 -
f) Mejoras en el proceso de fabricación	22 -
3.1.2. LENGUA POTENCIOMÉTRICA	23 -
a) Materiales utilizados	23 -
b) Preparación del soporte	25 -
c) Preparación de las membranas	26 -
d) Fabricación de los electrodos	28 -
e) Modificaciones de la lengua potenciométrica	28 -
3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS	28 -
3.2.1. ENSAYOS VOLTAMÉTRICOS	29 -
a) Elementos utilizados	29 -
b) Disoluciones utilizadas	29 -
c) Voltametría cíclica	30 -
3.2.2. ENSAYOS POTENCIOMÉTRICOS	33 -
a) Elementos utilizados	33 -
b) Disoluciones utilizadas	33 -
c) Potenciometría	34 -
3.3. TRATAMIENTO QUIMIOMÉTRICO.....	36 -
3.3.1. PCA.....	36 -
3.3.2. LDA.....	36 -
3.3.3. PLS.....	36 -
3.3.4. MLR.....	37 -
3.3.5. MÉTODO DE TRABAJO PLS Y MLR.....	37 -

CAPÍTULO 4 RESULTADOS EXPERIMENTALES - 39 -

4.1. VOLTAMÉTRICOS.....	39 -
4.1.1. CARACTERIZACIÓN	39 -
a) KCl.....	39 -
b) Disolución de ferro - ferricianuro	40 -
4.1.2. ESTUDIO PRELIMINAR	40 -
a) Discriminación.....	41 -
I En bruto	41 -
II Muestras lácteas en disolución de ferro - ferricianuro.....	44 -
b) Envejecimiento	46 -
I En bruto	47 -
II En ferro - ferricianuro.....	50 -
c) Correlaciones.....	52 -
4.1.3. APLICACIÓN DE LA LENGUA VOLTAMÉTRICA	55 -
a) Discriminación.....	55 -
I Leche entera	56 -
II Leche semidesnatada	58 -
b) Correlaciones.....	62 -
4.2. LENGUA POTENCIOMÉTRICA	67 -

4.2.1. CARACTERIZACIÓN	- 67 -
a) KCl	- 68 -
b) Sabores: Dulce, salado, ácido, amargo y umami	- 68 -
4.2.2. DISCRIMINACIÓN PREVIA EN LECHEs.	- 70 -
4.2.3. APLICACIÓN DE LA LENGUA POTENCIOMÉTRICA A LECHEs	- 72 -
a) Discriminación	- 72 -
I Leches enteras	- 73 -
II Leches semidesnatadas	- 76 -
III Conjuntas	- 79 -
b) Envejecimiento	- 80 -
I Leches enteras	- 81 -
II Leches semidesnatadas	- 82 -
c) Correlaciones	- 84 -
<u>CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS</u>	- 89 -
5.1. CONCLUSIONES	- 89 -
5.2. VENTAJAS E INCONVENIENTES	- 89 -
5.2.1. LENGUA VOLTAMÉTRICA.....	- 89 -
5.2.2. LENGUA POTENCIOMÉTRICA	- 89 -
5.3. POSIBLES MEJORAS	- 90 -
5.3.1. LENGUA VOLTAMÉTRICA.....	- 90 -
5.3.2. LENGUA POTENCIOMÉTRICA	- 90 -
<u>CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFÍA</u>	- 91 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Logo del grupo UVaSens.	- 1 -
Figura 2. Evolución de la producción en la industria alimentaria.....	- 2 -
Figura 3. Funcionamiento de un sensor.	- 5 -
Figura 4. Esquema general de conexión de los electrodos.....	- 7 -
Figura 5. Contraelectrodo (Placa de platino).....	- 7 -
Figura 6. Electrodo comercial de Ag/AgCl.	- 8 -
Figura 7. Señal de excitación en CV.....	- 8 -
Figura 8. Voltamograma de un sensor CPE no útil.....	- 9 -
Figura 9. Voltamograma de un sensor CPE en un medio sin especies oxidantes/reductoras.....	- 9 -
Figura 10. Voltamograma de un sensor CPE en un medio con especies oxidantes/reductoras.....	- 10 -
Figura 11. Apariencia de la leche.....	- 12 -
Figura 12. Relación viscosidad-temperatura.....	- 13 -
Figura 13. Pasteurización a baja-media temperatura.	- 15 -
Figura 14. Pasteurización a media-alta temperatura.	- 15 -
Figura 15. Molécula de la lactosa.	- 18 -
Figura 16. Pegamento epoxi (Araldite) y grafito.	- 19 -
Figura 17. Cabeza lijadora y lima.	- 20 -
Figura 18. Cocodrilos de conexión al potenciostato.	- 21 -
Figura 19. Sensores de grafito terminados.	- 22 -
Figura 20. Composite de plata y tubo de metacrilato.....	- 25 -
Figura 21. Soporte de la lengua potenciométrica.....	- 26 -
Figura 22. Potenciostato utilizado (Autolab).	- 29 -
Figura 23. Esquema de conexión de los electrodos en CV.	- 31 -
Figura 24. Captura de pantalla del programa (Nova).	- 31 -
Figura 25. Definición de los valores de caracterización de la CV.	- 32 -
Figura 26. Botón de inicio de la CV.	- 32 -
Figura 27. Ejemplo de una CV en Nova.	- 32 -
Figura 28. Data logger y multiplexor.	- 33 -
Figura 29. Esquema de conexión de los electrodos en potenciometría.	- 34 -
Figura 30. Pantalla de inicio del programa de ejecución del data logger...	- 35 -
Figura 31. Denominación de los canales de medida.	- 35 -
Figura 32. Configuración para la toma de medidas.....	- 36 -
Figura 33. Sensor de grafito en KCl.	- 39 -
Figura 34. Sensor de grafito en ferro-ferri	- 40 -
Figura 35. Discriminación en bruto, grafito.	- 41 -
Figura 36. Discriminación en bruto, grafito con GOx.	- 42 -
Figura 37. PCA leche en bruto, grafito.	- 43 -
Figura 38. PCA leche en bruto, grafito con GOx.	- 43 -
Figura 39. Discriminación en ferro - ferri, grafito.	- 44 -
Figura 40. Discriminación en ferro - ferri, grafito con GOx.	- 45 -
Figura 41. PCA leche en ferro - ferri, grafito.	- 45 -
Figura 42. PCA leche en ferro - ferri, grafito con GOx.	- 46 -

Figura 43. Envejecimiento Clunia en bruto, grafito.	47 -
Figura 44. Envejecimiento Peñaranda en bruto, grafito.	47 -
Figura 45. Envejecimiento Covarrubias en bruto, grafito.	48 -
Figura 46. Envejecimiento Ponferrada en bruto, grafito.	48 -
Figura 47. PCA envejecimiento en bruto, grafito.	49 -
Figura 48. Envejecimiento Clunia en ferro - ferri, grafito.	50 -
Figura 49. Envejecimiento Peñaranda en ferro - ferri, grafito.	50 -
Figura 50. Envejecimiento Covarrubias en ferro - ferri, grafito.	51 -
Figura 51. Envejecimiento Ponferrada en ferro - ferri, grafito.	51 -
Figura 52. PCA envejecimiento en ferro - ferri, grafito.	52 -
Figura 53. Comparativa leche entera, grafito.	56 -
Figura 54. Comparativa leche entera, grafito con GOx.	57 -
Figura 55. Comparativa leche entera, grafito con GaOx.	57 -
Figura 56. PCA muestras analizadas, leches enteras.	58 -
Figura 57. Comparativa leche semidesnatada, grafito.	59 -
Figura 58. Comparativa leche semidesnatada, grafito con GOx.	59 -
Figura 59. Comparativa leche semidesnatada, grafito con GaOx.	60 -
Figura 60. PCA muestras analizadas, leches semidesnatadas.	60 -
Figura 61. PCA muestras analizadas.	61 -
Figura 62. PLS leche entera, acidez.	62 -
Figura 63. PLS leche entera, densidad.	62 -
Figura 64. PLS leche entera, %MG.	63 -
Figura 65. PLS leche entera, %proteínas.	63 -
Figura 66. PLS leche entera, %EST.	63 -
Figura 67. PLS leche entera, sedimento.	64 -
Figura 68. PLS leche semidesnatada, acidez.	64 -
Figura 69. PLS leche semidesnatada, densidad.	64 -
Figura 70. PLS leche semidesnatada, %MG.	65 -
Figura 71. PLS leche semidesnatada, %proteínas.	65 -
Figura 72. PLS leche semidesnatada, % EST.	65 -
Figura 73. PLS leche semidesnatada, sedimento.	66 -
Figura 74. KCl 0.1M, lengua potenciométrica.	68 -
Figura 75. Sabores, lengua potenciométrica.	69 -
Figura 76. Discriminación de sabores mediante potencimetría.	70 -
Figura 77. Discriminación previa, lengua potenciométrica.	71 -
Figura 78. Discriminación previa leches.	72 -
Figura 79. Leches enteras, lengua potenciométrica.	73 -
Figura 80. LDA leches enteras (Día 0).	74 -
Figura 81. Leches enteras envejecidas, lengua potenciométrica.	75 -
Figura 82. LDA leches enteras envejecidas (Día 7).	76 -
Figura 83. Leches semidesnatadas, lengua potenciométrica.	76 -
Figura 84. LDA leches semidesnatadas (Día 0).	77 -
Figura 85. Leches semidesnatadas envejecidas, lengua potenciométrica.	78 -
Figura 86. LDA leches semidesnatadas envejecidas (Día 7).	79 -
Figura 87. LDA conjunta (Día 0).	79 -

Figura 88. LDA conjunta envejecidas (Día 7).	- 80 -
Figura 89. Comparativa del envejecimiento, entera con calcio.....	- 81 -
Figura 90. LDA envejecimiento, enteras.....	- 82 -
Figura 91. Comparativa del envejecimiento, semidesnatada fólico B.	- 83 -
Figura 92. LDA envejecimiento, semidesnatadas.....	- 84 -
Figura 93. MLR leche entera, acidez y densidad.	- 85 -
Figura 94. MLR leche entera, %MG y %proteína.....	- 85 -
Figura 95. MLR leche entera, %EST y sedimento.	- 85 -
Figura 96. MLR leche semidesnatada, acidez y densidad.....	- 86 -
Figura 97. MLR leche semidesnatada, %MG y %proteína.....	- 86 -
Figura 98. MLR leche semidesnatada, %EST y sedimento.	- 86 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca.....	- 12 -
Tabla 2. Valores de la relación viscosidad-temperatura.....	- 13 -
Tabla 3. Datos de la curva de pasteurización.	- 14 -
Tabla 4. Plastificantes utilizados con su correspondiente nomenclatura...-	23 -
Tabla 5. Aditivos utilizados con su nomenclatura correspondiente.	- 24 -
Tabla 6. Cantidades pesadas para las membranas potenciométricas.	- 27 -
Tabla 7. Tabla de disoluciones para caracterización.....	- 29 -
Tabla 8. Tabla de muestras para el estudio preliminar.	- 30 -
Tabla 9. Tabla de muestras analizadas.	- 30 -
Tabla 10. Tabla de disoluciones para caracterización, sabores.	- 33 -
Tabla 11. Tabla de muestras para discriminación previa.	- 33 -
Tabla 12. Tabla de muestras analizadas.....	- 34 -
Tabla 13. Nomenclatura PCA discriminación.	- 42 -
Tabla 14. Nomenclatura PCA envejecimiento.....	- 49 -
Tabla 15. PLS leche en bruto analizada con grafito.	- 53 -
Tabla 16. SVMR leche en bruto, día 0. Modelo.....	- 54 -
Tabla 17. SVMR Clunia en bruto, día 0. Predicción.	- 54 -
Tabla 18. SVMR Peñaranda en bruto, día 0. Predicción.	- 54 -
Tabla 19. SVMR Covarrubias en bruto, día 0. Predicción.....	- 55 -
Tabla 20. SVMR Ponferrada en bruto, día 0. Predicción.	- 55 -
Tabla 21. Nomenclatura PCA para las muestras de leche.....	- 56 -
Tabla 22. PCA muestras analizadas.	- 61 -
Tabla 23. PLS muestras analizadas, leche entera.....	- 66 -
Tabla 24. PLS muestras analizadas, leche semidesnatada.	- 66 -
Tabla 25. Numeración de las membranas.	- 68 -
Tabla 26. Numeración de las muestras correspondientes a sabores.....	- 70 -
Tabla 27. Numeración de las muestras para discriminación previa.	- 71 -
Tabla 28. Numeración LDA, muestras potencimetría.....	- 73 -
Tabla 29. Numeración LDA, envejecidas conjuntas.	- 73 -
Tabla 30. Numeración LDA envejecimiento.	- 80 -
Tabla 31. MLR muestras analizadas, leche entera.	- 87 -
Tabla 32. MLR muestras analizadas, leche semidesnatada.	- 87 -

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Semirreacción del electrodo de Ag/AgCl.	- 8 -
Ecuación 2. Ecuación de reversibilidad de una RedOx.	- 10 -
Ecuación 3. Ecuación de Nernst.	- 11 -
Ecuación 4. Ecuación del extracto seco.	- 17 -
Ecuación 5. Semirreacciones ferro-ferricianuro.	- 40 -

MEMORIA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Área de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica y en conjunto con el Grupo UVaSens de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid.

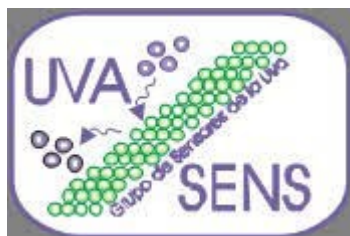


Figura 1. Logo del grupo UVaSens.

El grupo UvaSens es un equipo multidisciplinar con sede en la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid. Desarrolla nuevos materiales y métodos de análisis en sensores y concretamente está especializado en el diseño y optimización de redes de sensores para su aplicación en el campo de la alimentación.

Desde el año 1992 mantiene dos líneas de investigación, una básica que diseña, prepara y caracteriza películas nanoestructuradas para su posible aplicación como sensores y una aplicada dedicada a diseñar redes de sensores especializadas en el ámbito del análisis y control de calidad en el sector alimentación, en los últimos años se ha especializado en el análisis de vinos y mostos, aunque recientemente se ha abierto una nueva etapa centrada en el análisis de productos lácteos, dentro de esta última vía se encuadra este trabajo [1].

1.1. Justificación

1.1.1. Industria de la alimentación

En España la industria de la alimentación y bebidas ha conseguido convertirse y mantenerse como primer sector industrial en facturación, lo que implica que es un importante generador de empleo con un volumen de facturación que supera los 98.000 millones de euros con cerca del 22% del total de ventas [2], [3].

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

Evolución de la producción¹ de la Industria de Alimentación y Bebidas
Niveles (millones de €) y porcentajes de crecimiento

	Niveles			Crecimientos		
	Producción nominal	Producción real	Índice precios industriales	Producción nominal	Producción real	Índice precios industriales
2009	80.177	80.443	99,67	-8,5	-5,6	-3,0
2010	82.315	82.315	100,00	2,7	2,3	0,3
2011	88.673	83.942	105,64	7,7	2,0	5,6
2012	90.169	82.060	109,88	1,7	-2,2	4,0
2013	91.450	80.681	113,35	1,4	-1,7	3,2
2014	93.396	84.036	111,14	2,1	4,2	-2,0
2015	98.163	87.586	112,08	5,1	4,2	0,8
2016 (*)	99.431	89.200	111,47	1,3	1,8	-0,5
2017 (*)	102.313	89.885	113,83	2,9	0,8	2,1

[1] Ventas netas de productos valoradas a precios de venta, sin incluir los gastos de transporte ni los impuestos que gravan esas operaciones.

[*] Estimación a partir de los índices de producción industrial y de los índices de precios industriales

Fuente: Encuesta Industrial de Empresas, INE. Índice de Producción Industrial (IPI), INE e Índice de Precios Industriales (IPRI), INE.

Figura 2. Evolución de la producción en la industria alimentaria.

Existen diferentes subsectores en términos de facturación y empleo liderados por el sector cárnico, el sector fabricación de bebidas y a continuación el de aceites o el de productos lácteos del que se hablará a continuación.

1.1.2. Sector lácteo

El sector lácteo es un sector estratégico tanto desde el punto de vista económico como desde el social ya que supone:

- Mas de 8.000 millones de euros en ventas.
- Un total del 8.2% de las ventas totales del sector agroalimentario.
- Emplea a más de 24.000 personas, es decir, el 6.7% del total del sector alimentario.
- Las exportaciones de este sector suponen casi 960 millones de euros.

En 2017 casi el 61% de los ganaderos distribuía leche de vaca, frente al 16% que distribuía leche de oveja. En la comunidad de Castilla y León existen explotaciones ganaderas de ambos tipos de leche [2], [4].

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.2. Objetivos

1.2.1. Generales

Este trabajo se basa en el diseño, desarrollo y puesta a punto de diferentes tipos de sensores para la fabricación de lenguas electrónicas, concretamente de tipo voltamétrico y potenciométrico, que se utilizarán para el análisis de productos lácteos.

En otro trabajo fin de grado realizado por Dña. María Valdespino San José, con quien de modo conjunto se han diseñado y desarrollado ambas lenguas electrónicas, estas se han utilizado para el análisis y control de calidad de vinos y zumos [5].

1.2.2. Específicos

Con el fin de realizar el objetivo general se han marcado una serie de objetivos más específicos:

- Fabricación y puesta a punto de diferentes sensores de pasta de grafito para su utilización como sensores y biosensores voltamétricos.
- Caracterización de dichos sensores mediante el análisis de disoluciones patrón.
- Diseño de una lengua basada en sensores de membrana de PVC de tipo potenciométrico.
- Fabricación y puesta a punto de dicha lengua potenciométrica.
- Caracterización de la lengua potenciométrica mediante el análisis de diferentes disoluciones patrón.
- Análisis de lácteos, diferentes muestras de leche, con ambos tipos de sensores.
- Estudio quimiométrico de los resultados obtenidos mediante técnicas estadísticas tipo PCA y LDA.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En este capítulo se va a desarrollar el fundamento teórico base de este trabajo. Se comenzará explicando los conceptos de sensor voltamétrico, biosensor y sensor potenciométrico. A continuación, se procederá a explicar los diferentes procedimientos utilizados para la obtención y tratamiento de los datos experimentales.

2.1. Sensores

Se define sensor como un dispositivo capaz de convertir la información recibida desde el exterior en una señal, generalmente de tipo eléctrico, lo que permite su análisis y cuantificación [6].

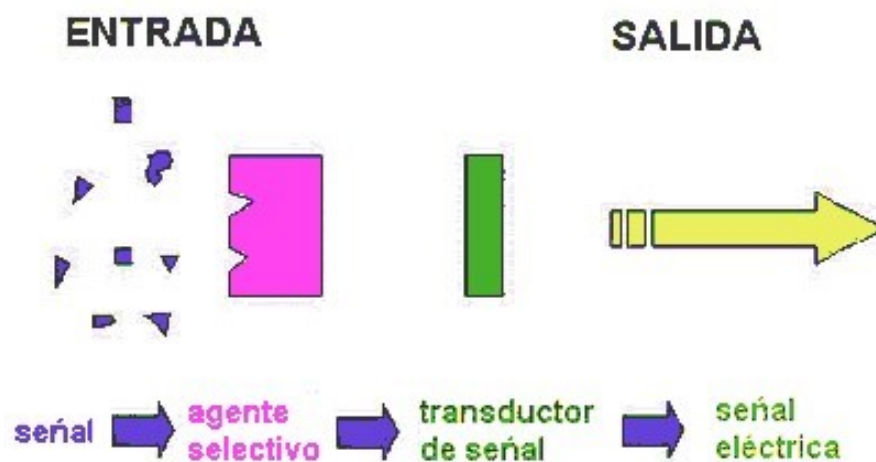


Figura 3. Funcionamiento de un sensor.

Se caracterizan por su robustez, facilidad de uso, capacidad de suministrar información y dimensiones reducidas. Según la naturaleza de la información recibida se pueden clasificar los sensores en dos tipos [7]:

1. Físicos: la información recibida es de tipo físico, como la temperatura.
2. Químicos: se recibe información química, como cambios en la composición del analito.

En este trabajo se realiza experimentación con sensores de tipo químico, por lo que se profundizará únicamente en ellos.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

2.1.1. Sensores químicos

Dentro de los sensores químicos (o electroquímicos) los más utilizados son aquellos basados en amperometría y potenciometría.

a) Sensores voltamétricos

Los sensores voltamétricos son aquellos que registran la intensidad de corriente producida por el sistema al aplicar un voltaje al electrodo. Pertenecen a la misma familia que los sensores de tipo amperométrico, donde se aplica una corriente y se registra la diferencia de potencial.

Al aplicar un rango de potencial se produce la oxidación/reducción de las especies electroactivas [8], [9].

I Electroodos de pasta de grafito (CPE)

Son un tipo de sensor voltamétrico cuyo elemento de conducción es pasta de grafito, más adelante se procederá a explicar su fabricación y algunas de las modificaciones realizadas.

II Biosensores. CPE con enzimas

En la bibliografía se define biosensor de dos formas, en función de donde se encuentre el elemento biológico:

1. Forma parte del analito.
2. Forma parte del propio dispositivo de análisis.

El posible material biológico para utilizar es muy variado desde ADN hasta tejidos, pasando por las enzimas. Siendo estos últimos los más desarrollados en la bibliografía y con mayor aplicación en la industria.

En este trabajo se define biosensor como dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento selectivo de tipo biológico, en estos sensores el material biológico es el que otorga la selectividad. Se han utilizado sensores voltamétricos modificados mediante la deposición de enzimas [10], [11].

b) Sensores potenciométricos

Los sensores potenciométricos son sensores de tipo químico, en ellos se provoca un equilibrio entre la superficie del sensor y se mide el potencial generado entre el electrodo y la solución, dicho potencial se denomina potencial de membrana [7]-[9], [12].

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.2. Procedimientos de análisis

2.2.1. Celda electrolítica

En los procedimientos de análisis electroquímico se utiliza una celda compuesta de electrodos que, de forma general, se conectan de acuerdo con el siguiente esquema (Figura 4):

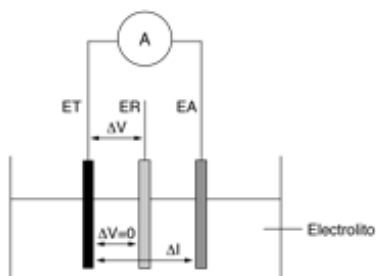


Figura 4. Esquema general de conexión de los electrodos.

A continuación, se va a definir cada tipo de electrodo y su función en el sistema [13]:

Electrodo de trabajo o WE: Su función, dependiendo del tipo de sensor, es ser el medio sobre el que se aplica el potencial (sensores voltamétricos) o medir el potencial de la disolución (sensores potenciométricos). Corresponde a los sensores CPE y los electrodos de la lengua potenciométrica.

Electrodo auxiliar o CE: Su función es cerrar el circuito y excluir las reacciones secundarias, en el caso de sensores potenciométricos no es necesario utilizarlo. Corresponde con la placa de platino y el soporte de sujeción adecuado. Se recomienda lavar y quemar antes de cada utilización y siempre que se cambie de disolución para eliminar las impurezas.



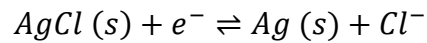
Figura 5. Contraelectrodo (Placa de platino).

Electrodo de referencia o RE: Presenta un potencial conocido, constante e insensible a la composición de las disoluciones de estudio, proporciona potenciales reproducibles y sin cambios debidos al paso de pequeñas corrientes eléctricas, esto permite conocer el potencial exacto de nuestra disolución a analizar en lugar de solo una diferencia de potencial. Corresponde con un electrodo de Ag^+/AgCl . Antes de introducirlo en la disolución a medir

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

debe aclararse con agua desionizada, también se debe enjuagar antes de almacenarlo, lo que debe hacerse en una disolución de KCl [14].

En él tiene lugar la semirreacción del electrodo de plata/cloruro de plata cuyo potencial es $E_0 = 0.199V$ [15]:



Ecuación 1. Semirreacción del electrodo de Ag/AgCl.



Figura 6. Electrodo comercial de Ag/AgCl.

2.2.2. Voltametría cíclica (CV)

La CV es una técnica electroquímica basada en la respuesta intensidad-potencial de un electrodo en la solución a analizar. Estudia los cambios de intensidad en función del potencial que se aplica debido a la electrólisis de las especies electroactivas presentes [9], [13].

La respuesta se produce al aplicar una variación de potencial de forma triangular como se muestra en la Figura 7:

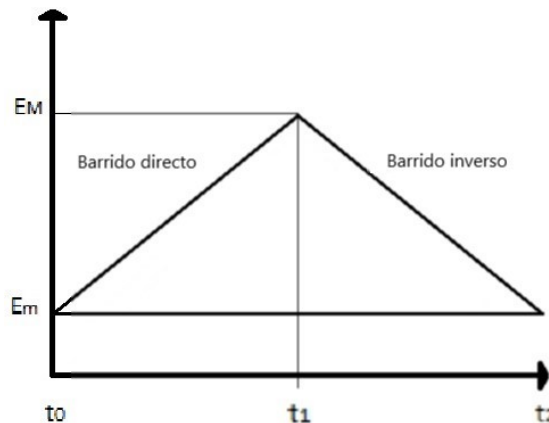


Figura 7. Señal de excitación en CV.

La variación del potencial se produce de forma lineal tanto en la parte creciente como en la parte decreciente y está limitada por E_M (Valor máximo del potencial) y E_m (Valor mínimo del potencial), puede darse el caso de que el valor E_0 (Valor de potencial inicial) no coincida con ninguno de estos dos potenciales en cuyo caso tendremos un primer ciclo parcial. Cuando la aplicación de potencial crece se produce el barrido directo, y cuando decrece se denomina barrido inverso.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La respuesta obtenida para este barrido se estudia y permite obtener mucha información, tanto por los valores numéricos como por la forma resultante, por ejemplo, se puede conocer la reversibilidad del proceso oxidación/reducción [16]–[18].

A continuación, se hablará de posibles respuestas genéricas y la información obtenida de ellas:

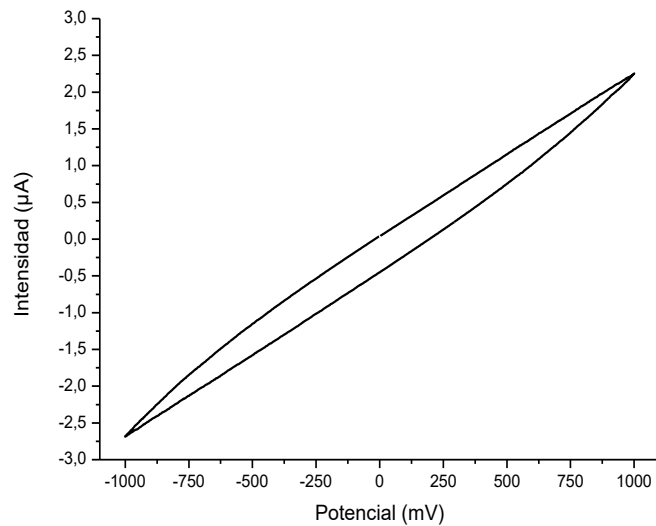


Figura 8. Voltamograma de un sensor CPE no útil.

En la Figura 8 se observa el voltamograma obtenido con un sensor de alta impedancia, es decir, que no presenta conductividad y que por tanto no es útil en este tipo de medida.

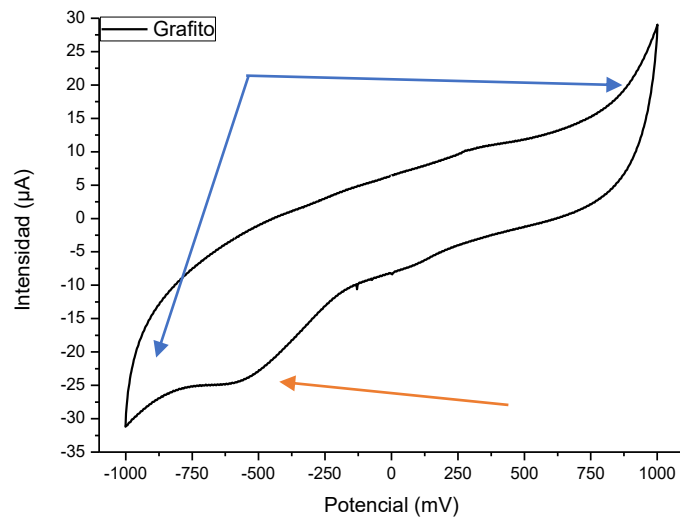


Figura 9. Voltamograma de un sensor CPE en un medio sin especies oxidantes/reductoras.

Se observa que la Figura 9 es claramente diferente a la anterior, se trata de un sensor funcional que se encuentra en un medio carente de especies oxidantes/reductoras y por tanto no presenta picos claramente definidos. Se distinguen 3 singularidades, los dos extremos que corresponden a la degradación del medio catalítico (Flechas azules) y una pequeña protuberancia en reducción (Flecha naranja, aproximadamente a un potencial de -0.5V) que es característica del sensor utilizado.

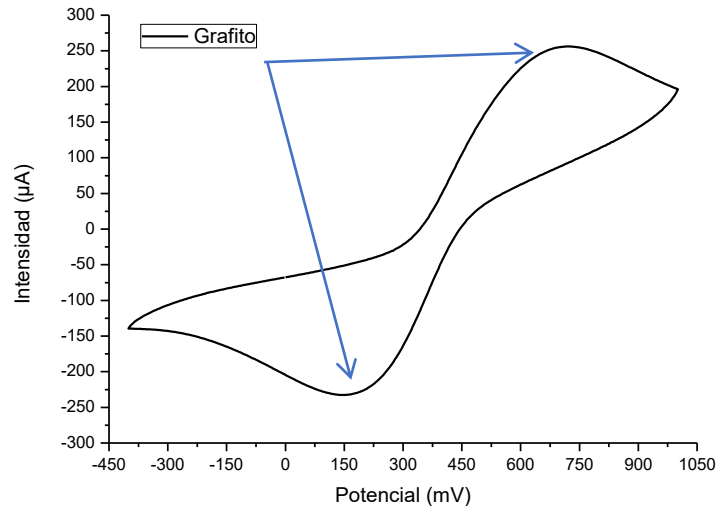


Figura 10. Voltamograma de un sensor CPE en un medio con especies oxidantes/reductoras.

En la Figura 10 se observa la aparición de un pico en oxidación y otro en reducción (Flechas azules), debidos a la presencia de las especies oxidantes/reductoras presentes en la disolución. Con la aparición de estos picos se obtiene información acerca de la reversibilidad del proceso caracterizada mediante la Ecuación 2:

$$\Delta E(mV) = E_{oxidación} - E_{reducción} \leq \frac{59mV}{n^{\circ} de e^{-}}$$

Ecuación 2. Ecuación de reversibilidad de una RedOx.

Esto implica que, si la diferencia de potencial entre oxidación y reducción (ΔE) es menor o igual a ese valor el proceso es reversible además cuanto mayor sea la diferencia entre ΔE y el valor de referencia más reversible es [15].

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.2.3. Potenciometría

La potenciometría es una medida basada en la diferencia de potencial establecida por el paso de electrones a través de una membrana. Como la diferencia de potencial es función de la actividad iónica de la muestra a analizar se registra la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia (RE) y el de medida (WE), las condiciones de operación se establecen con corriente nula, es decir, se mide el potencial a circuito abierto.

Debido a la gran variedad de membranas con diferentes patrones de selectividad son grandes candidatos para usarse como sensores en lenguas electrónicas de tipo potenciométrico, aunque tienen una utilidad limitada casi en exclusiva al estudio de especies cargadas [19]-[21].

Se rigen por la ecuación de Nernst [14]:

$$E = E_0 - \frac{R * T}{n * F} \ln Q$$

Ecuación 3. Ecuación de Nernst.

- E = Potencial corregido.
- E₀ = Potencial estándar.
- R = Constante universal de los gases ($R = 8.3144 \frac{J}{K * mol}$).
- T = Temperatura en grados Kelvin (K).
- n = Número de electrones transferidos.
- F = Constante de Faraday ($F = 96500 \frac{C}{mol}$).
- Q = Coeficiente de reacción ($Q = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$).

2.3. **Industria de la alimentación. Lácteos**

El principal sujeto de análisis de este trabajo es el producto estrella del sector lácteo, la leche de vaca, a continuación, se hablará un poco de este producto.

2.3.1. Información general

Según el Código Alimentario Español se define la leche natural como “el producto integro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domesticas sanas y bien alimentadas”. Además, se especifica que la denominación genérica de leche comprende única y exclusivamente la leche natural de vaca, necesitándose añadir la especie concreta en cualquier otro caso (Por ejemplo, leche de oveja) [22]-[24].

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

La composición general de la leche de vaca entera presenta los siguientes valores [25]:

Componente	Cantidad por 100mL
Agua	88 g.
Lactosa	4.8 g.
Proteínas totales	3.3 g.
Caseína	2.73 g.
Grasas totales	3.8 g.
Calcio	125 mg.
Fósforo	96 mg.
Nitrógeno total	550 mg.

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca.

2.3.2. Propiedades fisicoquímicas

a) Apariencia

La leche es un líquido opaco con apariencia blanquecina, este aspecto se debe a la organización de caseínas formando micelas. Los principales pigmentos de la leche son el caroteno y la riboflavina [26].



Figura 11. Apariencia de la leche.

b) Punto de congelación

Debido a la presencia de sustancias disueltas el punto de congelación de la leche es ligeramente inferior a 0°C, concretamente varía entre -0.53 y -0.57°C.

Esto permite además determinar si hay aguado en la leche, al presentar mayor cantidad de agua su punto de congelación será más cercano a cero [26].

c) Punto de ebullición

El punto de ebullición de la leche a nivel del mar se sitúa en 100.17°C, esto es debido a los azúcares y minerales disueltos [26].

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

d) Densidad

No presenta un valor constante puesto que depende en gran medida de las sustancias disueltas, principalmente:

- Concentración de sólidos disueltos y en suspensión, tendrá mayor densidad cuando presenta mayor cantidad de sólidos.
- La densidad varía de forma inversa al contenido graso.
- Depende de la temperatura, a mayor temperatura menor densidad.

De forma habitual varía entre 1.0231 y 1.0398g/mL [26].

e) Viscosidad

Presenta mayor viscosidad que el agua debido a la materia grasa globular. Su valor general a temperatura ambiente es de 2.2cp. Según aumenta la temperatura la viscosidad va disminuyendo de forma acusada hasta alcanzar los 70°C punto en el que empieza a aumentar.

Temperatura (°C)	Viscosidad (cp.)	
	Leche entera	Leche desnatada
5	3.2	3.9
10	2.8	2.5
20	2.2	1.9
30	1.65	1.35

Tabla 2. Valores de la relación viscosidad-temperatura

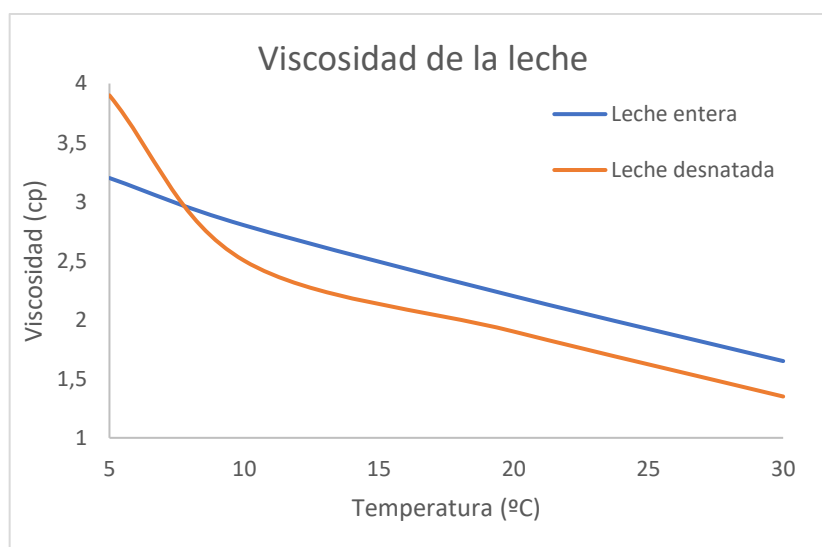


Figura 12. Relación viscosidad-temperatura

f) pH y acidez

El pH de la leche de vaca varía entre 6.65 y 6.71, presentando una elevada dependencia de la temperatura.

La acidez titulable es la suma de la natural y la desarrollada, se expresa en grados Dornic (°D) donde 1°D = 0.1mg/L de ácido láctico) y en la leche varía entre 14-18°D [26].

g) Conductividad eléctrica

Varía en función de la cantidad de agua presente y la acidez, pero su valor medio ronda los $45 * 10^{-4} \frac{S}{m}$ [24].

2.3.3. Normativa, tratamientos y clasificaciones.

a) Tratamientos térmicos

➤ Pasteurización:

- La pasteurización es un proceso utilizado para destruir las formas vegetativas de los microorganismos patógenos de los alimentos y la flora banal, para ello, se somete el alimento a temperaturas variables sin que sufra modificaciones esenciales en su composición y asegure su conservación por un periodo superior a cuarenta y ocho horas.
- Se tratan térmicamente los productos lácteos con el fin de minimizar o incluso destruir los agentes de deterioro y aquellos causantes de problemas sanitarios. Tras el tratamiento el producto se mantiene, hasta su consumo, en un envase adecuado para evitar una posible recontaminación.
- Curva temperatura - tiempo: Este tratamiento térmico es una combinación de los parámetros temperatura y tiempo. A continuación, se detallan algunos de estos pares de valores de la curva T^a-T:

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
54.4	3600	65.5	120
55.5	3600	68.3	30
56.6	2400	71.1	20
57.7	1800	76.6	20
25.9	1200	82.2	20
60	600	93.3	20
61.1	600	100	10
62.7	360		

Tabla 3. Datos de la curva de pasteurización.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

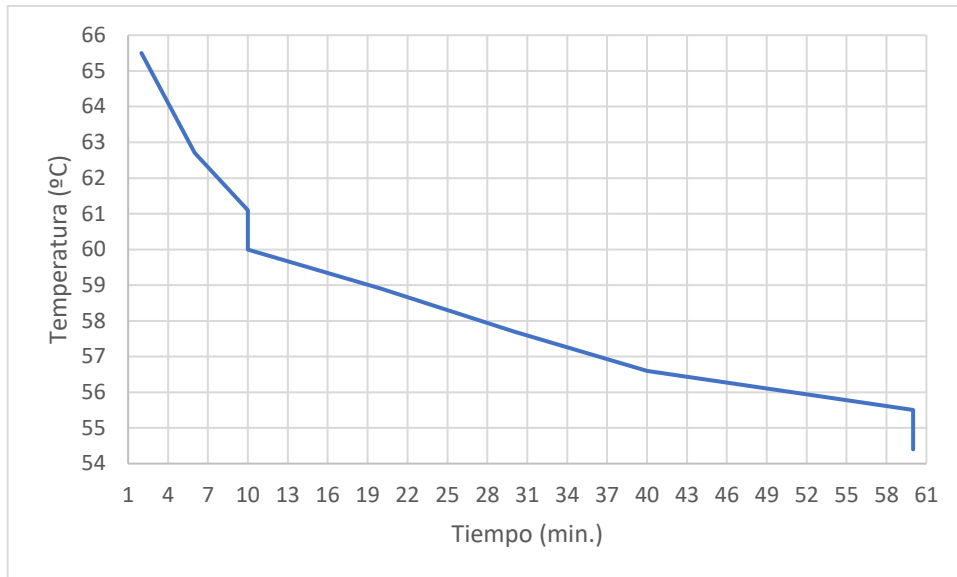


Figura 13. Pasteurización a baja-media temperatura.

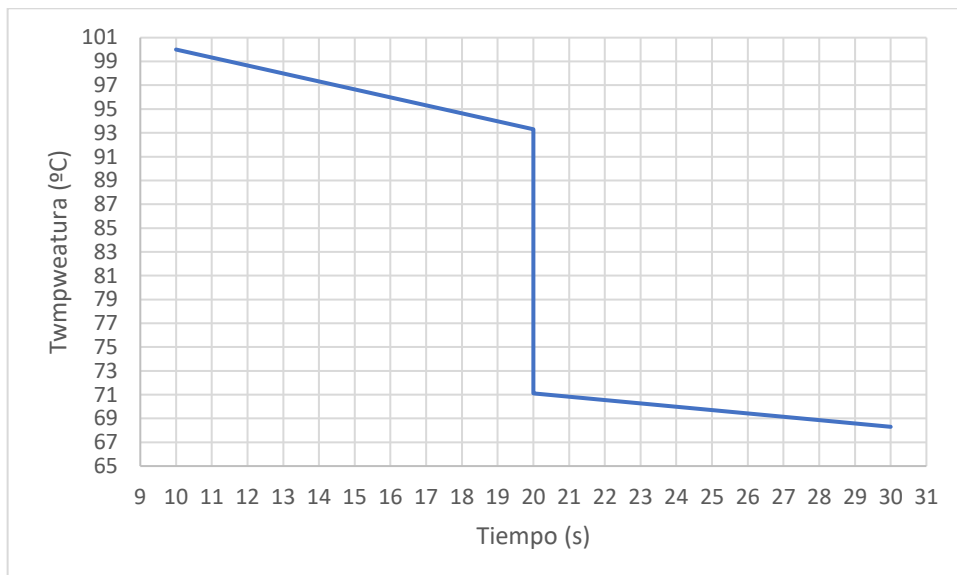


Figura 14. Pasteurización a media-alta temperatura.

- Con esta técnica se consiguen algunos beneficios como:
 - La disminución de la velocidad de deterioro de la leche.
 - Se consigue alargar la vida útil del producto, manteniéndola refrigerada (entre 4 y 7°C) aguanta hasta 10 días.
 - Detener la proliferación de microorganismos dañinos para el sistema gastrointestinal [27].
- Esterilización térmica:

En el ámbito alimentario, según el BOE, “la esterilización es el proceso por el que se destruyen de los alimentos todas las formas de vida de

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

microorganismos patógenos o no patógenos, a temperaturas adecuadas, aplicadas de una sola vez o por tindalización”.

- Tindalización: Es un proceso de esterilización en discontinuo. Se somete al producto a un proceso en serie de calentamiento y enfriamiento para eliminar las esporas presentes. Necesita de al menos tres sesiones y no requiere altas temperaturas ni tiempos de tratamiento prolongados.
- Uperización: Se inyecta vapor de agua de forma continua directamente sobre la leche y posteriormente se retira el agua adicionada mediante vacío.
- Proceso larga vida o UHT: La esterilización se realiza mediante un tratamiento térmico a ultra alta temperatura y cortos periodos de tiempo (Ultra High Temperature) y un llenado aséptico en un ambiente estéril. Es un proceso que le confiere a la leche al menos un año de vida a temperatura ambiente mientras permanece empaquetado [27].

b) Clasificación

Según el tratamiento que se aplique a la leche natural se clasificará de la siguiente manera [22]:

- Higienizadas: Se les aplica un proceso tecnológico autorizado que asegure la total destrucción de patógenos y la casi totalidad de la flora banal.
- Certificadas: proceden de explotaciones ganaderas sometidas a un riguroso control sanitario oficial.
- Especiales: Leche natural a la que se le realizan ciertas operaciones que cambian o modifican su composición característica:
 - Leche desnatada: Privada total o parcialmente de su contenido graso natural.
 - Leche enriquecida: Modificadas mediante la adición de principios inmediatos, minerales y/o vitaminas.
 - Leche adicionada de aromas y/o estimulantes.
 - Leche concentrada.
 - Leche fermentada-acidificada.
- Conservadas: Manipulada industrialmente para asegurar la duración de su aprovechamiento alimenticio por más de 30 días:
 - Leche esterilizada: Es sometida a un proceso tecnológico que asegure la destrucción de gérmenes e inactividad de sus formas de resistencia.
 - Leche evaporada.
 - Leche condensada.
 - Leche en polvo.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

c) Características de las leches de interés

En el momento de su venta debe presentar, en función de la clasificación anterior, las siguientes características [22]:

- Leche natural de vaca:
 - Materia grasa: Contenido mínimo el 3% en peso.
 - Lactosa: Contenido mínimo el 4.2% en peso.
 - Proteínas: Contenido mínimo del 3.2% en peso.
 - Cenizas: Mínimo 0.65% en peso.
 - Extracto seco magro: Mínimo 8.2% en peso.
 - Acidez, expresada en ácido láctico: Máximo 0.2g/100mL.
 - Impurezas macroscópicas: Máximo de grado 1.
 - Prueba de la reductasa microbiana con azul de metileno: Más de dos horas.
 - Leche higienizada, igual que en leche natural con las siguientes modificaciones:
 - Acidez, expresada en ácido láctico: Máximo 0.19g/100mL.
 - Impurezas macroscópicas: Máximo grado 0.
 - Menos de 100.000 colonias de gérmenes por mL.
 - Ausencia de coliformes en 0.1mL de leche.
 - Prueba de la fosfatasa: Negativa.
 - Leche especial (desnatada), igual que en leche higienizada con excepción de las siguientes:
 - Materia grasa: Contenido mínimo el 1% en peso para leche semidesnatada y máximo 1% en leche desnatada.
 - El extracto seco vendrá dado por la siguiente ecuación (Ecuación 4):
$$E = 8.45 + 0.92 * G$$
- Ecuación 4. Ecuación del extracto seco.*
- E = tanto por ciento del extracto seco total en peso.
 - G = tanto por ciento de materia grasa en peso.
- Leche especial (enriquecida), poseerán las mismas características de la leche higienizada.
 - Leche conservada (esterilizada), las señaladas para leche higienizada con:
 - Ausencia de gérmenes vivos en un mL de leche después de incubación a 37°C y 55°C durante 48h.

2.3.4. Importancia de la lactosa

Debido a la importancia que presenta la lactosa en la composición de la leche se han elegido las enzimas GaOx (Galactosa Oxidasa) y GOx (Glucosa Oxidasa) para fabricar los biosensores que se utilizaran en este trabajo, por ello se va a hablar más extensamente de este hidrato de carbono y de algunas de sus características básicas.

Es un disacárido formado por glucosa y galactosa (Figura 15). Presenta un poder edulcorante aproximadamente seis veces menor que el de la sacarosa, aunque su sabor dulce está enmascarado por la caseína y es más acentuado en el suero (que carece de ella).

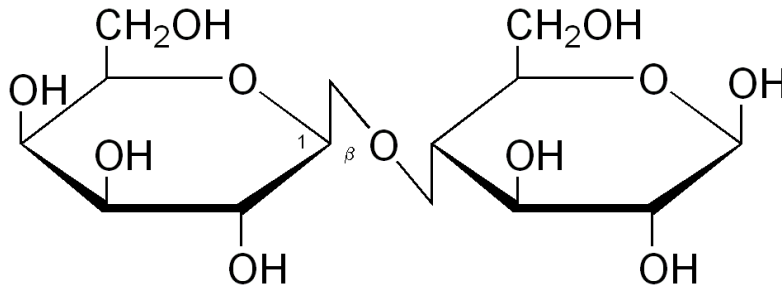


Figura 15. Molécula de la lactosa.

La lactosa es un vehículo importante en la absorción de calcio y aminoácidos por vía intestinal, su intolerancia se ha relacionado con la ausencia de lactasa intestinal y se ha asociado a la reacción alérgica a la proteína de la leche. Es además una fuente potencial de ácido láctico.

En la leche se presenta en forma de solución verdadera, aunque su baja solubilidad puede originar problemas en su industrialización debido al carácter arenoso de su cristalización.

Presenta sensibilidad al calor, lo que produce un oscurecimiento, denominado pardeamiento, debido a la reacción entre la lactosa y las materias hidrogenadas (reacción de Maillard) y canalizadas por metales pesados (como el hierro), los fosfatos y la temperatura. Este pardeamiento supone una pérdida de valor nutritivo [27].

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este capítulo se pretende explicar de forma detallada el procedimiento realizado para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

Se comenzará describiendo los materiales empleados, posteriormente se explicará de forma pormenorizada la preparación de los sensores y las técnicas experimentales utilizadas en la caracterización de estos.

3.1. **Preparación de sensores**

Dentro de la gran variedad de sensores que existen, tanto en el mercado como a nivel de investigación en un laboratorio, se ha elegido usar sensores de tres tipos para la realización de este trabajo:

1. Sensores de pasta de grafito, CPE.
2. CPE modificados con enzimas. Biosensores.
3. Sensores potenciométricos de membrana de PVC.

A continuación, se procederá a explicar el proceso de fabricación de los sensores detallando los materiales empleados, la preparación de los soportes empleados y la elaboración de los sensores.

3.1.1. CPE

a) *Materiales utilizados*

Los materiales empleados en la fabricación de la CPE son los siguientes:

- Espátula.
- Vidrios de reloj.
- Plástico para diapositivas.
- Balanza analítica de precisión. Precisa 125A.
- Grafito Ultracarbon F purity.
- Grafito Fluka.
- Pegamento epoxi, tipo Araldite Cristal.
- Micropipeta y puntas desechables.
- Polímetro.



Figura 16. Pegamento epoxi (Araldite) y grafito.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

Para la realización de las modificaciones se emplean los siguientes materiales:

- Enzimas:
 - BPB.
 - Gluta.
 - GOx.
 - GaOx.

Para la fabricación de los soportes se usan los siguientes materiales:

- Tubo de vidrio (D = 8mm).
- Cable de cobre (D = 1.5mm).
- Tijeras, cabeza lijadora y lima.
- Papel de lija de diferentes tamaños de grano.



Figura 17. Cabeza lijadora y lima.

b) Preparación del soporte

La preparación de los soportes se realiza mediante el siguiente procedimiento:

Se corta el tubo de vidrio a la longitud deseada (en este caso aproximadamente 9cm), para ello se marca con un rotulador indeleble y se hace una pequeña hendidura con la lima, se aplica un poco de presión por la parte de atrás hasta que se produzca el corte intentando que sea lo más liso y recto posible, se puede aplicar calor con un soplete para suavizar los bordes más afilados.

Posteriormente se realizan unos arañazos en la zona interior del tubo (aproximadamente hasta 1-1.5cm) con la ayuda de la cabeza lijadora, esto se realiza para mejorar la adhesión de la pasta de grafito.

Se prepara el cable necesario para realizar las conexiones, cortándolo con un tamaño ligeramente mayor que el del tubo de vidrio (aproximadamente 10-11cm) y se pela por ambos lados con una longitud aproximada de 1cm. Uno de los lados se introducirá en la pasta y el otro servirá para realizar la conexión mediante una pinza de cocodrilo al equipo de medida.

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

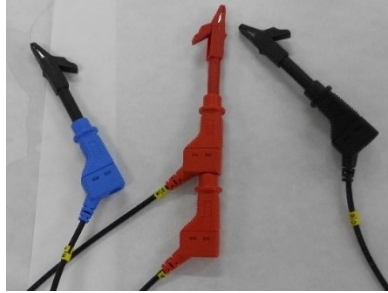


Figura 18. Cocodrilos de conexión al potencióstato.

c) Preparación de la pasta

Para la realización de la pasta primero se pesa la cantidad necesaria según el número de sensores que se desee obtener.

Se debe mantener la relación 50/50 grafito-Araldite, por tanto, de forma aproximada y para la obtención de 2 o 3 sensores se utilizan las siguientes cantidades:

- 1.50g de grafito.
- 1.50g de Araldite dividido en 0.75g de cada componente.

En un rectángulo de plástico para diapositivas se pesa uno de los componentes del Araldite y se va añadiendo poco a poco el grafito asegurando la homogeneidad de la mezcla resultante. Cuando hayamos añadido prácticamente la totalidad del grafito, pesamos el segundo componente del Araldite que se añade junto con el grafito restante y se mezcla homogeneizando, teniendo en cuenta el tiempo de reacción del epoxi (según las instrucciones del producto dicho tiempo es de 5 min).

d) Fabricación de los electrodos

Una vez realizada la mezcla se introduce poco a poco dentro del tubo de vidrio por el lado que se ha rayado, hasta aproximadamente 1-1.5cm de profundidad. Se coloca el cable asegurando el contacto de la mezcla con la parte pelada del mismo, sin que sobresalga e intentando centrarlo lo máximo posible. Esto se debe hacer con la máxima celeridad posible para evitar que el endurecimiento del epoxi provoque problemas o impida el correcto funcionamiento del sensor.

Después de introducir la pasta y conectar el cable es necesario curar el sensor en el horno a una temperatura de 100°C durante mínimo 6horas, antes de su utilización es conveniente dejar enfriar y lijar hasta obtener una superficie lisa y sin irregularidades.

e) Modificaciones de los CPE

Si se desean depositar enzimas se debe realizar un procedimiento extra posterior al lijado del sensor:

Primero se lava con agua destilada para eliminar cualquier rastro de suciedad, posteriormente se introduce en BPB durante 30 segundos, se seca ligeramente con un papel y una vez limpio y seco se añade la enzima de forma repartida sin tocar con la punta de la pipeta la zona del grafito. Cuando se ha secado completamente se introduce durante 60 segundos en gluta y otra vez en BPB durante otros 30 segundos, esto debe hacerse sin que el sensor toque las paredes o el fondo del vaso.

Conviene recordar que la deposición de enzimas se debe realizar justo antes de usar el electrodo, puesto que si no puede darse la inutilización de las enzimas depositadas y por tanto estropearse el biosensor.



Figura 19. Sensores de grafito terminados.

f) Mejoras en el proceso de fabricación

Se han realizado diferentes modificaciones en el proceso de fabricación para optimizar los sensores:

- Se ha comprobado experimentalmente que previamente a la fabricación de la pasta se debe deshidratar el grafito, para ello se mete en el horno a 100°C durante al menos 2 horas.
- Se ha observado que se obtienen mejores resultados mediante una curación de los sensores más larga utilizando una temperatura más baja, concretamente 50-60°C durante toda la noche.
- Se puede utilizar un polímetro para comprobar tanto si existe conductividad, como el orden de la resistencia del sensor finalizado, esto permite una primera evaluación de su funcionalidad, si la conductividad es muy pequeña o la

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

resistencia muy elevada los sensores se descartan por no resultar útiles.

3.1.2. Lengua potenciométrica

a) *Materiales utilizados*

Los materiales empleados en la fabricación de las membranas potenciométricas son los siguientes:

- Espátula.
- Viales con tapa (para pesaje y almacenamiento de las membranas).
- Balanza analítica.
- Pipetas y pera de vacío.
- THF (como disolvente).
- PVC de alto peso molecular.
- Plastificantes y aditivos descritos en la siguiente tabla [28], [29]:

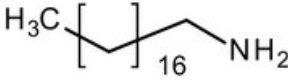
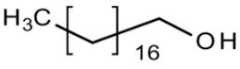
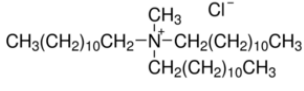
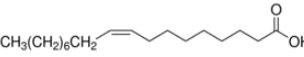
		Nombre	Fórmula	Fórmula	Pm ($\frac{g}{mol}$)
Plastif.	1	Octadecylamine		C ₁₈ H ₃₉ N	269.5
	3	Oleyl alcohol		C ₁₈ H ₃₆ O	268.5
	5	Tridodecylmethyl ammonium chloride		C ₃₇ H ₇₈ ClN	572.5
	6	Oleic acid		C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.5

Tabla 4. Plastificantes utilizados con su correspondiente nomenclatura.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

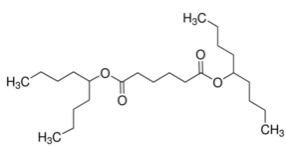
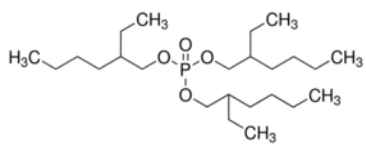
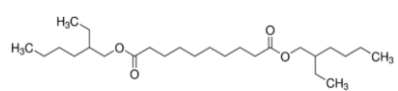
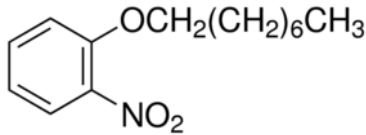
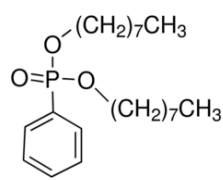
	Nombre	Fórmula	Fórmula	Pm ($\frac{g}{mol}$)	
Adit.	B	Bis(1-butylpentyl) adipate		$C_{24}H_{46}O_4$	398.6
	C	Tris(2-ethylhexyl) phosphate		$C_{24}H_{51}O_4P$	434.6
	D	Dibutyl sebacate		$C_{18}H_{34}O_4$	314.5
	E	2 nitrophenyl octylether		$C_{14}H_{21}NO_3$	251.3
	F	Dioctyl phenyl phosphonate		$C_{22}H_{39}O_4P$	382.5

Tabla 5. Aditivos utilizados con su nomenclatura correspondiente.

En la fabricación de los soportes se usan los siguientes materiales:

- Tubos de metacrilato (D = 1.5cm, D = 2cm y D = 3cm).
- Tapas de metacrilato (Con diámetro acorde al tubo utilizado).
- Taladro y fresadora.
- Cúter, cortacable, pelacables, pinzas, palito de madera.
- Cable de cobre/estaño ($D_{ext}=1.4mm$).
- Parafilm.
- Pegamento de cianocrilato (Loctite).
- Cloroformo.
- Composite de plata.
- Laca de plata.

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



Figura 20. Composite de plata y tubo de metacrilato.

b) Preparación del soporte

Se corta un tubo hueco de metacrilato del diámetro indicado y la longitud deseada (esta varía en función del diámetro y los valores relativos al número de membranas que se desean utilizar). Se realizan taladros pasantes de un grosor aproximado al diámetro del cable, y un rebaje alrededor de dicho taladro en forma de cono o cuenco con la fresadora, denominado pocillo. Se preparan los cables, cortando una longitud de aproximadamente el doble de la longitud del tubo y se pela al menos 1cm de uno de los extremos de cada cable.

Una vez se tenga el soporte preparado se procede a insertar el extremo pelado de cada cable en un agujero con la ayuda de unas pinzas, se fija cada cable con una gotita de pegamento de cianocrilato, conviene comprobar que queda fijado completamente. Se coloca una tapa de metacrilato aplicando cloroformo en el reborde interior para su fijación al tubo, este paso podría realizarse al final de todo el proceso de montaje del soporte, pero se ha comprobado experimentalmente que el tubo sufre deformaciones en el horno y por tanto conviene realizar el sellado previamente al curado, para evitar filtraciones hacia el interior.

Se realiza la mezcla del composite de plata (CP), para ello se mantiene una relación de 10:1 de la parte A (Pasta plateada) frente a la parte B (Líquido), se ha observado empíricamente que para este proceso es mejor que la mezcla obtenida sea más espesa, es decir, con un ligero exceso de parte A, puesto que puede penetrar por los taladros e implicar la unión eléctrica de diferentes cables de la lengua potenciométrica por la parte interior del tubo.

Posteriormente se coloca una gota de CP en cada pocillo, no supone ningún problema que sobresalga un poco puesto que después se va a pulir quitando el exceso, es muy importante que el cable quede cubierto para que haya una buena conexión eléctrica. Una vez llenos todos los huecos, se procede a curar en el horno a una temperatura de 70°C durante un período de tiempo de al menos 2horas.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

Transcurrido ese tiempo se saca del horno, se deja enfriar y se procede a cortar la parte sobrante del extremo pelado de los cables intentando que sea lo más cerca posible del CP, en este punto se procede a pulir el resultado, para ello se elimina el exceso de composite y se limpian lo mejor posible los restos que se encuentren fuera de los pocillos, utilizando un trozo de papel bañado en alcohol con la ayuda de un palito de madera.

También existe la posibilidad de realizar estas dos últimas operaciones repetidas para optimizar el relleno de los pocillos, en cuyo caso se recomienda que el composite sea más espeso la primera vez y más líquido en la segunda. Después de realizar la limpieza se aplica una pequeña cantidad de laca de plata en cada pocillo para asegurar la cobertura del cable pelado y homogeneizar el resultado final de cada uno.

Como medidas adicionales conviene comprobar que se produce conexión eléctrica en cada cable mediante el uso de un polímetro, así como la numeración de las diferentes filas y columnas asociándolas a su cable correspondiente. Asimismo, se recomienda cerrar el extremo superior para evitar que se introduzca alguna de las muestras a analizar, para ello se ha utilizado parafilm y se ha evitado introducir dicho extremo en las disoluciones medidas [30].

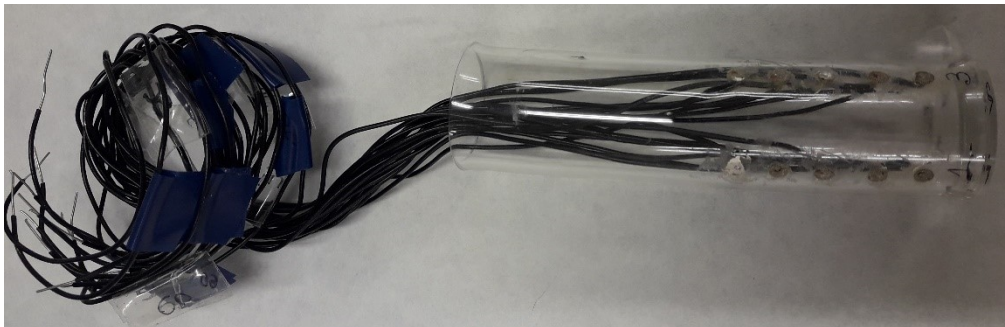


Figura 21. Soporte de la lengua potenciométrica.

c) Preparación de las membranas

Para la preparación de las membranas se pesan en un vial con tapa el PVC, el aditivo y el plastificante en los porcentajes correspondientes, en el caso de este trabajo el peso total es de 0.4g, obteniendo las siguientes cantidades [29]:

- 3% de aditivo = 0.012g.
- 65% de plastificante = 0.26g.
- 32% de PVC = 0.128g.

Las cantidades medidas experimentalmente se detallan a continuación:

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Plastif.	Aditivo	g plastif.	% plastif.	g aditivo	% aditivo	g PVC	% PVC
1	B	0,2595	65,05	0,0148	3,710	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
Plastif.	Aditivo	g plastif.	% plastif.	g aditivo	% aditivo	g PVC	% PVC
3	B	0,2584	64,53	0,0158	3,94	0,1262	31,51
	C	0,2597	66,28	0,0113	2,88	0,1208	30,83
	D	0,2622	65,56	0,0111	2,77	0,1266	31,65
	E	0,2582	64,90	0,0135	3,39	0,1261	31,69
	F	0,2825	67,94	0,0201	4,83	0,1132	27,22
Plastif.	Aditivo	g plastif.	% plastif.	g aditivo	% aditivo	g PVC	% PVC
5	B	0,2707	65,91	0,0138	3,36	0,1262	30,73
	C	0,2513	60,89	0,0124	3,00	0,1490	36,10
	D	0,2588	58,08	0,0135	3,03	0,1733	38,89
	E	0,2637	65,10	0,0130	3,21	0,1284	31,70
	F	0,2676	64,79	0,0136	3,29	0,1318	31,91
Plastif.	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 6. Cantidades pesadas para las membranas potenciométricas.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

Se procede a su completa homogeneización con la ayuda de la cantidad necesaria de tetrahidrofurano (THF) añadiendo incluso un exceso ya que posteriormente este se evaporará. Se recomienda almacenar en refrigerador y sin luz directa que pudiera ocasionar la degradación de alguna de las membranas.

d) Fabricación de los electrodos

Para la fabricación de los electrodos se coloca el soporte en horizontal, se utiliza una pinza para sujetarlo en esta posición y se depositan las membranas en cada uno de los pocillos, procediendo de la siguiente manera:

Con una pipeta se toma una pequeña cantidad de la membrana a depositar, se coloca en el pocillo correspondiente una gota y se reparte uniformemente cubriendo toda la superficie y eliminando posibles burbujas, se deja secar y se repite el procedimiento añadiendo un total de 3 gotas por pocillo, es importante asegurarse de que se ha secado completamente antes de girar para la aplicación de membranas en otras columnas.

Después de depositar todas las membranas se debe almacenar en una disolución de KCl durante 5 días antes de su utilización y para mantenerlas hidratadas deben permanecer en dicha disolución mientras no se usen.

En este trabajo se ha definido una nomenclatura para facilitar el reconocimiento de cada membrana y de su cable correspondiente, dicha nomenclatura se basa en el uso de un número correspondiente al aditivo y una letra correspondiente al plastificante, esta nomenclatura se utilizó ya en la Tabla 4 y la Tabla 5.

e) Modificaciones de la lengua potenciométrica

Se han incluido las siguientes modificaciones que facilitan el uso de esta lengua potenciométrica:

- Recubrimiento de todos los cables de conexión con una manguera en espiral para protegerlos y facilitar su manejo.
- Para facilitar la conexión al aparato medidor y el correspondiente multiplexor se ha unido mediante soldadura un conector de tipo macho-hembra, teniendo en cuenta siempre que posición corresponde con cada membrana.

3.2. Métodos de análisis

En este apartado se van a detallar los métodos de análisis utilizados, para ello se detallarán los elementos utilizados, disoluciones analizadas y las técnicas, se comenzará con los sensores voltamétricos y a continuación, siguiendo el mismo esquema, se procederá con la lengua potenciométrica.

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. Ensayos voltamétricos

a) *Elementos utilizados*

- Potenciostato Autolab.
- Ordenador con software Nova 1.10.1.9 Metrohm autolab B.V.
- Conectores.
- Celda electroquímica.
- CPE (WE).
- Plaquita de platino (CE).
- Electrodo de Ag^+/AgCl (RE).



Figura 22. Potenciostato utilizado (Autolab).

b) *Disoluciones utilizadas*

Para la caracterización de los sensores voltamétricos se utilizan dos disoluciones:

Muestra	Concentración
Cloruro potásico.	0.1M.
Ferro-ferricianuro potásico (En cloruro potásico 0.1M).	5mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5mM de $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Tabla 7. Tabla de disoluciones para caracterización.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

Las muestras analizadas y cuyos datos se tratarán estadísticamente son las siguientes:

Muestra	Tratamiento
Leche entera (Clunia).	Bruto
Leche entera (Peñaranda).	
Leche semidesnatada y sin lactosa (Covarrubias).	
Leche semidesnatada y sin lactosa (Ponferrada).	
Leche entera (Clunia).	Ferri
Leche entera (Peñaranda).	
Leche semidesnatada y sin lactosa (Covarrubias).	
Leche semidesnatada y sin lactosa (Ponferrada).	

Tabla 8. Tabla de muestras para el estudio preliminar.

Estas muestras se analizan los días 0, 7 y 14 después de abiertas.

Muestra	Tratamiento
Entera	Normal.
	Sin lactosa.
	Calcio.
Semidesnatada	Normal.
	Sin lactosa.
	Calcio.

Tabla 9. Tabla de muestras analizadas.

Estas muestras se analizan el día de la apertura (Día 0).

c) Voltametría cíclica

Los CPE son sensores de tipo voltamétrico por lo que la técnica de medición utilizada será la CV con variaciones en los parámetros utilizados. Para realizar esta técnica se utiliza el software Nova 1.10.1.9 (Metrohn autolab B.V.).

Anteriormente se definieron las funciones de los electrodos, en este montaje se utilizan tres electrodos: el de referencia, el contraelectrodo y el de trabajo correspondiente el electrodo CPE.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

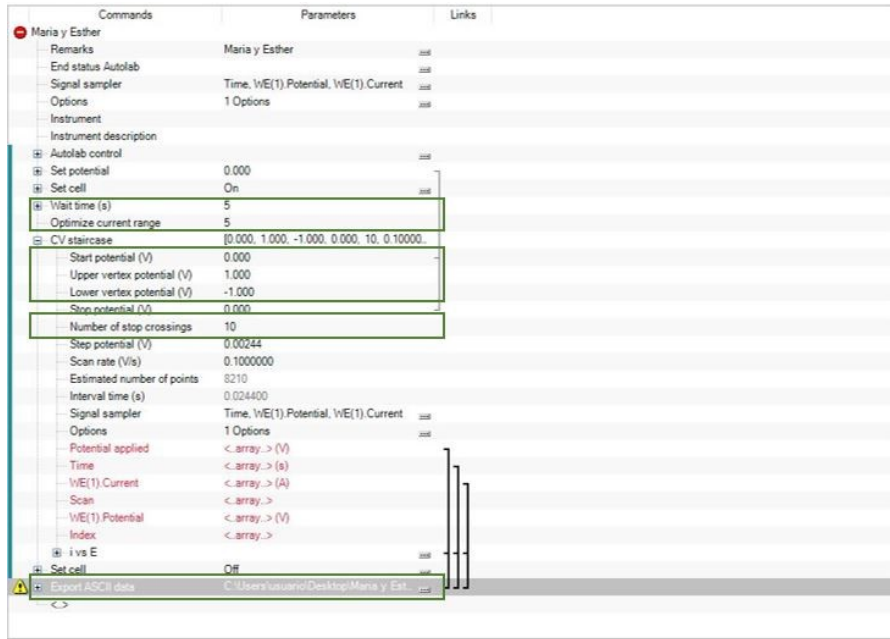


Figura 25. Definición de los valores de caracterización de la CV.

Una vez definidos los valores adecuados, se establece el montaje del circuito y se pulsa “Start” para empezar con el tiempo de estabilización, una vez acabado dicho tiempo se empieza con la CV.

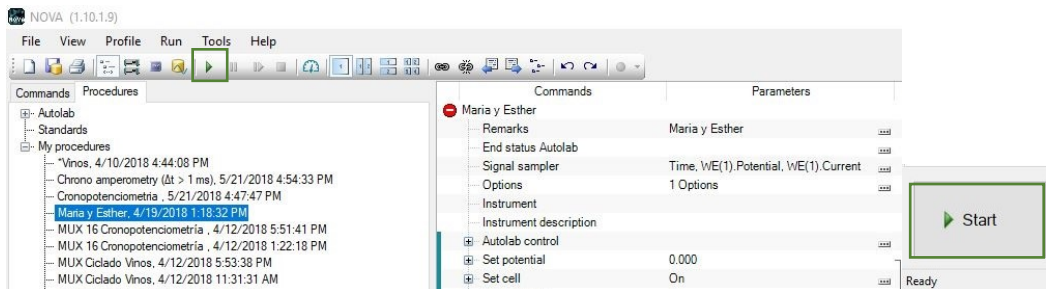


Figura 26. Botón de inicio de la CV.

Al final de la CV se obtendrá una gráfica en el software y un archivo “.txt” con los valores de dicha gráfica para su análisis.

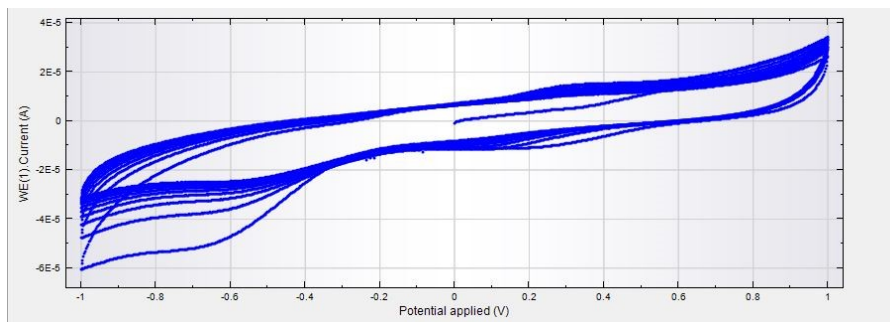


Figura 27. Ejemplo de una CV en Nova.

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.2. *Ensayos potenciométricos*

a) *Elementos utilizados*

- Data logger, multiplexor y conectores.
- Ordenador con el software Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies).
- Vaso de precipitados grande (Como celda electroquímica).
- Elementos auxiliares para el montaje como pinza de sujeción, cinta aislante o parafilm.
- Electrodo de Ag^+/AgCl (RE).
- Lengua potenciométrica (WE).

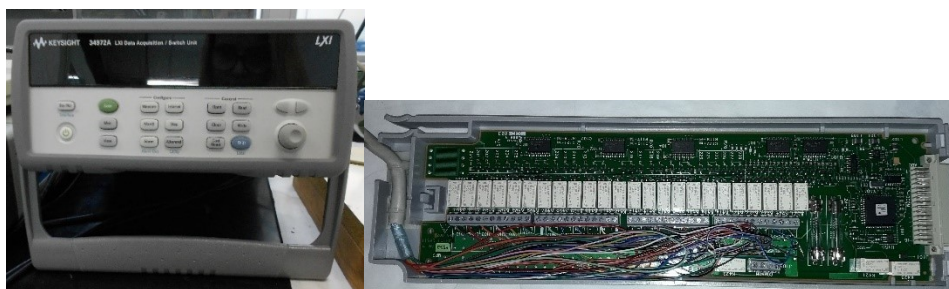


Figura 28. Data logger y multiplexor.

b) *Disoluciones utilizadas*

Para la caracterización se utilizan seis disoluciones, una de KCl y otras que emulan los 5 sabores básicos. Estas disoluciones se clasifican de la siguiente manera:

Muestra	Concentración
Cloruro potásico (KCl).	0.1M.
Dulce: fructosa.	10 ⁻² M.
Salado: Cloruro amónico (NH ₄ Cl).	
Ácido: Ácido clorhídrico (HCl)	
Amargo: Sulfato magnésico (MgSO ₄)	
Umami: Glutamato monosódico.	

Tabla 10. Tabla de disoluciones para caracterización, sabores.

Muestra		Tratamiento
Entera	Lauki	Con H ₂ O relación 1:1.
	Asturiana	
	Mercadona	
Semidesnatada	Lauki	
	Asturiana	
Desnatada	Día	

Tabla 11. Tabla de muestras para discriminación previa.

Estas muestras se analizan en el día de apertura (día 0).

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

Muestra		Tratamiento
Entera	Normal.	Con H ₂ O relación 1:1
	Sin lactosa.	
	Calcio.	
	Fólico B.	
Semidesnatada	Normal.	
	Sin lactosa.	
	Calcio.	
	Fólico B.	

Tabla 12. Tabla de muestras analizadas.

Estas muestras se analizan el día de apertura (día 0) y una semana después (día 7).

c) Potenciometría

Los sensores utilizados en la lengua son membranas de tipo potenciométrico, lo que implica que la técnica usada es la potenciometría. Para esta técnica se utiliza el software Benchlink Data Logger 3 (Agilent Technologies) [30].

Para la celda electroquímica de este montaje solo se utilizan el electrodo de referencia y el de trabajo correspondiente con la lengua, cuya conexión se realiza de acuerdo con el siguiente esquema (Figura 29):

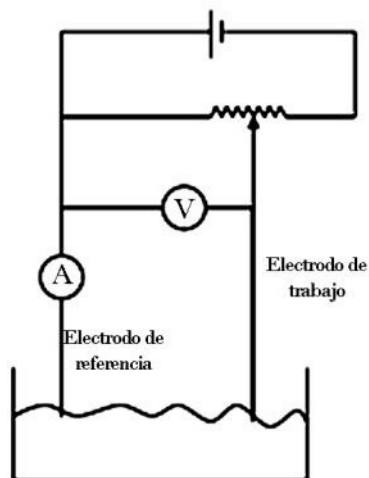


Figura 29. Esquema de conexión de los electrodos en potenciometría.

Lo primero que se debe hacer es configurar el software, para ello se empieza añadiendo una configuración específica para nuestro aparato, siguiendo las instrucciones del tutorial. Una vez hecho esto, cuando se ejecuta el programa aparece la siguiente pantalla (pueden variar algunas cosas en función de los nombres elegidos y de los aparatos conectados).

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



Figura 30. Pantalla de inicio del programa de ejecución del data logger.

Además, se deben seleccionar y configurar los nombres de los canales en los que se va a operar, esto se hace en la pestaña denominada “Configure Channels” donde se podrá nombrar cada una de las entradas como se desee.

En este caso se denominan de dos formas diferentes puesto que al medir se han utilizado dos lenguas potenciométricas y esto permite diferenciarlas, se ha puesto un nombre determinado por “Membrana XY” o “MXY”, donde la “X” corresponde al número de plastificante y la “Y” a la letra del aditivo, como se puede observar en la siguiente captura de pantalla.

301	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 1B	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
302	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 1C	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
303	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 1D	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
304	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 1E	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
305	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 1F	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
306	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 3B	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
307	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 3C	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
308	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 3D	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
309	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 3E	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
310	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 3F	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
311	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 5B	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
312	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 5C	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
313	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 5D	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
314	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 5E	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
315	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 5F	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
316	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 6B	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
317	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 6C	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC
318	<input checked="" type="checkbox"/>	Membrana 6D	DC Voltage	Auto	5.5	...	<input type="checkbox"/>	1	0	VDC

Figura 31. Denominación de los canales de medida.

Una vez realizado todo lo anterior se accede a la pestaña “Scan and Log Data”, donde se definirá el tiempo de ensayo, así como el número de medidas a realizar, pudiendo modificar las siguientes variables:

- **Momento de inicio:** si se desea iniciar nada más pulsar el botón de “Start”, a una hora determinada, etc.
- **Intervalo:** cada cuanto tiempo va a tomar y representar una medida.
- **Momento de parada:** puede ser al pulsar “Stop”, al cabo de un tiempo definido por el usuario, etc.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

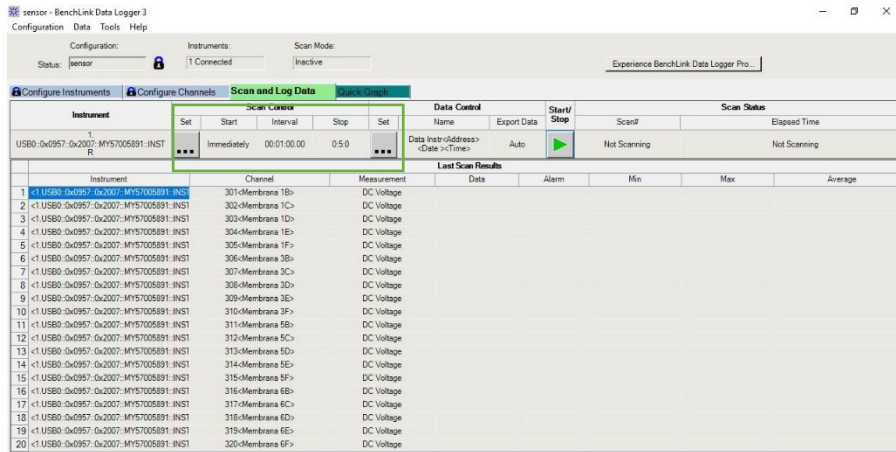


Figura 32. Configuración para la toma de medidas.

3.3. Tratamiento quimiométrico

3.3.1. PCA

El análisis de componentes principales o PCA es una técnica estadística utilizada para discriminar, se basa en la reducción de las dimensiones de un conjunto de datos. Este sistema busca la mejor proyección en términos de mínimos cuadrados para obtener un conjunto de variables no correlacionados linealmente.

Para realizar este tratamiento de los datos obtenidos mediante los sensores voltamétricos se utiliza el programa Matlab y algunos scripts específicos necesarios, lo que nos permite separar las muestras utilizando los datos de los diferentes sensores y obtener gráficas en 2D y 3D. Además, proporciona una matriz de datos necesaria para realizar la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) [31].

3.3.2. LDA

El análisis discriminante lineal o LDA es un método estadístico utilizado para encontrar una combinación lineal de rasgos. Podría decirse que es el equivalente al análisis PCA, pero utilizando datos potenciométricos en lugar de voltamétricos

En este caso se ha utilizado un programa llamado IBM SPSS Statistics que devuelve, entre otros datos de interés, una gráfica en 2D y valores relativos a las funciones de correlación.

3.3.3. PLS

La regresión de mínimos cuadrados parciales o PLS es un método estadístico que busca una regresión lineal mediante la proyección de las variables de predicción y las variables observables.

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Como se ha explicado anteriormente se requiere de una matriz procedente del tratamiento mediante PCA. Utilizando esta matriz junto con los datos químicos de las muestras y el programa The Unscrambler X se puede obtener una correlación que permite hacer predicciones [31].

3.3.4. MLR

La regresión lineal múltiple o MLR es una técnica estadística que se utiliza para identificar variables independientes, comparar y comprobar modelos causales y predecir valores de una variable. Este análisis es equivalente a la PLS descrita anteriormente.

Requiere de un tratamiento mediante LDA y se realiza utilizando los programas The Unscrambler X junto con IBM SPSS Statistics y Matlab para el pretratamiento de los datos (Normalización, etc.).

3.3.5. Método de trabajo PLS y MLR

Los métodos de análisis PLS y MLR se utilizan para encontrar relaciones entre dos matrices de datos, en este trabajo se corresponden con:

- X = Datos medidos.
- Y = Datos químicos a correlacionar.

El método de trabajo del programa, para ambos análisis, es el siguiente [31]:

- Mediante los datos químicos y los datos medidos con los diferentes sensores que componen la lengua electrónica se obtiene un modelo denotado como “calibración” y cuyos parámetros aparecen indicados en color azul en los gráficos.
- Posteriormente realiza una “validación” de dicho modelo mediante el método “leave one out”, también se le denominada como “predicción”, y aparece en color rojo en los gráficos
- Muestra los diferentes gráficos o rectas de calibrado y sus parámetros más significativos, R^2 , RMSE, slope (pendiente de la recta) y offset (ordenada en el origen), en PLS devuelve además el factor o número de variables latentes.

Para valorar la calidad de la correlación obtenida se deben observar los siguientes parámetros significativos:

1. Variables latentes: Son variables adicionales y por tanto cuantas menos se necesiten el modelo es más sencillo.
2. R^2 : Debe aproximarse lo máximo posible a la unidad. Cuanto más próximo esté mejor se adecua el sistema a la recta obtenida en el modelo. Cabe recordar que debido a la mecánica de trabajo el valor de R^2_c siempre será mayor que el valor de R^2_p .
3. RMSE: Es un tipo de error por tanto debe ser lo más bajo posible, este tipo de error es relativo y por tanto se debe tener en cuenta el orden de magnitud del dato químico.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

CAPÍTULO 4 RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1. Voltamétricos

4.1.1. Caracterización

En primer término y con objeto de conocer el correcto funcionamiento de los sensores voltamétricos se procede a su caracterización desde el punto de vista electroquímico. Esta caracterización se realiza mediante el ensayo de voltametría cíclica en dos disoluciones patrón, una que no presenta especies activas (que es un electrolito base) y otra que contiene especies con actividad RedOx (de acuerdo con la Tabla 7), esto permite conocer la actividad de los sensores en ambas situaciones a la vez que nos permite estudiar su repetibilidad y reproducibilidad. En los siguientes subapartados se explicará más detenidamente los resultados observados en esta caracterización.

a) KCl

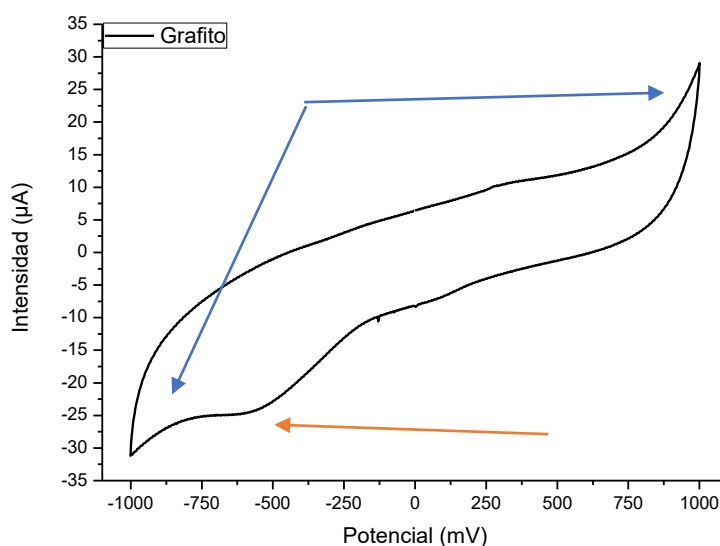


Figura 33. Sensor de grafito en KCl.

La Figura 33 representa el voltamograma tipo de un sensor de pasta de grafito sin modificar en una disolución de KCl 0.1M, en él se puede apreciar que no hay ningún tipo de pico que indique la oxidación o reducción de ninguna especie. Si se aprecia un pequeño pico en los potenciales negativos (En el barrido de reducción, flecha naranja) que es específico del sensor utilizado y de muy baja intensidad (probablemente algún componente de la resina utilizada en la preparación) y las variaciones presentes en los extremos (Flechas azules) se deben a potenciales negativos a la disolución del agua en medio con oxígeno y se relaciona con el PH del medio.

b) Disolución de ferro - ferricianuro

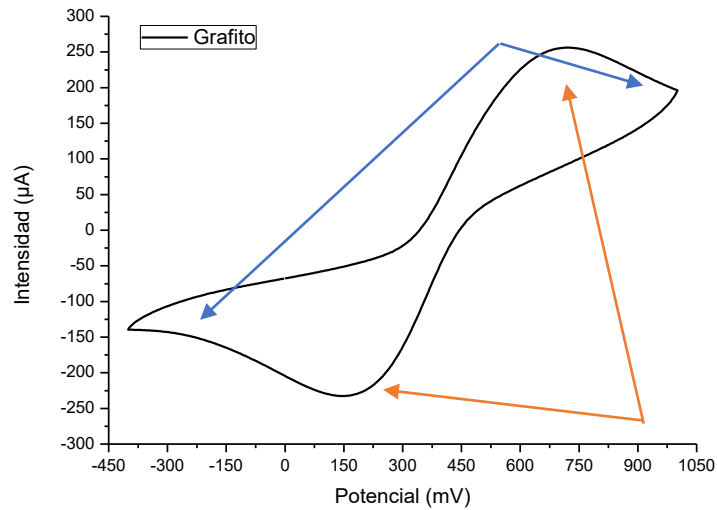
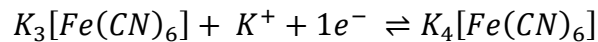
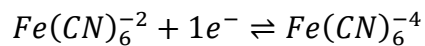


Figura 34. Sensor de grafito en ferro-ferri

En la Figura 34 se presenta el voltamograma obtenido por el sensor de grafito en la medición de una disolución de ferro-ferricianuro en KCl. Se puede apreciar que es considerablemente diferente al voltamograma de la Figura 33.

Las flechas azules indican los extremos del barrido de oxidación-reducción, mientras que las flechas naranjas indican los picos debidos a la oxidación y reducción del hierro, según las semirreacciones siguientes:



Ecuación 5. Semirreacciones ferro-ferricianuro.

Observamos que se trata de intensidades muy elevadas y similares tanto en oxidación como en reducción con ligeras diferencias en los potenciales, características de un proceso cuasi-reversible.

4.1.2. Estudio preliminar

Después de caracterizar los sensores se va a realizar un estudio preliminar, para ello se analizan las muestras especificadas anteriormente (Tabla 8). Se tienen dos muestras de dos tipos diferentes de leche (entera y semidesnatada), las denominadas con nombres que empiezan por C representan el grupo de control y las denominadas como P (Problema) presentan una alteración de la cual se desconoce su naturaleza, pero que resulta interesante para determinar si nuestro sensor es capaz de detectar dicha alteración.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se comenzará realizando una discriminación según el tipo de leche (entera o semidesnatada) y después se procederá a valorar las variaciones ocurridas durante el envejecimiento de dichas muestras. Para finalizar se analizarán las correlaciones entre los datos de las medidas realizadas y los datos químicos suministrados.

a) Discriminación

I En bruto

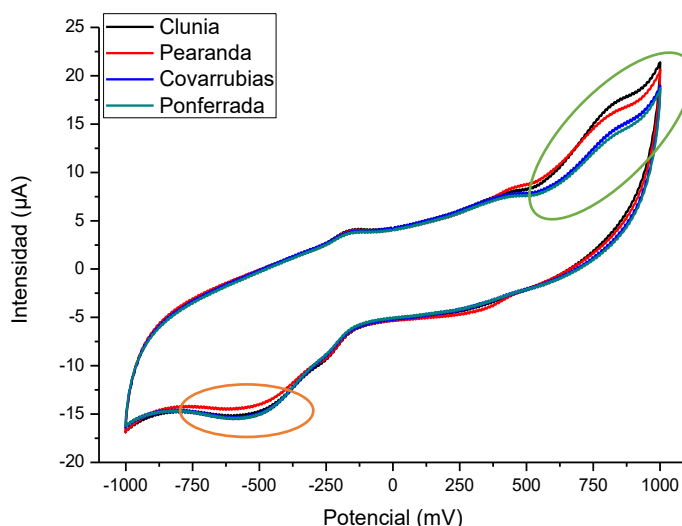


Figura 35. Discriminación en bruto, grafito.

En el caso del sensor de grafito sin modificar (Figura 35) se distinguen dos zonas que muestran claras diferencias para cada una de las leches.

En la zona del barrido de reducción y delimitada en naranja se observa que la muestra denominada como Peñaranda difiere de forma apreciable del resto, mientras que en la zona del barrido de oxidación marcada en verde se advierten diferencias entre los tipos de leche (entera y semidesnatada) y de forma más sutil también se aprecian diferencias entre las muestras del mismo tipo con y sin alteración (Entre Clunia y Peñaranda y entre Covarrubias y Ponferrada).

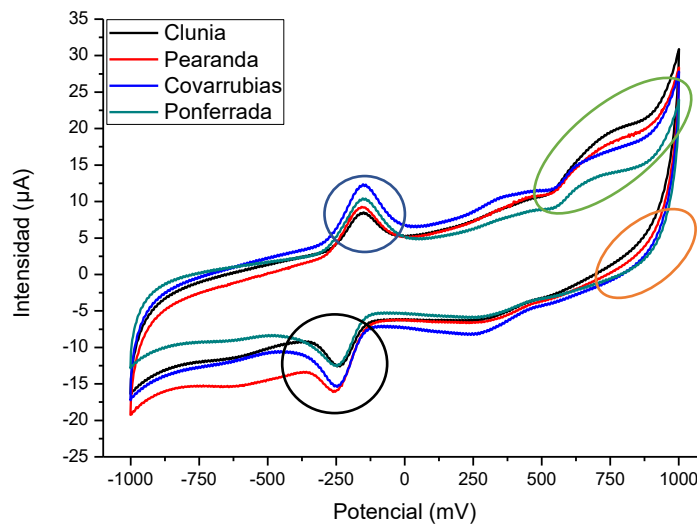


Figura 36. Discriminación en bruto, grafito con GOx.

En el caso del análisis mediante el sensor de grafito modificado con GOx (biosensor, Figura 36) se pueden apreciar cuatro zonas donde hay claras diferencias entre los tipos de leche.

En el barrido de oxidación, a potenciales negativos, la zona marcada en azul se aprecia que las leches de tipo semidesnatada (Covarrubias y Ponferrada) presentan picos con mayor intensidad. En la zona marcada en naranja (barrido de reducción y a potenciales positivos más altos) se observa lo contrario, es decir, que las leches enteras presentan mayor intensidad, esto mismo ocurre en la zona señalada en verde, donde además se aprecia una ligera variación en la forma del pico en función del tipo de leche.

A continuación, se realiza el análisis estadístico de los datos obtenidos en los voltamogramas con objeto de proceder a la diferenciación de los cuatro productos, se ha utilizado la siguiente nomenclatura:

Número	Nombre	Tipo de leche
1	Clunia	Entera
2	Peñaranda	
3	Covarrubias	Semidesnatada sin lactosa
4	Ponferrada	

Tabla 13. Nomenclatura PCA discriminación.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

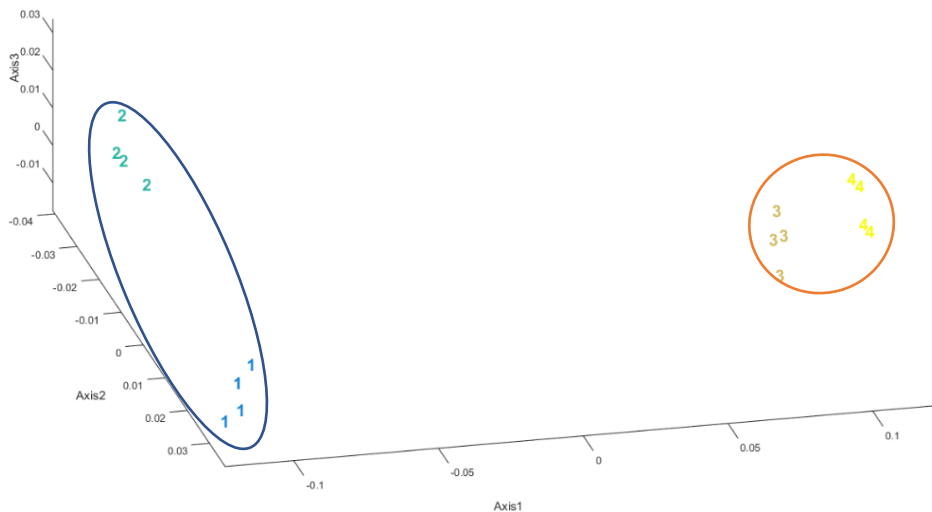


Figura 37. PCA leche en bruto, grafito.

Como ya se podía intuir en la Figura 35 al realizar el tratamiento estadístico se observa una clara diferenciación entre las muestras analizadas, situándose a la izquierda de la imagen las leches enteras (Círculo azul) y a la derecha las semidesnatadas (Círculo naranja), así mismo se aprecia que las leches 1 y 2 (Enteras) están más claramente diferenciadas entre sí que las leches semidesnatadas sin lactosa.

Realizando el mismo tratamiento con los datos del biosensor de GOx (Figura 38) se llega a las mismas conclusiones, aunque la distribución espacial de los resultados varía.

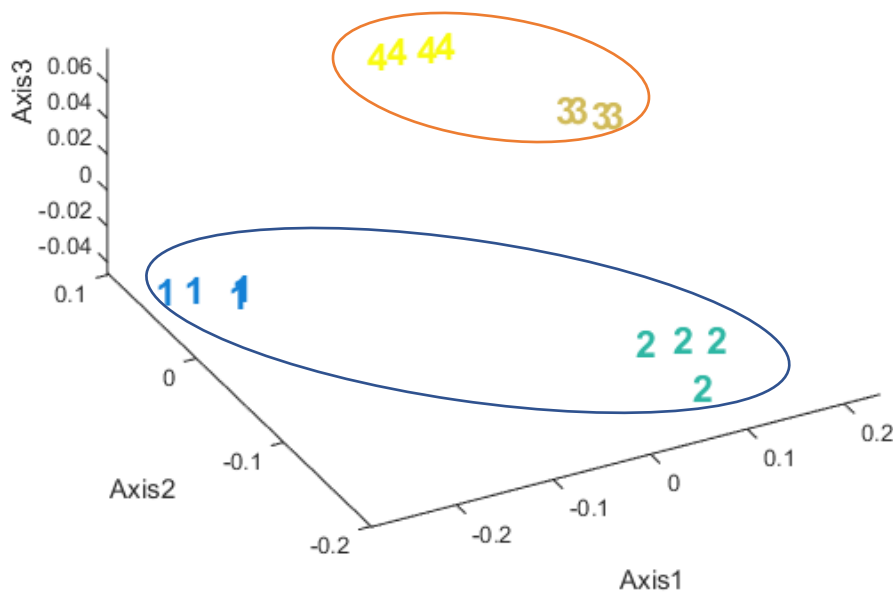


Figura 38. PCA leche en bruto, grafito con GOx.

II Muestras lácteas en disolución de ferro - ferricianuro

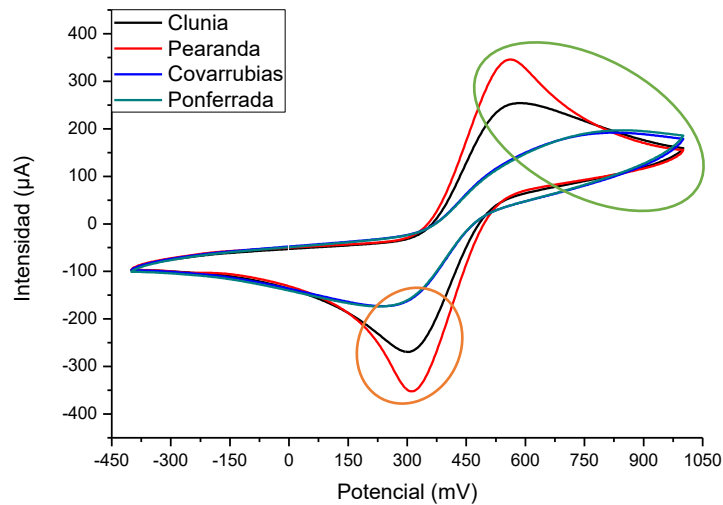


Figura 39. Discriminación en ferro - ferri, grafito.

Se realizó un segundo análisis de nuestro producto adicionando disolución patrón ferro-ferricianuro y observando las modificaciones que ejerce la mezcla con las leches sobre los picos RedOx. Al realizar la medición en las muestras que presentan ferro-ferri la distinción entre tipos de leche es mucho más clara, también lo es la distinción entre las dos muestras de tipo entera, pero menos apreciable en el caso de las leches semidesnatadas.

Prestando atención a las zonas señaladas con círculos se advierte que los picos de oxidación y reducción presentan mayor intensidad para las leches enteras mientras que se aprecia una forma mucho más redondeada y picos más difuminados en las leches semidesnatadas. Existe una mayor diferencia en la señal correspondiente a la muestra denominada Covarrubias, lo que indica que nuestro sistema es capaz de visualizar la alteración que presentan las muestras problema.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

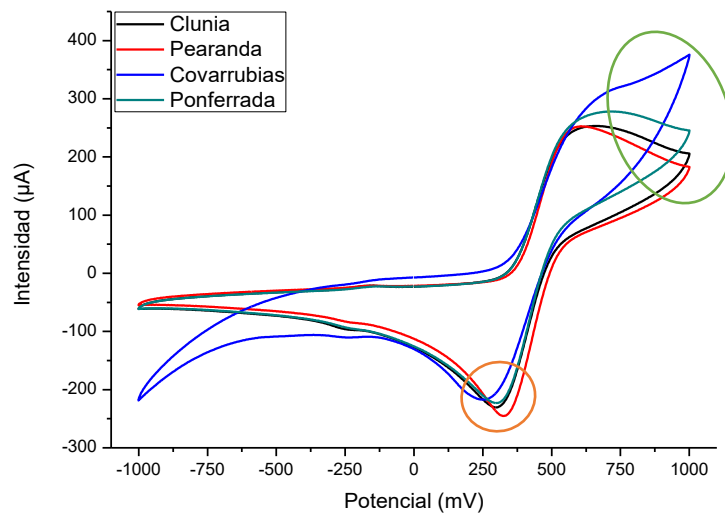


Figura 40. Discriminación en ferro - ferri, grafito con GOx.

En la Figura 40 se aprecian diferencias en la intensidad de los picos en ambos tipos de muestras, en el caso de las leches enteras la intensidad es menor (Líneas roja y negra) y presentan mayor reversibilidad.

Se realiza el tratamiento estadístico de los datos mediante PCA manteniendo la nomenclatura anterior (Tabla 13).

Los resultados del sensor de carbono obtenidos del análisis estadístico correspondiente a las muestras de leche en disolución de ferro-ferricianuro como muestra la PCA (Figura 41), nos permiten concluir que existe claramente una distinción tanto por grupo de muestra, como de forma individual para cada una de ellas.

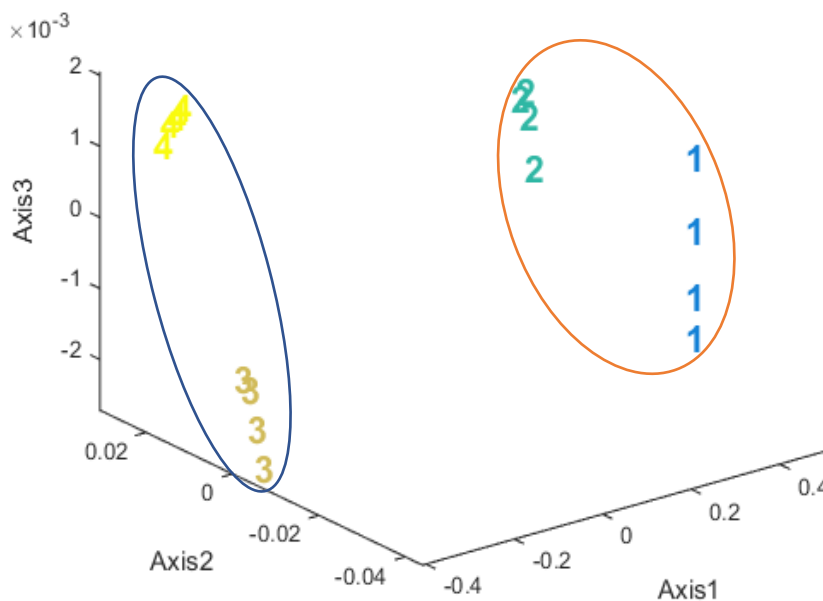


Figura 41. PCA leche en ferro - ferri, grafito.

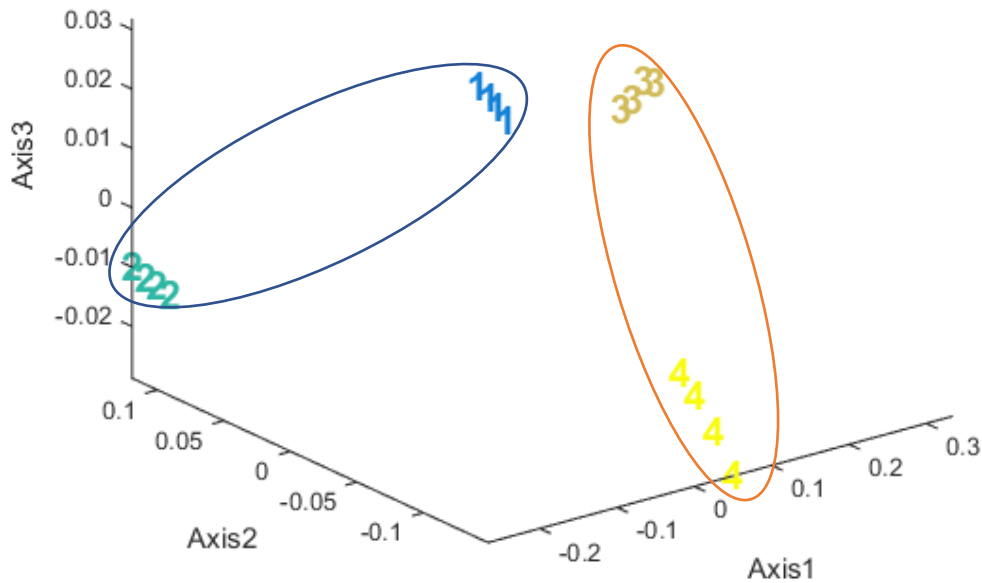


Figura 42. PCA leche en ferro - ferri, grafito con GOx.

En el análisis mediante PCA para el sensor de grafito (Figura 41) se distinguen claramente las cuatro muestras analizadas, en el caso del biosensor (Figura 42) también se aprecia la misma discriminación, aunque se produce una modificación en la distribución espacial obtenida.

A la vista de los resultados anteriores, se puede afirmar que se consigue una clara discriminación de las muestras y que los dos sensores distinguen la alteración que han sufrido las muestras.

b) Envejecimiento

Para el estudio del envejecimiento se lleva a cabo el análisis de las muestras en los días 0, 4 y 7 tras abrir el envase con el objetivo de conocer si el sensor es capaz de detectar las alteraciones que se producen durante la degradación del producto. Se realizan los ensayos con el sensor de grafito en la leche en bruto y también diluida en la disolución de ferro-ferricianuro. Para determinar esto cualitativamente se realiza primero una comparativa visual de los voltamogramas de las muestras en los diferentes días y después el estudio cuantitativo mediante el análisis estadístico de las doce muestras de forma conjunta.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

I En bruto

➤ Leche entera:

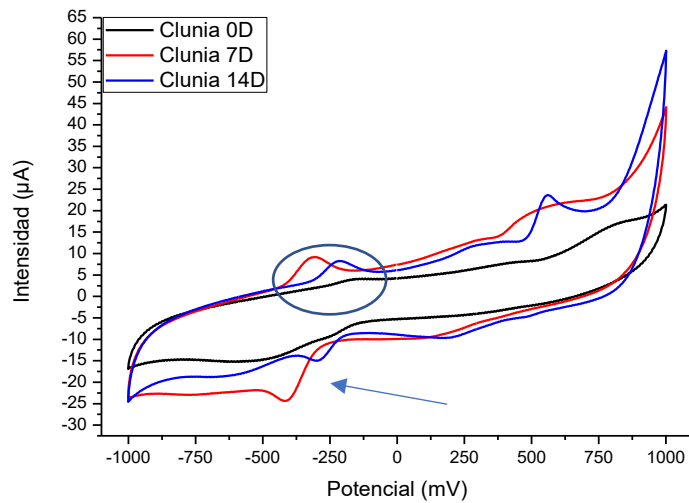


Figura 43. Envejecimiento Clunia en bruto, grafito.

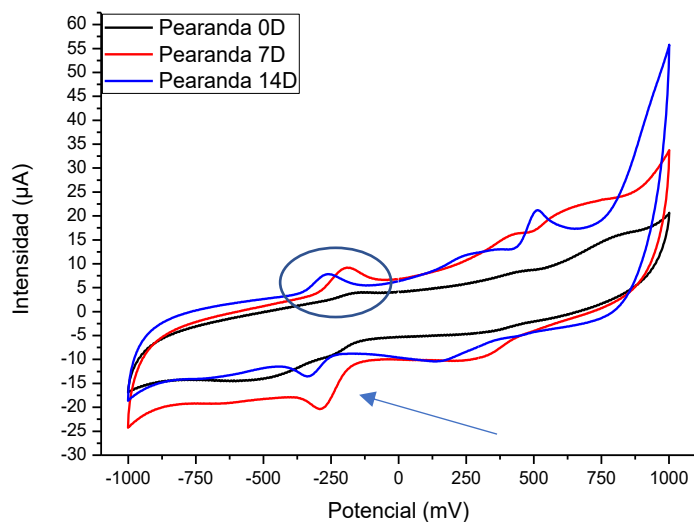


Figura 44. Envejecimiento Peñaranda en bruto, grafito.

En ambas muestras la forma genérica de los diagramas es muy similar, como también lo son los cambios ocurridos. La principal diferencia que se nota es la modificación de las intensidades, que van formando picos cada vez más definidos, presentan mayor intensidad a medida que la muestra envejece, y posteriormente el desplazamiento de los potenciales en dichos picos, por ejemplo, los puntos marcados con flechas azules o las zonas marcadas con círculos (Figura 43 y Figura 44) lo que indica la transformación de sustancias y la aparición de compuestos durante la degradación del producto.

➤ Leche semidesnatada y sin lactosa:

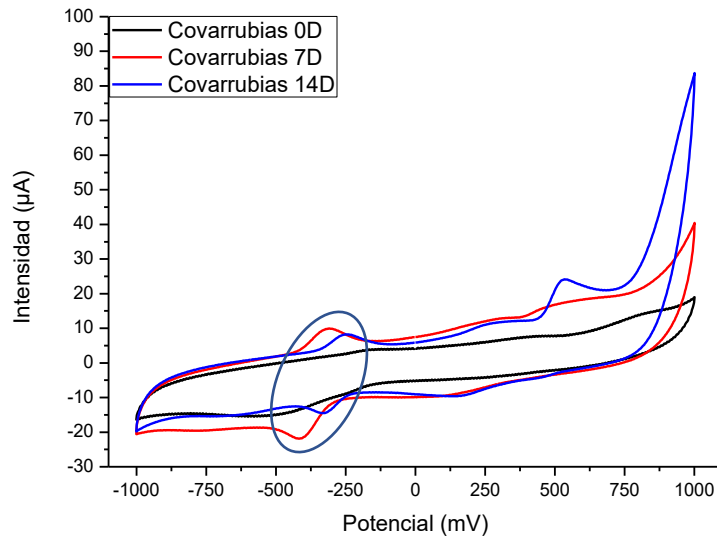


Figura 45. Envejecimiento Covarrubias en bruto, grafito.

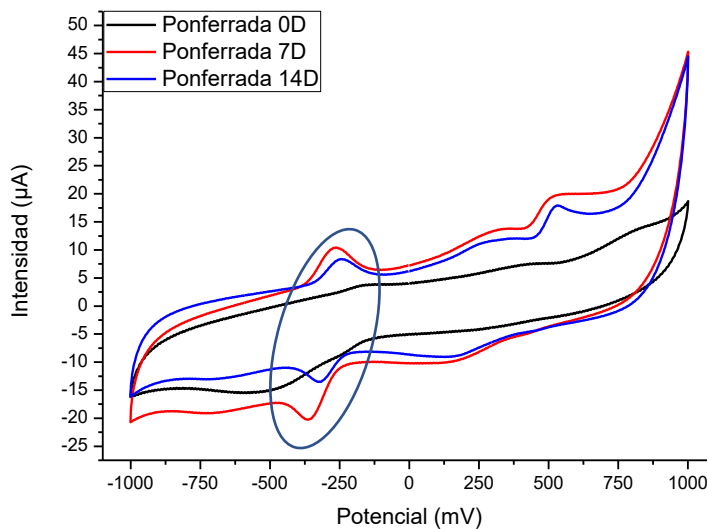


Figura 46. Envejecimiento Ponferrada en bruto, grafito.

En el caso de leche semidesnatada y sin lactosa también se puede apreciar la aparición de picos y su posterior desplazamiento durante el proceso de envejecimiento (Círculos azules). Todo ello es indicativo de que en principio el sensor es capaz de observar los cambios que experimenta el producto con los días.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Número	Nombre	Día
1	Clunia	0
2		7
3		14
4	Peñaranda	0
5		7
6		14
7	Covarrubias	0
8		7
9		14
10	Ponferrada	0
11		7
12		14

Tabla 14. Nomenclatura PCA envejecimiento.

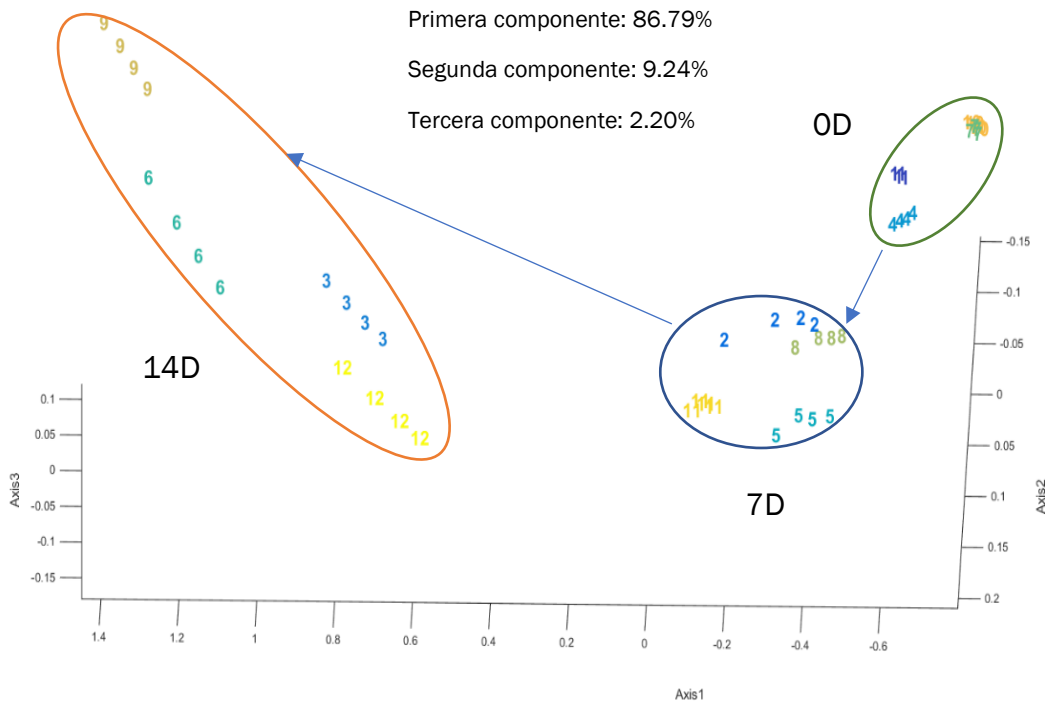


Figura 47. PCA envejecimiento en bruto, grafito.

Desde el punto de vista cuantitativo, analizando los datos tratados estadísticamente y con la nomenclatura definida en la Tabla 14, se observa que la distribución espacial sufre un desplazamiento similar durante el envejecimiento de todas las muestras y que estas se encuentran concentradas en diferentes regiones del espacio. Las muestras de 0 días aparecen en la parte superior derecha, las muestras de 7 días se desplazan hacia abajo mientras que tras 14 días de evolución las leches tienen mayor deriva (la leche ya estaba muy cuajada) pero claramente separadas hacia la izquierda.

II En ferro - ferricianuro

➤ Leche entera:

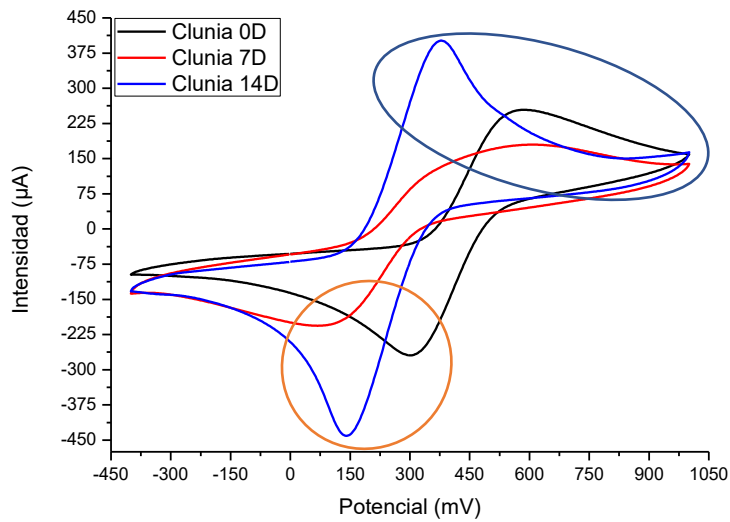


Figura 48. Envejecimiento Clunia en ferro - ferri, grafito.

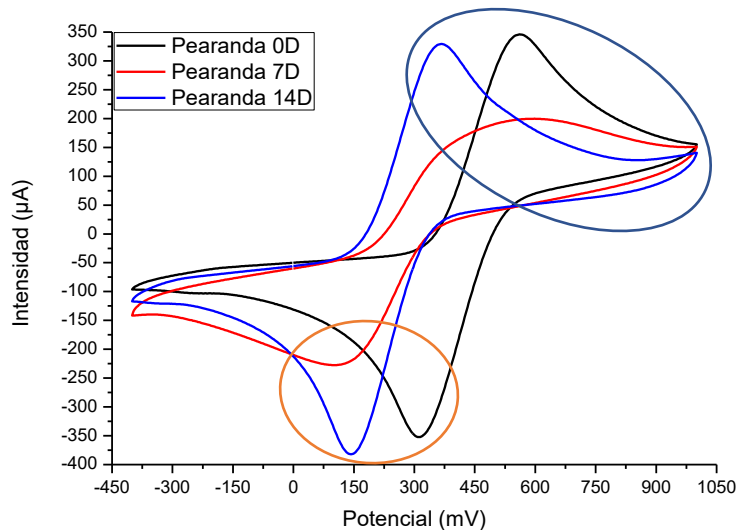


Figura 49. Envejecimiento Peñaranda en ferro - ferri, grafito.

Se observa que tras 7 días de envejecimiento se produce una clara disminución en la intensidad de los picos RedOx a la vez que presentan formas mucho menos definidas (líneas rojas, 7D), para reaparecer de forma más pronunciada con mayor intensidad y desplazados hacía potenciales más bajos (líneas azules, 14D).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

➤ Leche semidesnatada y sin lactosa:

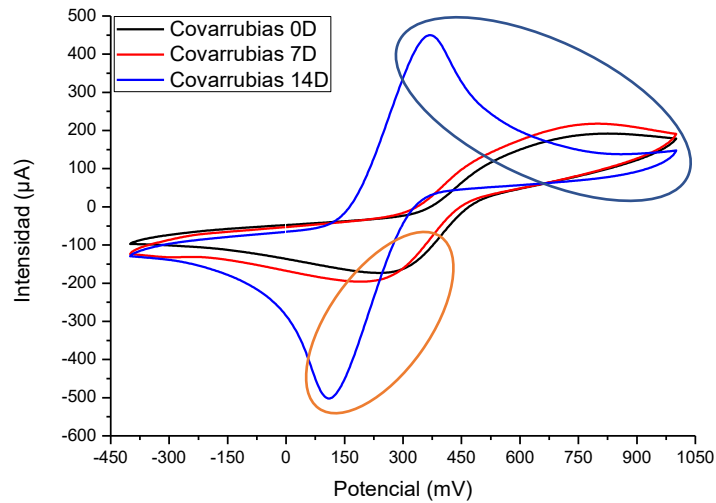


Figura 50. Envejecimiento Covarrubias en ferro - ferri, grafito.

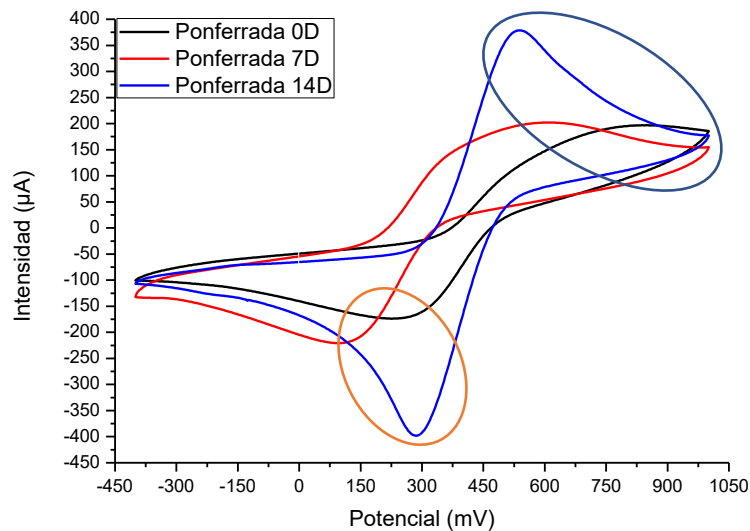


Figura 51. Envejecimiento Ponferrada en ferro - ferri, grafito.

En el caso de la leche semidesnatada y sin lactosa se aprecian mayores diferencias en las líneas azules (14D) con la aparición de picos más definidos y que presentan grandes intensidades, que además se encuentran desplazados haciendo a los procesos más reversibles.

La variación sufrida entre los días 0 y 7 es menor que en las muestras de leche entera, lo cual puede ser debido a que presentan una menor cantidad tanto de lactosa como de grasa lo que retarda su deterioro.

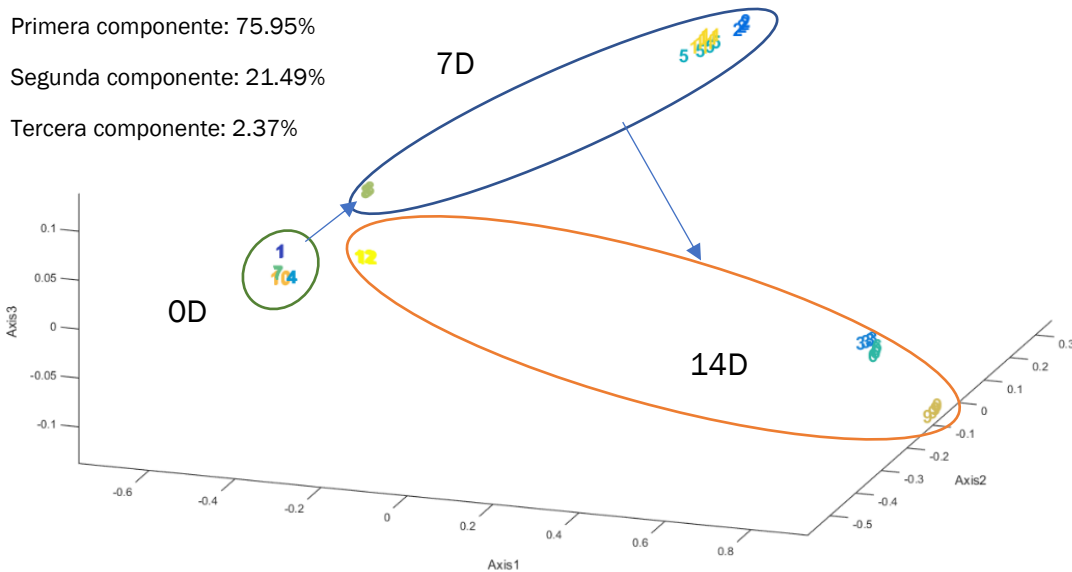


Figura 52. PCA envejecimiento en ferro - ferri, grafito.

El análisis estadístico de los resultados, manteniendo la nomenclatura utilizada anteriormente (Tabla 14), nos permite concluir que tal y como se apreciaba en la comparativa visual se realiza una correcta discriminación de las muestras en función de su envejecimiento, aunque con las medidas en disolución de ferro-ferricianuro hay dos muestras (8 y 12) que se desvían ligeramente del patrón global. De forma análoga a lo que ocurría en las muestras en bruto el desplazamiento espacial sigue un patrón definido con un desplazamiento hacia la derecha a medida que aumenta el tiempo de envejecimiento.

Con los resultados obtenidos se deduce que el sensor discrimina de forma efectiva también con la dilución en disolución de ferro-ferricianuro.

c) Correlaciones

Con los datos medidos mediante la lengua voltamétrica se va a realizar el análisis de correlaciones denominado PLS, además se tratarán los datos mediante otro método de análisis, denominado SVMR, que permite predecir los valores de las muestras en bruto del día 0 ya que es del que se disponen datos químicos.

Como ya se explicó brevemente en el capítulo 3 mediante el análisis PLS se obtiene una recta de calibrado para cada uno de los parámetros, lo que nos permite estimar los valores, la fiabilidad de dicha recta se expresa mediante el error cuadrático medio (RMSE) y el coeficiente de determinación (R^2).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Parámetro	R ² _c	RMSE _c	R ² _p	RMSE _p	Variables latentes
Grasas	0.9771	0.1291	0.9679	0.1607	2
Proteínas	0.9911	0.0063	0.9644	0.0133	3
Lactosa	0.9863	0.0960	0.9798	0.1228	2
ESM	0.9785	0.1227	0.9691	0.1546	2
H Index	0.9874	0.0153	0.9810	0.0198	2
FDP	0.9887	0.0038	0.9827	0.0049	2
Células	0.9829	0.8843	0.9723	1.1840	2
Urea	0.9780	26.3589	0.9695	32.6605	2
Acidez	0.9484	0.2997	0.9303	0.3665	2
UV-Vis 1100	0.9816	0.0265	0.9733	0.0337	2
UV-Vis 1500	0.9874	0.0249	0.9811	0.0321	2
Folin	0.9910	0.0610	0.9837	0.08564	3

Tabla 15. PLS leche en bruto analizada con grafito.

La Tabla 15 muestra los valores obtenidos y que permiten concluir que existe una buena correlación lineal entre los datos voltamétricos y los diferentes parámetros químicos medidos. Presenta valores de error muy bajos (RMSE) con altos coeficientes de fiabilidad (R²) para todos los parámetros con excepción de la urea cuyos valores de RMSE son notablemente más altos.

Por otra parte, el método permite realizar un análisis predictivo del que se recogen los datos de error y fiabilidad, en este caso los valores de error son algo más altos mientras que los valores de fiabilidad son más bajos que en el modelo de calibración, pero en cualquier caso suficientemente óptimos para llevar a cabo la predicción ya que además presentan un bajo número de variables latentes. Todo ello indica que cuantitativamente el análisis mediante la lengua voltamétrica utilizada obtiene resultados que permiten predecir con suficientes garantías los datos químicos a partir de la calibración realizada.

Como ya se ha comentado también se realizará un estudio similar mediante otra técnica de análisis quimiométrico que permita seleccionar cual es más adecuada a nuestro producto.

A continuación, se muestran los datos obtenidos en el estudio de calibración y en el de predicción con los datos químicos de dichas muestras mediante SVMR, Tabla 16:

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

➤ Modelos:

Parámetro	R ² _C	RMSE _C	R ² _P	RMSE _P
Grasas	0.9939	0.0737	0.9379	0.2175
Proteínas	0.9894	0.0075	0.8921	0.0223
Lactosa	0.9934	0.0730	0.9292	0.2233
ESM	0.9930	0.0757	0.9201	0.2413
FDP	0.9923	0.0034	0.9106	0.0109
Células	0.9899	0.7834	0.8569	2.6250
Urea	0.9944	15.5245	0.9460	42.6894
Ácido	0.9928	0.1231	0.9200	0.3811
Folin	0.9915	0.0638	0.8800	0.2260

Tabla 16. SVMR leche en bruto, día 0. Modelo.

➤ Predicciones:

Muestra	Predicción		Análisis químico	Error relativo, %
Clunia	Grasas	3.58	3.52	1.7
	Proteínas	3.22	3.27	1.53
	Lactosa	4.91	4.87	0.82
	ESM	8.932	8.842	1.02
	FDP	0.526	0.524	0.38
	Células	20	17	17.65
	Urea	236	242	2.48
	Acidez	14.0	13.8	1.45
	Folin	1.942	2.014	3.57

Tabla 17. SVMR Clunia en bruto, día 0. Predicción.

En el caso de las predicciones para la leche denominada Clunia (Entera) se observa que las desviaciones frente a los valores son menores del 5% excepto en el caso de las células que es casi el 18%.

Muestra	Predicción		Análisis químico	Error relativo, %
Peñaranda	Grasas	3.38	3.53	4.25
	Proteínas	3.40	3.38	0.59
	Lactosa	4.71	4.86	3.09
	ESM	8.853	9.009	1.73
	FDP	0.52	0.527	1.33
	Células	29	32	9.38
	Urea	291	262	11.07
	Acidez	14.2	14.4	1.39
	Folin	1.927	1.753	9.93

Tabla 18. SVMR Peñaranda en bruto, día 0. Predicción.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En el caso de Peñaranda (También entera) se obtienen peores predicciones, aunque siguen siendo buenas, puesto que excepto en el caso de la urea (11%) todas las predicciones son menores del 10%.

Muestra	Predicción		Análisis químico	Error relativo, %
Covarrubias	Grasas	1.78	1.80	1.11
	Proteínas	3.26	3.31	1.51
	Lactosa	3.29	3.32	0.90
	ESM	7.354	7.325	0.40
	FDP	0.465	0.466	0.21
	Células	28	25	12.00
	Urea	627	619	1.29
	Acidez	11.6	11.4	1.75
	Folin	1.765	1.754	0.63

Tabla 19. SVMR Covarrubias en bruto, día 0. Predicción.

En los errores relativos de Covarrubias se aprecian errores muy pequeños (Menores del 2%) exceptuando en el caso de las células que es del 12%.

Muestra	Predicción		Análisis químico	Error relativo, %
Ponferrada	Grasas	1.53	1.84	16.85
	Proteínas	3.30	3.27	0.92
	Lactosa	2.81	3.14	10.51
	ESM	6.823	7.195	5.17
	FDP	0.429	0.446	3.81
	Células	11	15	26.67
	Urea	653	594	9.93
	Acidez	11.0	11.6	5.17
	Folin	3.682	3.305	11.41

Tabla 20. SVMR Ponferrada en bruto, día 0. Predicción.

Analizando los errores relativos para Ponferrada (Semidesnatada y sin lactosa) se observa que son peores que en los casos anteriores, igualmente el peor valor se encuentra en el caso de las células con un valor cercano al 27%.

Finalmente, y realizando una evaluación general, se puede afirmar que las predicciones son aceptables en todos los parámetros y para los cuatro productos medidos a excepción del contenido en urea.

4.1.3. Aplicación de la lengua voltamétrica

a) *Discriminación*

Después de realizado el estudio preliminar de la lengua voltamétrica, en el que se ha visto que funcionan correctamente tanto los sensores de carbono como los biosensores enzimáticos, se analizan), con la lengua voltamétrica diseñada a partir de estos tres sensores, las muestras especificadas anteriormente (Tabla 9). Todas las muestras se analizan conjuntamente

mediante la lengua compuesta de un CPE de grafito y dos biosensores (modificados con GOx y GaOx).

Este análisis se utilizará para discriminar entre diferentes tipos de leche clasificadas en dos grandes grupos (leches enteras y leches semidesnatadas), y dentro de cada grupo leche entre tres variedades (convencional, sin lactosa y con calcio).

Primero se desarrollará una comparativa de las diferentes muestras (enteras y semidesnatadas) con los tres sensores de la lengua y posteriormente se realizará el tratamiento estadístico mediante PCA utilizando la nomenclatura de la siguiente tabla (Tabla 21) con objeto de distinguir entre cada una de ella:

Número	Nombre
1	Leche
2	Leche sin lactosa
3	Leche con calcio

Tabla 21. Nomenclatura PCA para las muestras de leche.

I Leche entera

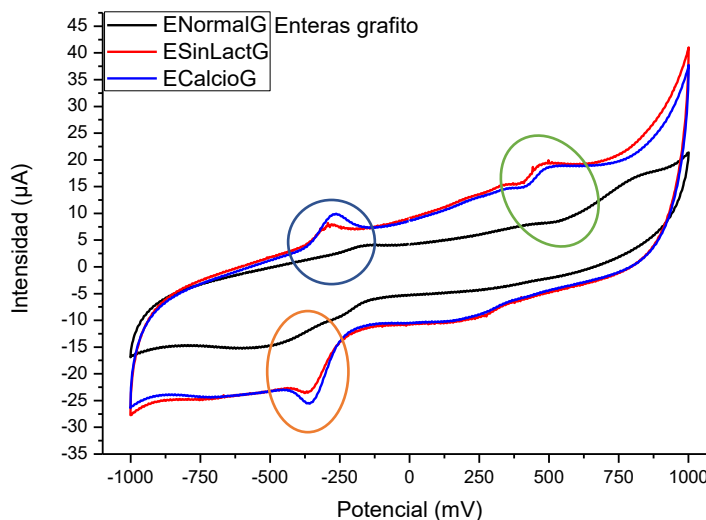


Figura 53. Comparativa leche entera, grafito.

Se aprecian distinciones claras en todas las muestras analizadas, difiriendo especialmente la leche entera normal (Línea negra). En las zonas delimitadas por círculos se aprecian las mayores diferencias con picos mucho más intensos y definidos para las leches sin lactosa y con calcio.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

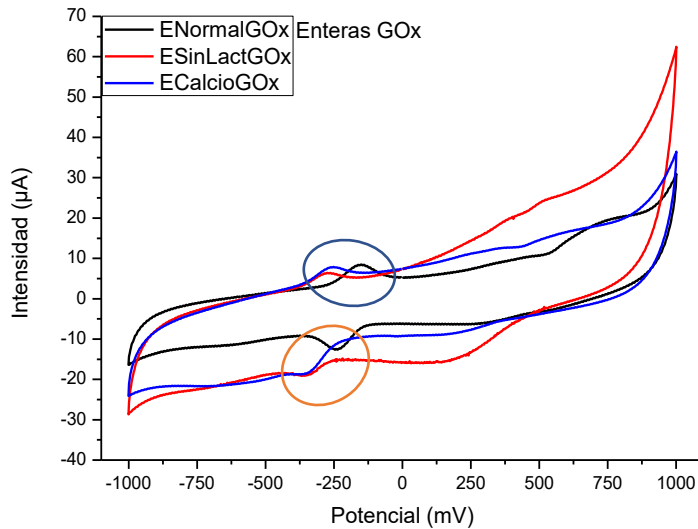


Figura 54. Comparativa leche entera, grafito con GOx.

En el caso de usar un biosensor con GOx se puede apreciar la diferente forma y tamaño de los picos RedOx recogidos en cada una de las muestras. En las zonas delimitadas en azul y naranja se aprecian picos de oxidación y reducción ambos especialmente definidos en la leche entera normal.

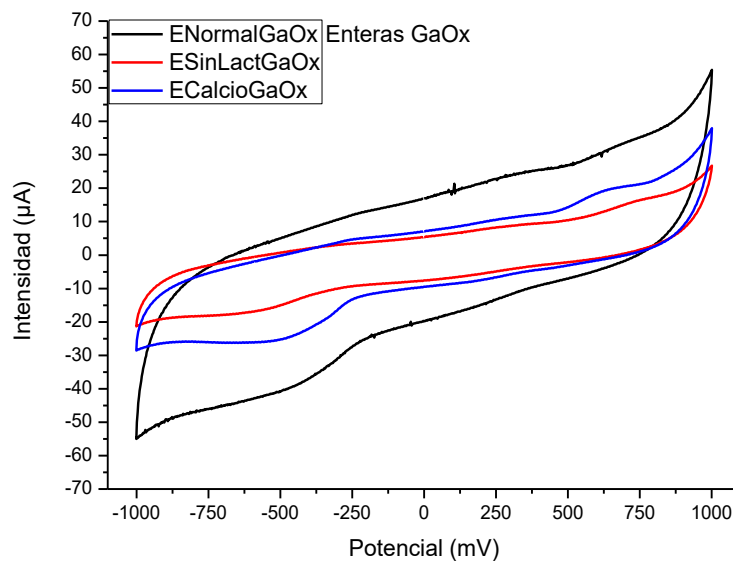


Figura 55. Comparativa leche entera, grafito con GaOx.

Si se utiliza un biosensor con GaOx no se observan picos RedOx tan definidos, pero se observa que la morfología y las intensidades de los voltamogramas son diferentes en los tres medios, lo que permite definir las muestras.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

A continuación, se realiza el análisis estadístico que permite diferenciar los tres tipos de leche entera con los datos obtenidos de la lengua voltamétrica:

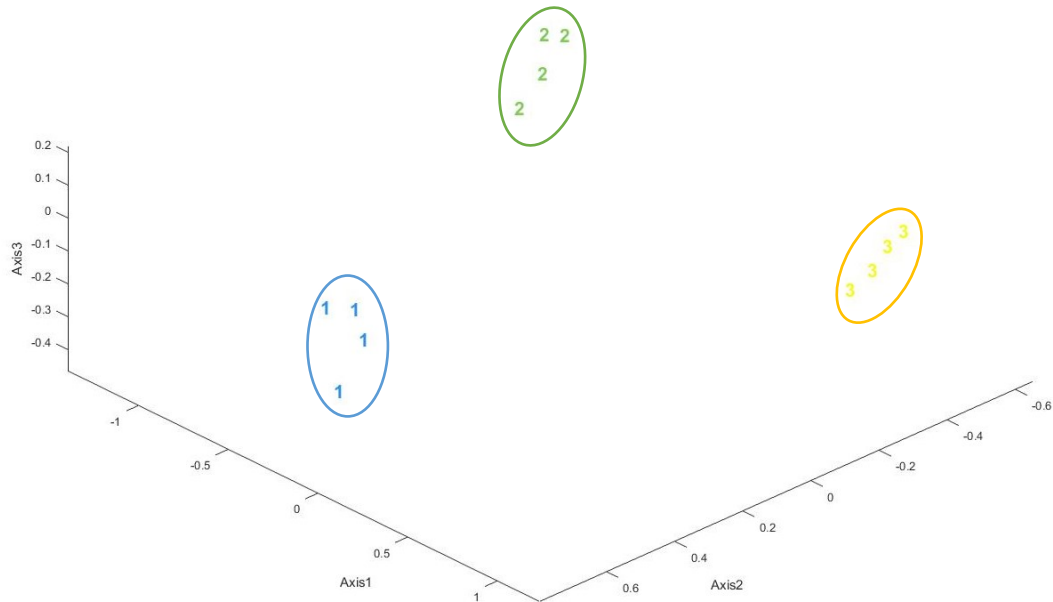


Figura 56. PCA muestras analizadas, leches enteras.

Siguiendo la nomenclatura referida anteriormente (Tabla 21) y una vez realizado el tratamiento estadístico reflejado en la figura de arriba, se puede apreciar una clara discriminación en las muestras analizadas.

Esta situación ya se venía observando con anterioridad en los voltamogramas descritos (Figura 53 - Figura 55). Así mismo en esta misma figura queda patente que la deriva de los datos tratados no es relevante.

II Leche semidesnatada

Se realiza el mismo estudio de los tres tipos de leche semidesnatadas (convencional, sin lactosa y con calcio) utilizando la lengua voltamétrica descrita.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

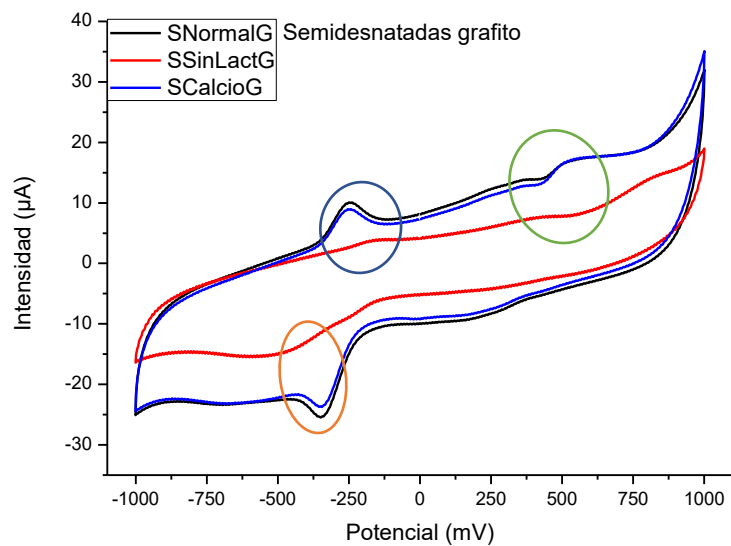


Figura 57. Comparativa leche semidesnatada, grafito.

En los voltamogramas se aprecia una respuesta diferente para todas y cada una de las muestras analizadas, difiriendo especialmente la leche sin lactosa (Línea roja) del resto. En las zonas marcadas con círculos se aprecian las mayores diferencias entre las tres variedades.

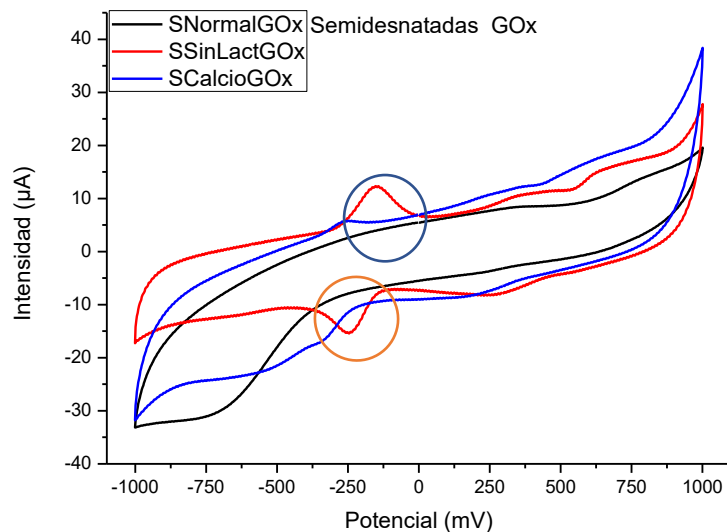


Figura 58. Comparativa leche semidesnatada, grafito con GOx.

En el caso de usar un biosensor con GOx, Figura 58, todas las muestras son fácilmente distinguibles, puesto que sus voltamogramas son diferentes en forma y tamaño. Se observa la aparición de picos en los barridos de oxidación y reducción a potenciales negativos (aproximadamente en -150 y en -250mV) claramente definidos únicamente en el caso de leche semidesnatada y sin lactosa (Línea roja), mientras que en el resto no se aprecian picos definidos en esta zona.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

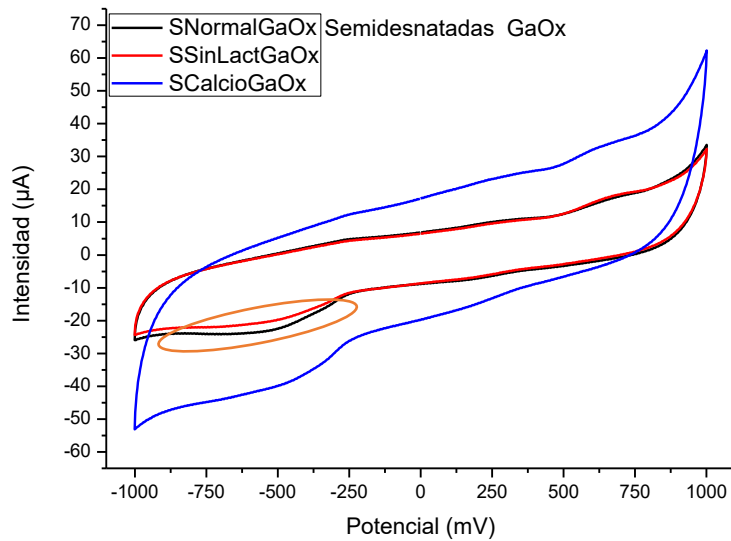


Figura 59. Comparativa leche semidesnatada, grafito con GaOx.

Igual que ocurre en las muestras de leche entera si se utiliza un biosensor con GaOx no se observan picos tan definidos como en los otros sensores, pero se distingue completamente la muestra de leche con calcio, mientras que en las otras dos sólo hay alguna pequeña diferencia evidente (Zona marcada con el círculo naranja).

De la misma forma que se hizo en el caso de las muestras de leche entera se procede al análisis estadístico de las muestras de leche semidesnatada mediante PCA. En la Figura 60 se observa que son claramente distinguibles, como también ocurría en las muestras enteras:

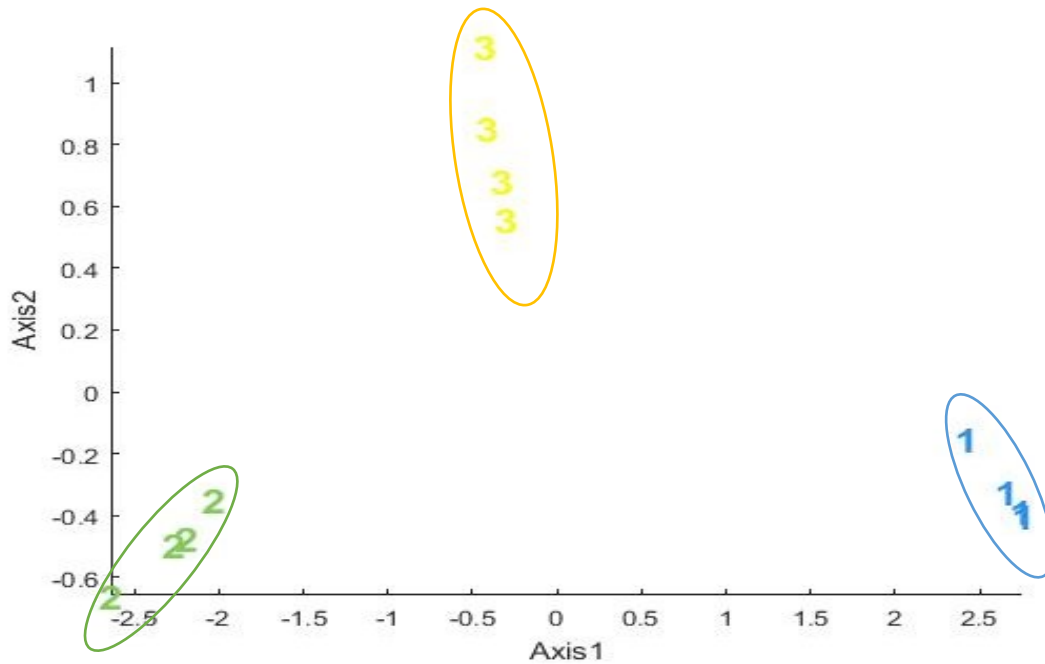


Figura 60 PCA muestras analizadas, leches semidesnatadas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Siguiendo la nomenclatura antes referida (Tabla 21) y como ya se apreciaba en los voltamogramas (Figura 57 - Figura 59) existe una clara discriminación de cada una de las muestras, además la dispersión de las medidas es considerablemente pequeña.

Se procede a continuación a realizar el tratamiento estadístico conjunto de los datos voltamétricos obtenidos en las seis muestras analizadas, utilizando la nomenclatura definida en la siguiente tabla:

Número	Nombre
1	Entera
2	Entera sin lactosa
3	Entera con calcio
4	Semidesnatada
5	Semidesnatada sin lactosa
6	Semidesnatada con calcio

Tabla 22. PCA muestras analizadas.

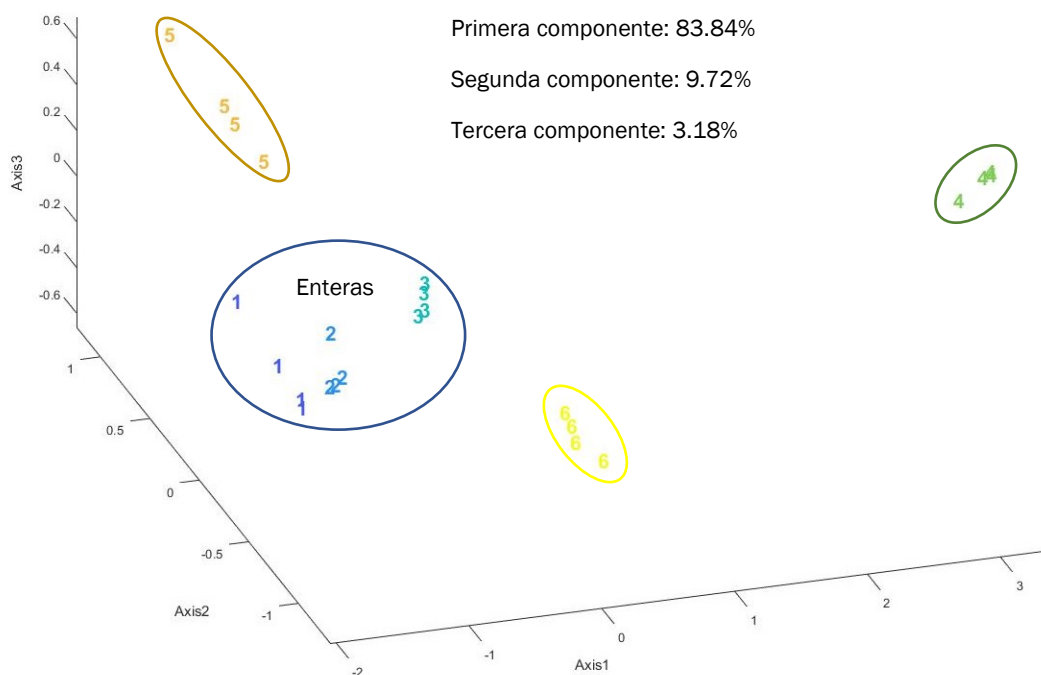


Figura 61. PCA muestras analizadas.

Como ya se ha comentado la discriminación parcial de las muestras en los dos grupos (Figura 56 y Figura 60) fue muy adecuada, si se realiza la discriminación conjunta se aprecia que las muestras de un tipo de leche están agrupadas en una región del espacio central, que corresponde a las leches enteras, mientras que el resto, leches semidesnatadas, se encuentran diseminadas alrededor de dicha región; con una buena diferenciación entre ellas.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

A pesar de esta agrupación observada en las muestras de leche entera, se puede afirmar que la discriminación es aceptable si bien el contenido graso parece ser una de las variables más característica.

b) Correlaciones

Como último apartado del estudio estadístico se realiza el tratamiento de los datos mediante PLS para todas las leches de modo conjunto con objeto de realizar la calibración y posteriormente la predicción con los datos químicos.

Con este tratamiento se han adquirido las siguientes gráficas (Figura 62 - Figura 73) y tablas (Tabla 23 y Tabla 24), para los seis tipos de leches y algunos de parámetros más significativos, que servirán para ilustrar el buen comportamiento de la lengua voltamétrica.

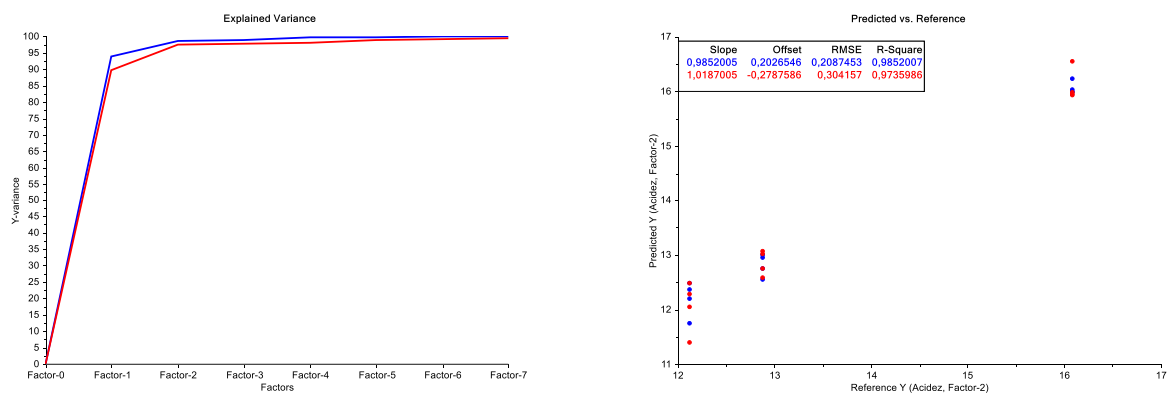


Figura 62. PLS leche entera, acidez.

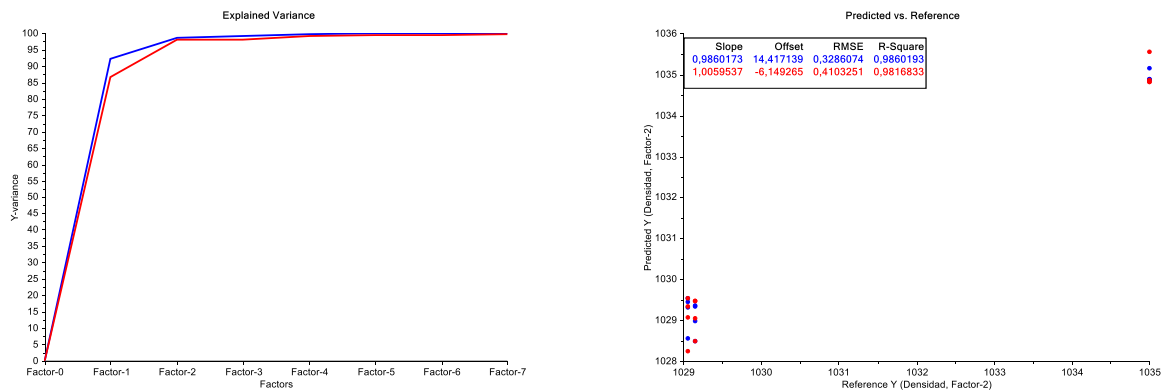


Figura 63. PLS leche entera, densidad.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

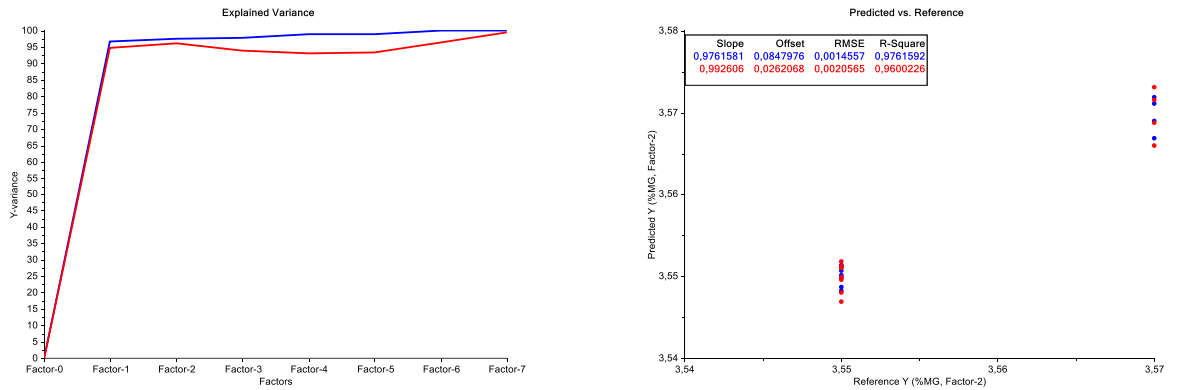


Figura 64. PLS leche entera, %MG.

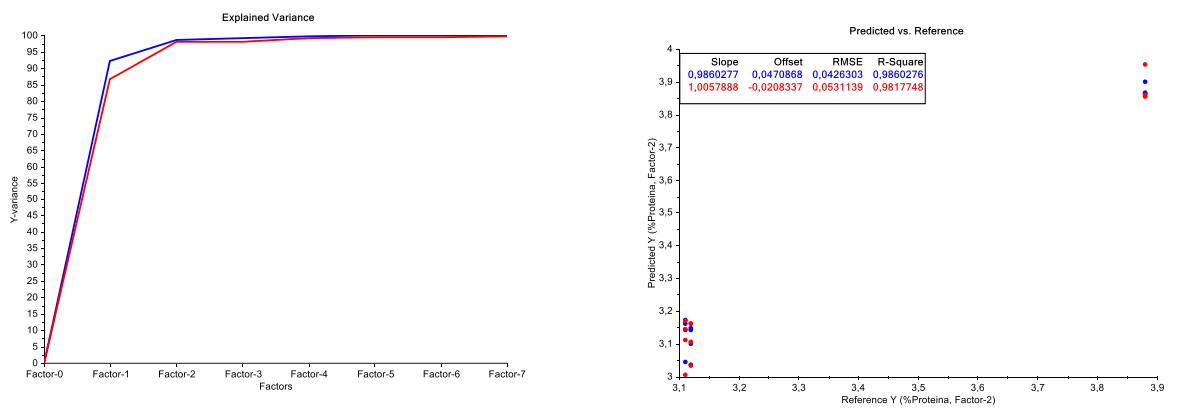


Figura 65. PLS leche entera, %proteínas.

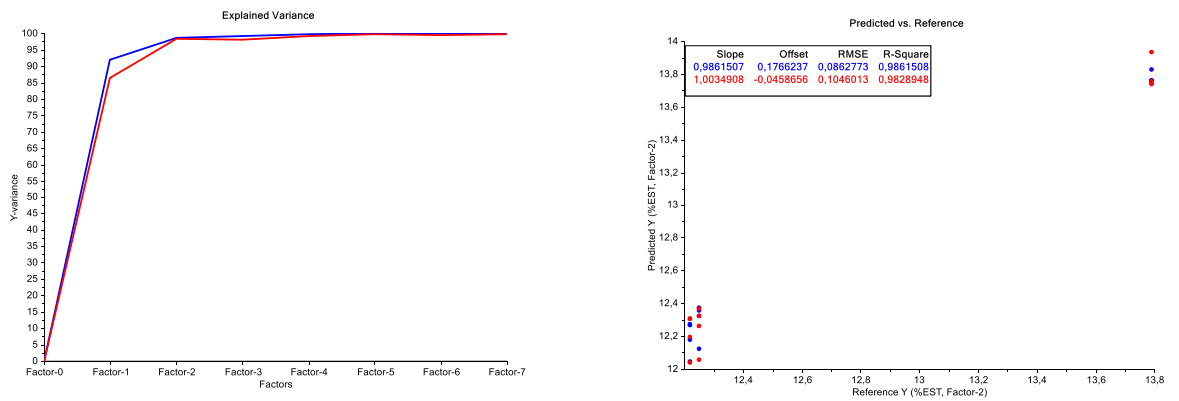


Figura 66. PLS leche entera, %EST.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea

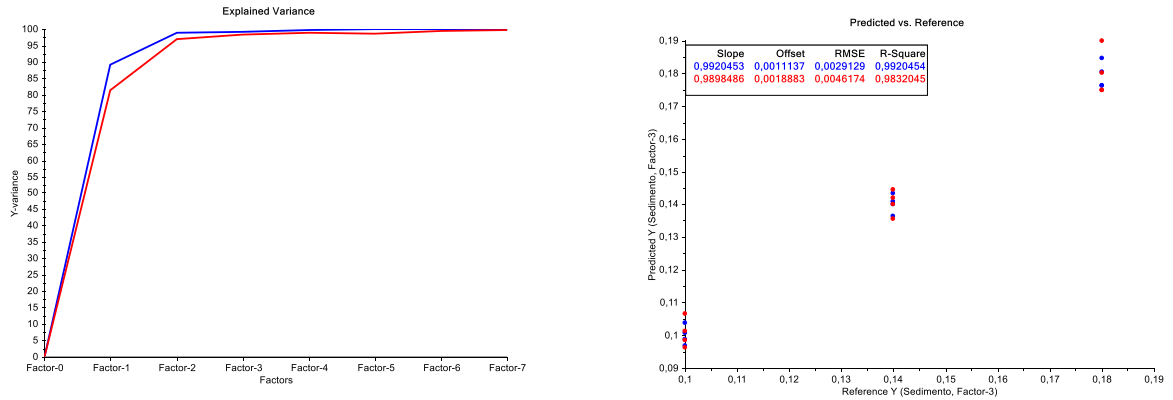


Figura 67. PLS leche entera, sedimento.

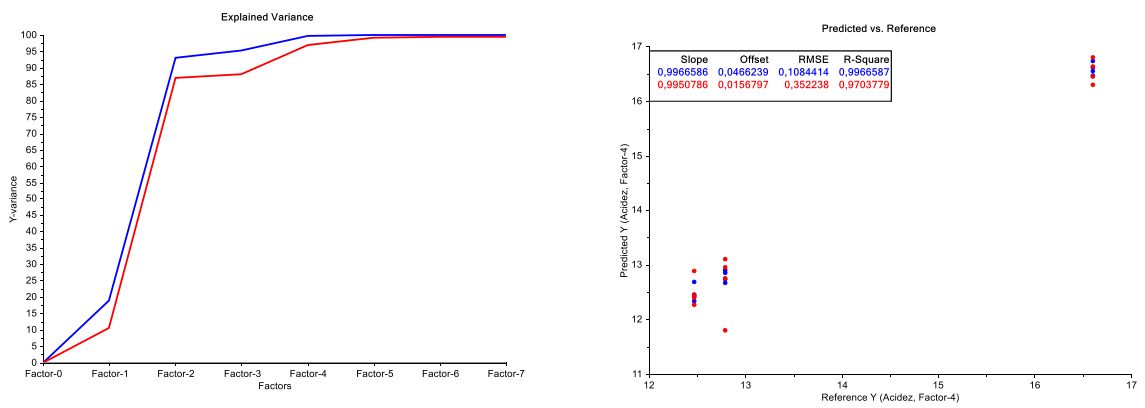


Figura 68. PLS leche semidesnatada, acidez.

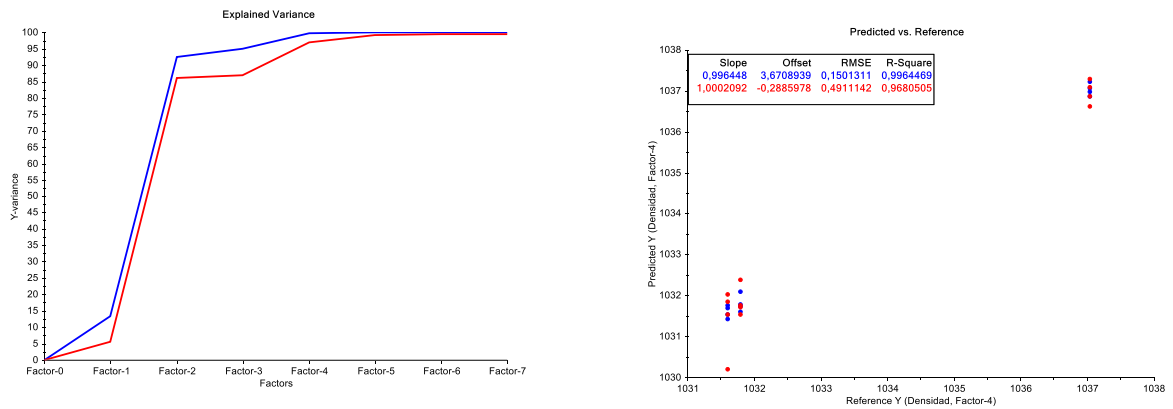


Figura 69. PLS leche semidesnatada, densidad.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

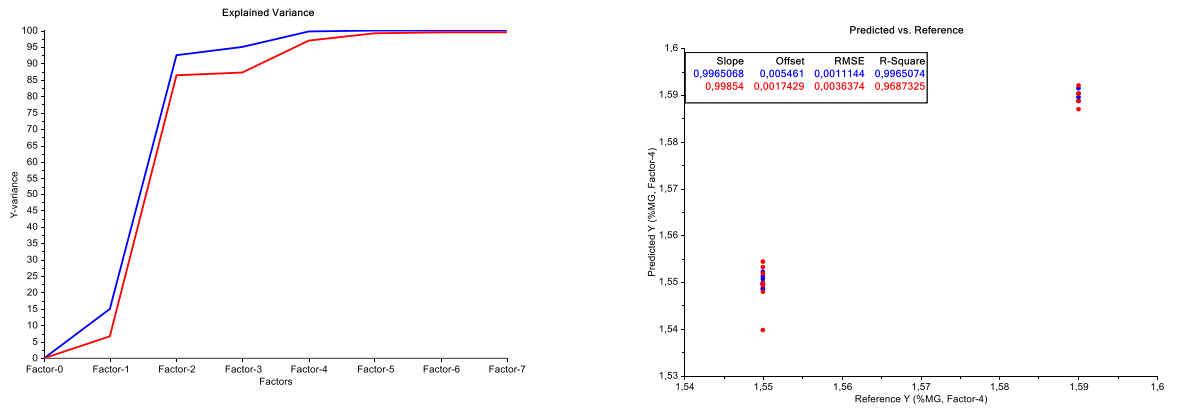


Figura 70. PLS leche semidesnatada, %MG.

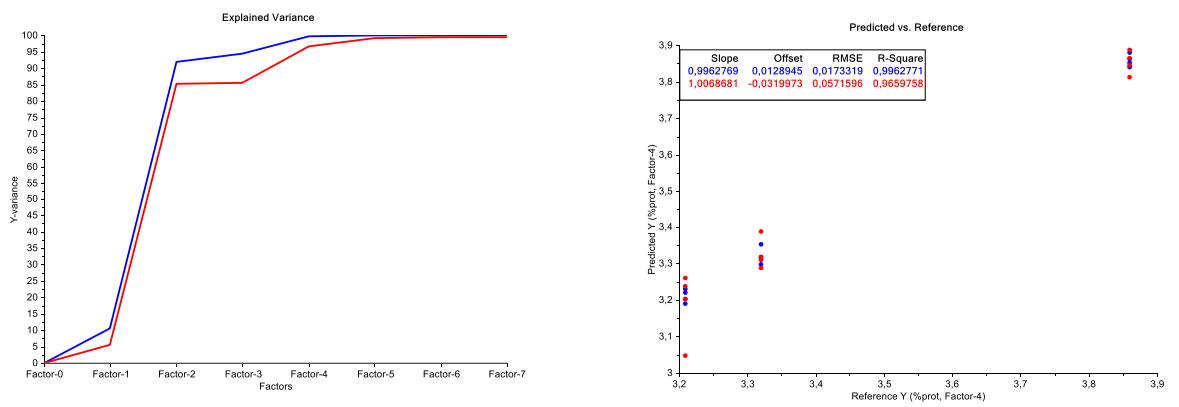


Figura 71. PLS leche semidesnatada, %proteínas.

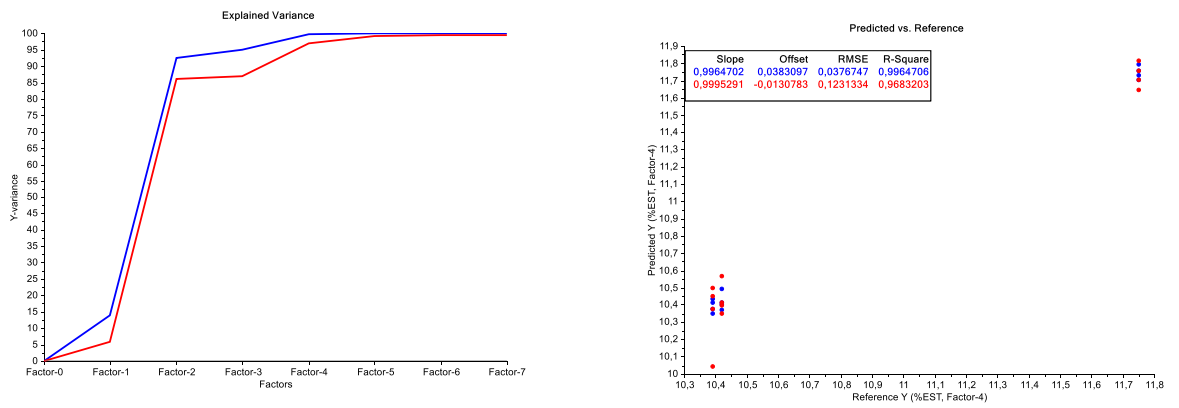


Figura 72. PLS leche semidesnatada, % EST.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea

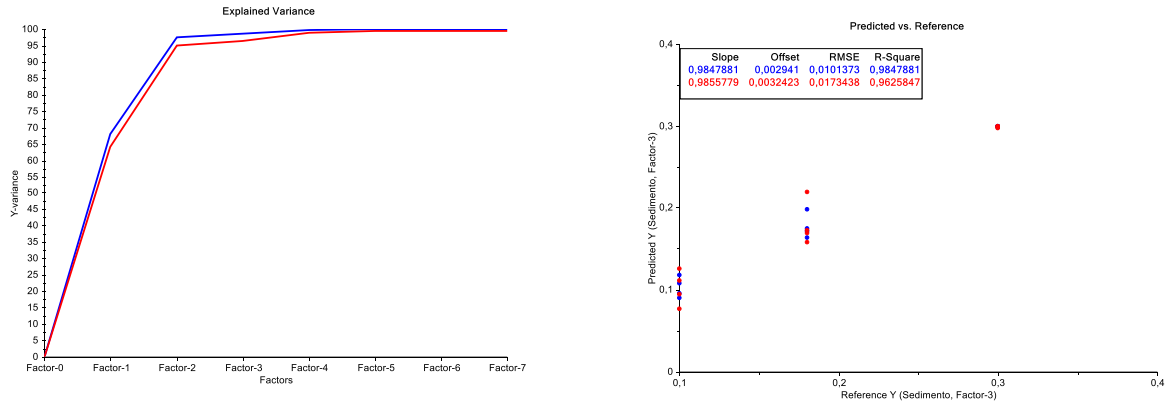


Figura 73. PLS leche semidesnatada, sedimento.

Parámetro	R ² _C	RMSE _C	R ² _P	RMSE _P	Variables latentes
Acidez	0,9852	0,2087	0,9736	0,3041	2
Densidad	0,9860	0,3286	0,9817	0,4103	2
%MG	0,9761	0,0014	0,9600	0,0020	2
%Prot	0,9860	0,0426	0,9818	0,0531	2
%EST	0,9861	0,0863	0,9829	0,1046	2
Sedimento	0,9920	0,0029	0,9832	0,0046	3

Tabla 23. PLS muestras analizadas, leche entera.

Parámetro	R ² _C	RMSE _C	R ² _P	RMSE _P	Variables latentes
Acidez	0,9966	0,1084	0,9703	0,3522	4
Densidad	0,9964	0,1501	0,9681	0,4911	4
%MG	0,9965	0,0011	0,9687	0,0036	4
%Prot	0,9963	0,0173	0,9660	0,0572	4
%EST	0,9964	0,0377	0,9683	0,1231	4
Sedimento	0,9847	0,0101	0,9626	0,0173	3

Tabla 24. PLS muestras analizadas, leche semidesnatada.

En los valores de calibración se obtienen menores errores (RMSE) y mayores parámetros de fiabilidad (R²) que en los valores de predicción como suele ser usual, también hay ligeras diferencias entre los dos tipos de leche. Observando la Tabla 24 se puede inferir que la correlación de las leches semidesnatadas con los datos químicos es ligeramente peor que la obtenida en la Tabla 23 (para leches enteras) ya que necesita un mayor número de variables latentes.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se aprecia además que para ambos tipos de muestras se tienen valores de R^2 (tanto en calibración como en validación) cercanos a la unidad (siempre mayores de 0.96) y los valores de RMSE son bajos, especialmente en el porcentaje de materia grasa y sedimento.

4.2. Lengua potenciométrica

En este apartado se procederá con la evaluación de la lengua potenciométrica, para ello se realizarán las medidas de las muestras descritas en el capítulo anterior. Se ha definido además la numeración de las membranas (Tabla 25) con el fin de facilitar la identificación en las gráficas obtenidas al aplicar la potenciometría.

Inicialmente se caracterizará la lengua mediante la medición de las disoluciones patrón indicadas en la Tabla 10. Posteriormente se realizará un estudio denominado discriminación previa con el análisis de las muestras de tipo lácteo indicadas en la Tabla 11. Para finalizar se llevará a cabo el análisis de las muestras lácteas descritas en la Tabla 12.

Tras la toma de datos se llevará a cabo su correspondiente tratamiento estadístico mediante el método LDA y además el método MLR que se aplicará únicamente en las muestras de tipo lácteo ya que son de las únicas que se disponen datos químicos.

4.2.1. Caracterización

La caracterización de los sensores potenciométricos que constituyen la lengua se realiza mediante la medición de diferentes disoluciones. En primer lugar, se realizan medidas en el electrolito base KCl lo que permite observar la buena reproducibilidad y repetibilidad de nuestro sistema. En segundo lugar, se analizará la capacidad de este sistema para discriminar entre diferentes disoluciones características de los cinco sabores básicos:

- KCl
- 5 disoluciones que simulan los cinco sabores:
 - Dulce: Fructosa
 - Salado: NH_4Cl
 - Ácido: HCl
 - Amargo: MgSO_4
 - Umami: Glutamato monosódico.

La correspondencia de membranas se identifica en la Tabla 25:

Número	Membrana	Número	Membrana
1	1B	11	5B
2	1C	12	5C
3	1D	13	5D
4	1E	14	5E
5	1F	15	5F
6	3B	16	6B
7	3C	17	6C
8	3D	18	6D
9	3E	19	6E
10	3F	20	6F

Tabla 25. Numeración de las membranas.

a) KCl

Se efectúan varias medidas de la disolución de KCl, posteriormente se calcula la media y se representa en una gráfica (Figura 74):

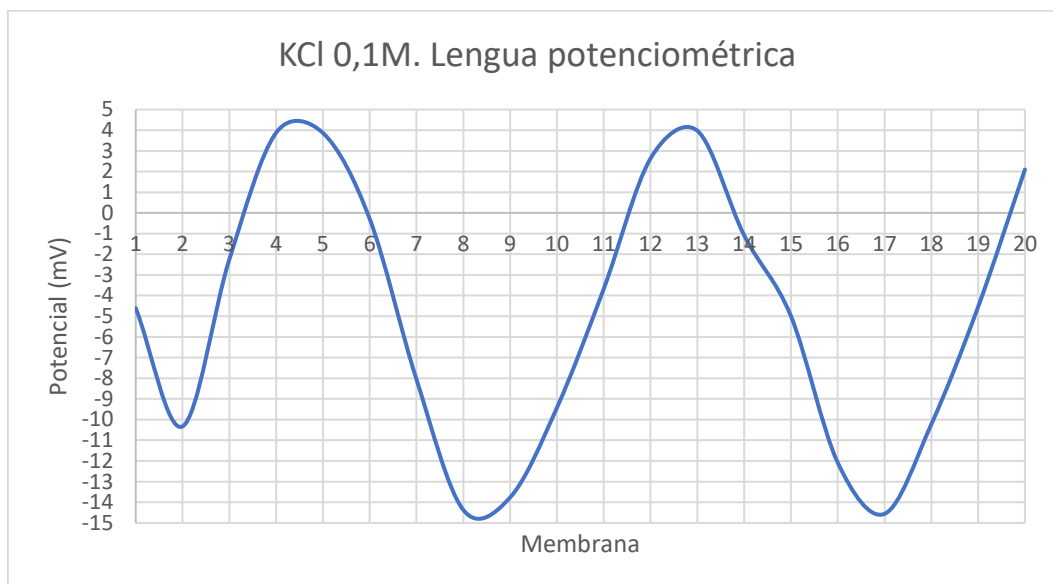


Figura 74. KCl 0.1M, lengua potenciométrica.

La Figura 74 nos muestra la huella característica de la lengua potenciométrica utilizada. De ella se puede obtener la relación existente entre las diferentes membranas frente a la misma muestra. Esta respuesta es altamente reproducible.

b) Sabores: Dulce, salado, ácido, amargo y umami

Para la caracterización de la lengua potenciométrica se realizan tres medidas de cada una de las disoluciones que simulan los sabores, sin que existan diferencias significativas entre los diferentes datos, se calcula la media y se representa en la siguiente gráfica (Figura 75):

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

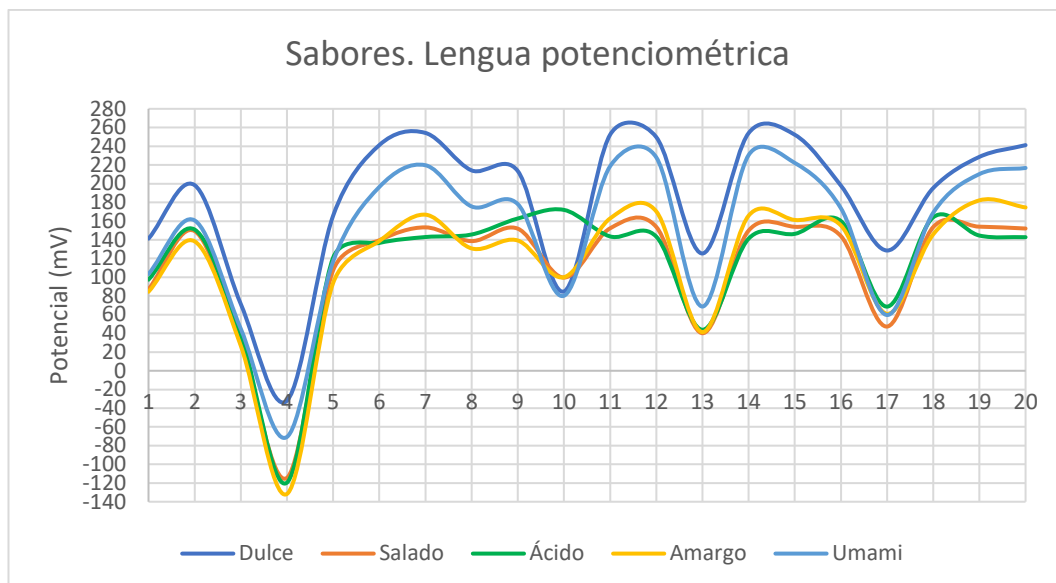


Figura 75. Sabores, lengua potenciométrica.

En la Figura 75 se observa que los sabores presentan un perfil potenciométrico similar, con variaciones significativas en algunas membranas específicas a las que deben ser especialmente sensibles estas membranas.

La disolución dulce presenta valores de potencial más altos para todas las membranas (Excepto la 10). La disolución sabor ácido presenta una tendencia característica a aumentar de potencial entre las membranas 9-10 mientras que para el resto suele tener valores de potencial bajos. Valorando el potencial entre las membranas 10-11 en la muestra ácido se produce una disminución frente al claro aumento que presentan los demás sabores. En las disoluciones salado y amargo se obtiene valores de potencial similares y claramente menores que para el resto de sabores. Los potenciales registrados en las diferentes membranas en la disolución unami son similares a los observados en la disolución sabor dulce pero con valores de potencial sensiblemente menores.

A continuación, se realiza la discriminación de las muestras mediante el análisis estadístico realizado a las medidas potenciométricas, para ello se sigue el método denominado LDA.

El orden establecido es el siguiente (Tabla 26):

Numeración	Sabor
1	Dulce
2	Salado
3	Ácido
4	Amargo
5	Umami

Tabla 26. Numeración de las muestras correspondientes a sabores.

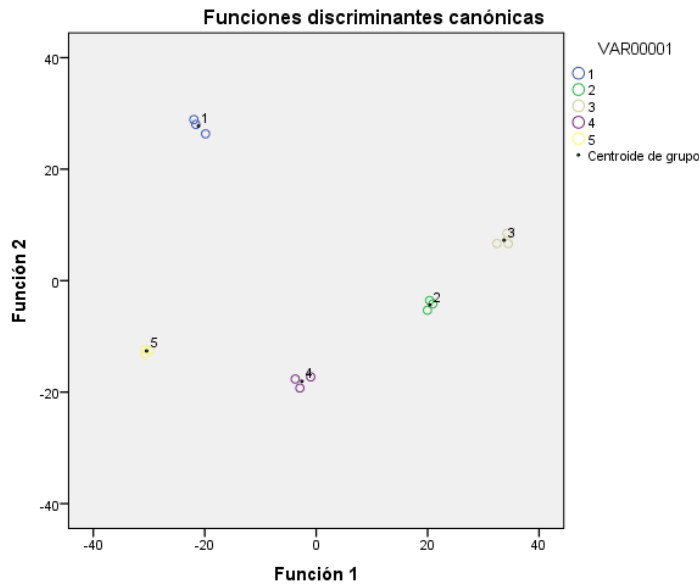


Figura 76. Discriminación de sabores mediante potenciometría.

Se puede observar que el tratamiento estadístico realiza una discriminación clara entre cada uno de los sabores, además se advierte que la dispersión de estas medidas es mínima ya que los puntos obtenidos se encuentran muy concentrados en un área muy pequeña. Esto es indicativo de la buena capacidad de discriminación de la lengua para la detección de alimentos. Teniendo en cuenta lo anterior se procede a utilizar la lengua potenciométrica diseñada en diferentes tipos de leches con objeto de ver su capacidad de discriminación.

4.2.2. Discriminación previa en leches.

La Figura 77 nos muestra los valores de potencial registrados en las veinte membranas de la lengua para seis tipos de leches con diferente contenido graso (enteras, semidesnatadas y desnatada) y diferentes marcas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

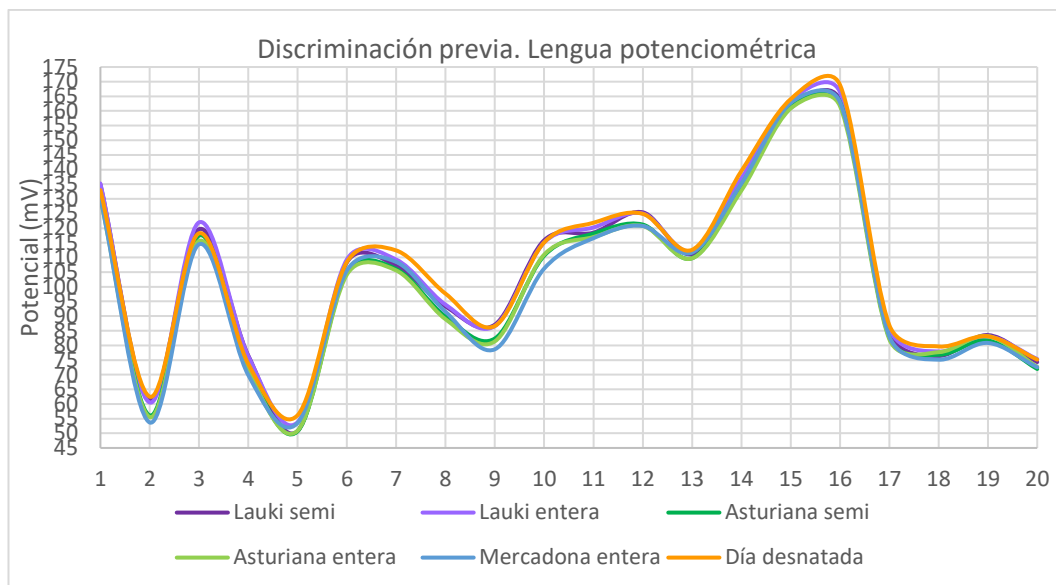


Figura 77. Discriminación previa, lengua potenciométrica.

En la Figura 77 se pueden distinguir algunos puntos interesantes, como la diferencia entre los potenciales de las membranas 6-7 que para las muestras de color morado presenta una disminución (más notable para la muestra semidesnatada) y para el resto de las muestras un aumento, dándose la mayor diferencia en la muestra desnatada, que por otra parte es la de menor contenido graso.

En la membrana 11 las muestras de identificadas en morado (Lauki entera y semidesnatada) presentan un valle mientras que las demás presentan mayor linealidad, además esta depresión es más notable en el caso de la leche semidesnatada, esto podría ser una característica específica de esta marca.

Si se comparan las membranas 15-16 se aprecia que el valor de potencial más alto se encuentra en la muestra desnatada y el menor en la muestra verde claro (Asturiana entera).

Para el análisis estadístico mediante LDA se utiliza la numeración propuesta en la Tabla 27:

Numeración	Muestra
1	Lauki, semidesnatada
2	Lauki, entera
3	Asturiana, semidesnatada
4	Asturiana, entera
5	Mercadona, entera
6	Día, desnatada

Tabla 27. Numeración de las muestras para discriminación previa.

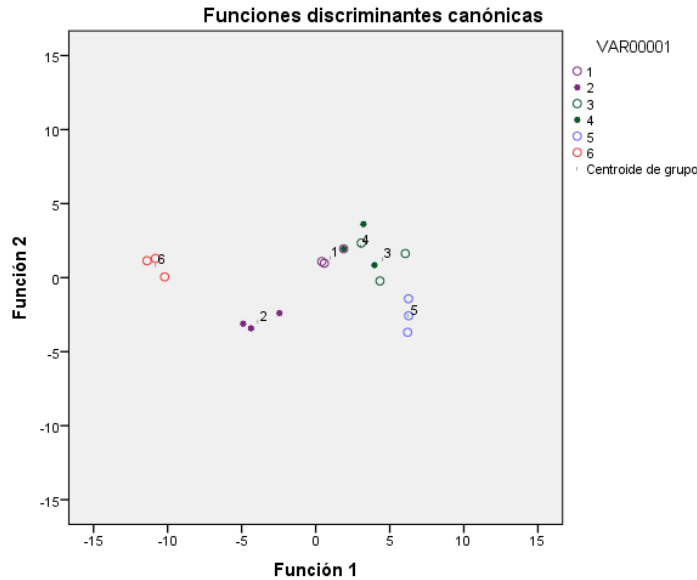


Figura 78. Discriminación previa leches.

En la Figura 78 se aprecia una clara distinción entre la muestra 6 y el resto lo que equivale a decir que la muestra desnatada se diferencia claramente del resto. Se aprecia una mezcla de los datos de la muestra 1, 3 y 4 que indica que existen dificultades para distinguir los productos en función de su marca. Aunque las muestras de la misma marca aparecen muy próximas entre sí.

Existe además una dispersión relativamente alta para todas las muestras, excepto para la número 1 que es significativamente más baja que para el resto. Los resultados nos indican que la lengua potenciométrica es viable para el estudio anteriormente realizado con la lengua voltamétrica.

4.2.3. Aplicación de la lengua potenciométrica a leches

a) *Discriminación*

Tras realizar esta discriminación previa con la lengua potenciométrica, se procede a analizar las muestras especificadas con anterioridad (Tabla 12) todas ellas de la misma marca, pero de dos contenidos grasos distintos, y con las especificaciones de sin lactosa, con calcio y con ácido fólico.

Para ello se procederá primero con una comparativa visual de los datos potenciométricos y posteriormente se realizará el tratamiento estadístico, empezando por las muestras de leche entera, después las semidesnatadas y finalmente, sólo para el tratamiento estadístico, de forma conjunta de las ocho leches analizadas.

Dentro de cada apartado se comenzará con el análisis de las muestras recién abiertas (Día 0) y posteriormente se analizarán las muestras ya envejecidas (Día 7), para ello se miden 7 días después de abiertas con el objeto de conocer si el envejecimiento es también detectable con la lengua potenciométrica.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se utilizará la numeración de la siguiente tabla para las discriminaciones parciales:

Numeración	Muestra
1	Normal
2	Sin lactosa
3	Calcio
4	Fólico B

Tabla 28. Numeración LDA, muestras potenciometría.

A continuación, se define la numeración utilizada en el caso de discriminación conjunta (Enteras y semidesnatadas):

Numeración	Muestra
1	Entera normal
2	Entera sin lactosa
3	Entera con calcio
4	Entera fólico B
5	Semidesnatada normal
6	Semidesnatada sin lactosa
7	Semidesnatada con calcio
8	Semidesnatada fólico B

Tabla 29. Numeración LDA, envejecidas conjuntas.

I Leches enteras

➤ Día 0:

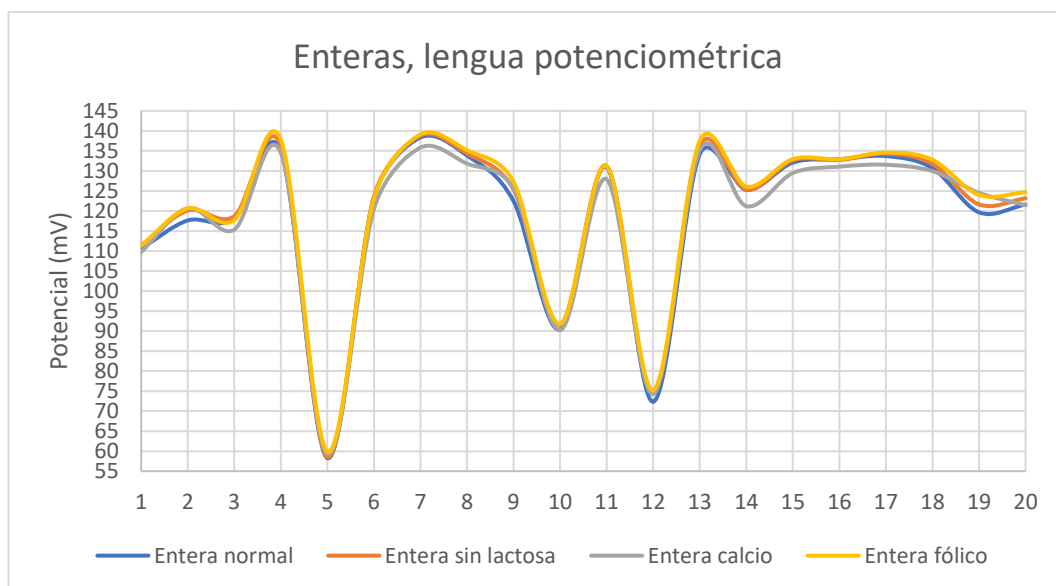


Figura 79. Leches enteras, lengua potenciométrica.

En la Figura 79 se aprecian algunos puntos de interés que permiten discriminar las diferentes muestras, por ejemplo:

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

La leche entera normal (línea azul) es la que muestra claramente en la membrana 2 el menor valor de potencial, además entre las membranas 2-3 para esta muestra se presenta un aumento del potencial mientras que para el resto de las muestras se produce una disminución de potencial. En el caso de la membrana 9 también es la leche entera convencional la que experimenta una caída de potencial mayor.

La muestra con calcio presenta el potencial más bajo entre las membranas 14 a 18 siendo especialmente notable en el caso de la membrana 14. Las membranas 19-20 presentan una caída de potencial en este tipo de leche mientras que en el resto se produce un aumento de potencial.

En cuanto a la leche con ácido fólico, los valores de potencial son ligeramente superiores al resto y además en las membranas 15-16 se produce una disminución del potencial para dicha leche y un aumento para el resto de las muestras.

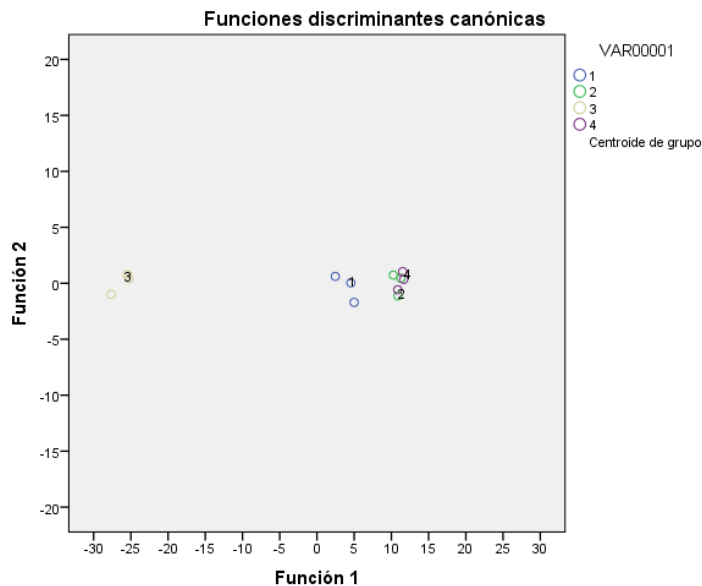


Figura 80. LDA leches enteras (Día 0).

Manteniendo la nomenclatura descrita anteriormente (Tabla 28) se procede a valorar el resultado obtenido mediante LDA para las muestras de tipo leche entera analizadas el día 0, representados en la Figura 80:

Se aprecia una clara distinción de las muestras entera y con calcio (1 y 3) con respecto del resto, mientras que las muestras sin lactosa y con fólico (2 y 4) se encuentran más mezcladas, lo que indica una menor distinción entre ambas.

En general existe una baja dispersión siendo, además, especialmente baja para las muestras con calcio y con fólico.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

➤ Día 7:

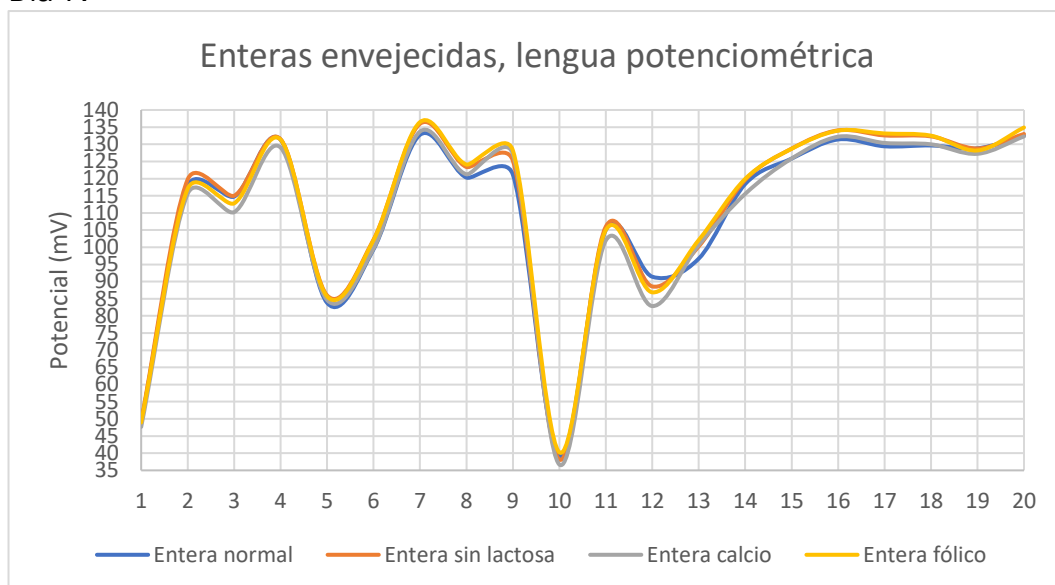


Figura 81. Leches enteras envejecidas, lengua potenciométrica.

Al igual que se observa en las leches recién abiertas, en los envejecidas los potenciales medidos al final del registro siguen siendo diferentes para las cuatro muestras analizadas. En las membranas 8 y 9 se aprecia claramente que la leche normal (línea azul) presenta menor potencial, además la diferencia de potencial entre ambas membranas es significativamente más pequeña para la leche normal y la sin lactosa (Línea naranja). Sin embargo, en las membranas 10 y especialmente en la 12 se aprecia que la leche con calcio (Línea gris) presenta el menor potencial.

La diferencia de potencial entre las membranas 12-13 es considerablemente más pequeña para la leche entera (-5.27mV), siendo su valor aproximadamente un tercio que el correspondiente a la muestra con calcio (presenta la mayor diferencia, -17.84mV).

Entre las membranas 17-18 se produce un aumento del potencial en el caso de la leche normal y una disminución para el resto.

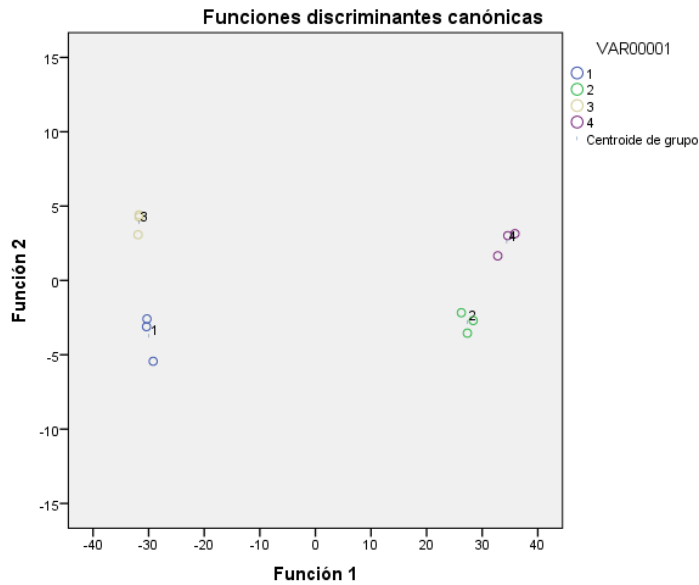


Figura 82. LDA leches enteras envejecidas (Día 7).

El estudio estadístico mediante LDA (Figura 82) revela que en el caso de las muestras envejecidas (Día 7) se aprecia una clara discriminación entre todas las muestras con una pequeña dispersión, especialmente baja para las leches sin lactosa y con calcio (2 y 3). Como en el caso de las muestras recién abiertas, las muestras de tipo entera y con calcio presentan mayores similitudes entre sí que la que presentan las leches con ácido fólico y sin lactosa.

II Leches semidesnatadas

➤ Día 0:

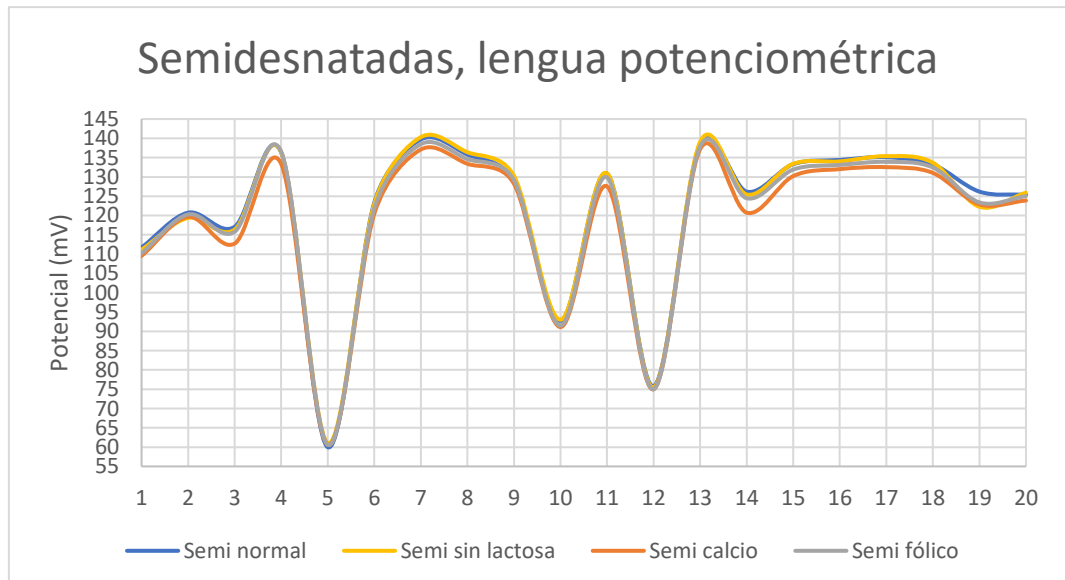


Figura 83. Leches semidesnatadas, lengua potenciométrica.

En la Figura 83 se muestran los potenciales finales registrados en las veinte membranas. Se observa que para la membrana 3 la muestra con calcio

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

presenta el menor potencial, esto ocurre también en la membrana 14 donde también se aprecia que la caída de potencial es mayor que para el resto de las muestras.

En la membrana 19 se observa que el mayor potencial lo presenta la muestra semidesnatada normal, además se produce una bajada de potencial entre las membranas 19-20 mientras que para las demás se produce un aumento.

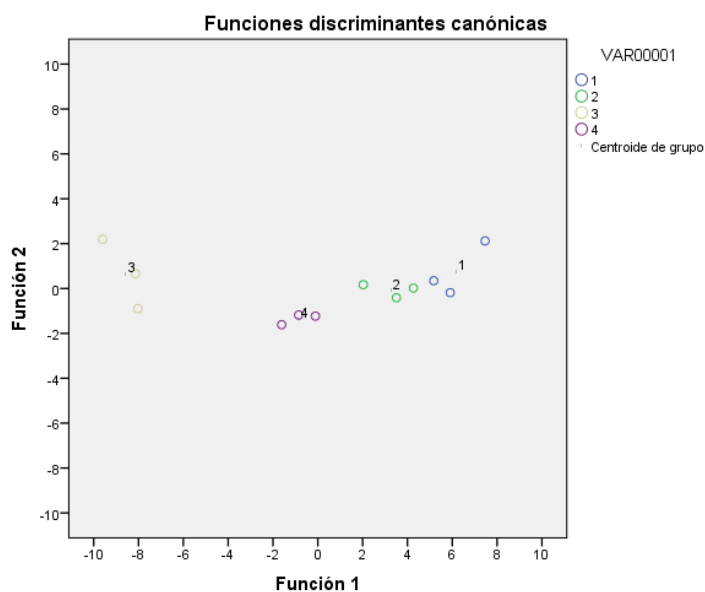


Figura 84. LDA leches semidesnatadas (Día 0).

Analizando el resultado de la LDA (Figura 84) para las muestras semidesnatadas medidas el día 0, se obtiene una buena discriminación entre las muestras con calcio y con ácido fólico y algo peor entre las muestras de tipo normal y sin lactosa. Se observa una mayor dispersión entre las diferentes medidas que en el caso de las leches enteras excepto para la muestra con ácido fólico, siendo especialmente notable para normal y con calcio.

➤ Día 7:

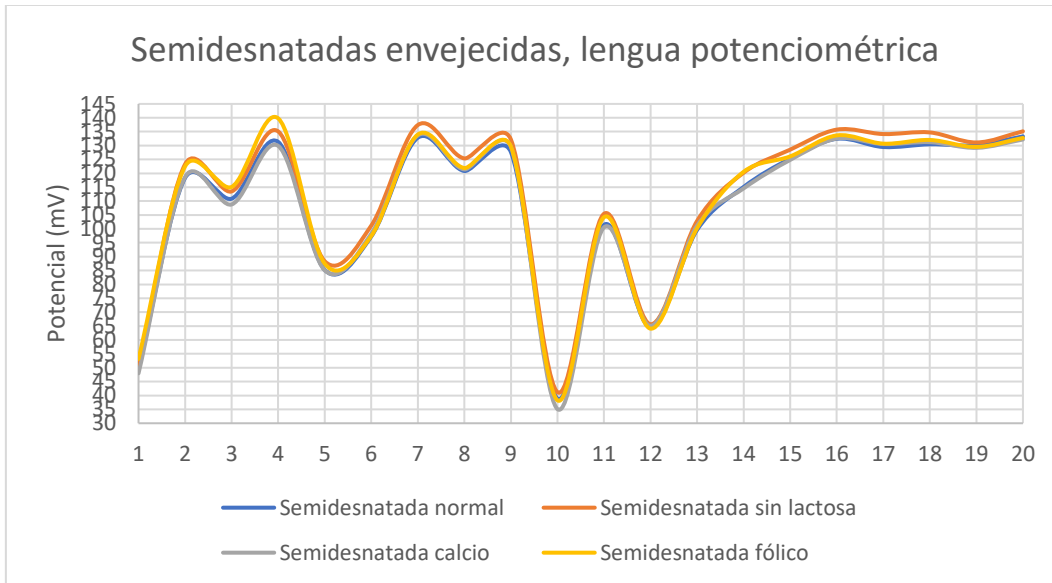


Figura 85. Leches semidesnatadas envejecidas, lengua potenciométrica.

A continuación, se analizarán puntos destacables de la Figura 85 donde se muestra el registro de potencial medio en las leches semidesnatadas envejecidas.

Se aprecia claramente que para las membranas 3, 5 y 10 la muestra con calcio (Línea gris) presenta el menor potencial. También se observa que en la membrana 14 las muestras con calcio y normal (Línea azul) presentan una mayor linealidad que el resto.

Evaluando los datos entre las membranas 18-19 se obtiene una diferencia de potencial muy pequeña para la muestra normal (0.34mV), equivalente a un sexto del siguiente valor (2.04mV), mientras que la mayor diferencia se da en sin lactosa (3.6mV).

También se puede comprobar que las muestras de tipo normal y con calcio presentan los menores potenciales de forma general (En 9 y 10 membranas de las 20 que se utilizan), excepto para la membrana 12 (que corresponde con fólico) todas las demás membranas tienen el menor valor de potencial en una de esas dos. De la misma forma los valores de mayor potencial se encuentran casi exclusivamente en sin lactosa (En 16 de las membranas).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

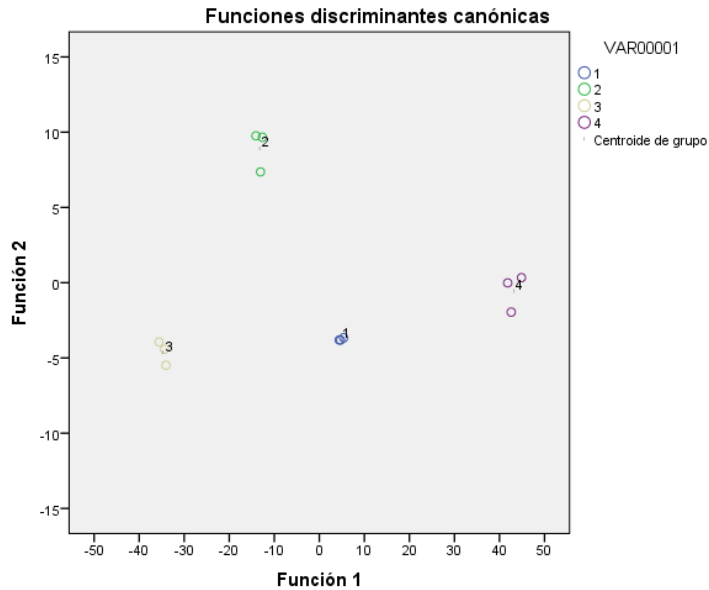


Figura 86. LDA leches semidesnatadas envejecidas (Día 7).

En el tratamiento estadístico de las muestras envejecidas, Figura 86, se obtiene una excelente discriminación, mostrándose las muestras completamente separadas, siendo la dispersión mínima para la muestra 1 (normal). Esto también se observó en el caso de las leches enteras.

III Conjuntas

➤ Día 0:

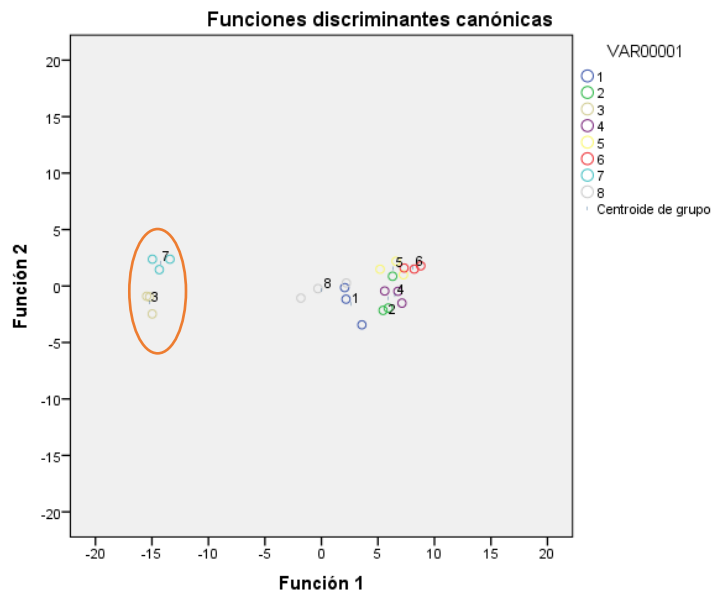


Figura 87. LDA conjunta (Día 0).

Manteniendo la nomenclatura utilizada en la Tabla 29 se procede a valorar el resultado del análisis estadístico obtenido mediante LDA para ambos tipos de muestras enteras y semidesnatadas analizadas el día 0:

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

Se distinguen las muestras con calcio (3 y 7), el resto quedan agrupadas en la misma región espacial. Sin embargo, los tipos normal (1 y 5) y sin lactosa (2 y 6) se encuentran desplazadas de forma similar para entera con respecto a semidesnatada. De lo anterior concluimos que el contenido en calcio es una de las variables a las que es especialmente sensible la lengua potenciométrica.

➤ Día 7:

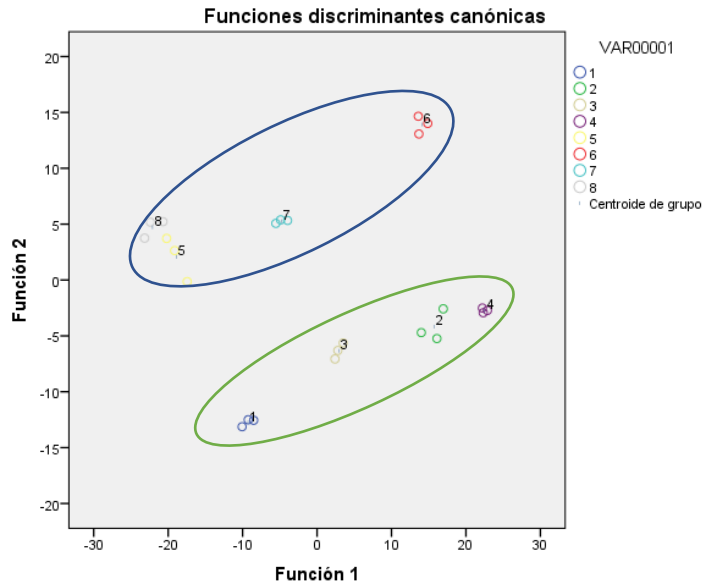


Figura 88. LDA conjunta envejecidas (Día 7).

En la Figura 88, se aprecia una distinción perfecta entre las muestras de tipo entera y semidesnatadas. Exceptuando las muestras con fólico (4 y 8), el resto de las parejas entera-semidesnatada presenta un desplazamiento espacial equivalente. De forma general existe una pequeña dispersión para todas las muestras, que es ligeramente más acusada para el par sin lactosa (2 y 5).

b) Envejecimiento

Para realizar el análisis del envejecimiento, se procederá a discriminar las muestras medidas el día 0 y el día 7. Se utiliza la siguiente nomenclatura para cada tipo de muestra (Entera y semidesnatada):

Numeración	Muestra
1	Normal (Día 0)
2	Sin lactosa (Día 0)
3	Con calcio (Día 0)
4	Fólico B (Día 0)
5	Normal (Día 7)
6	Sin lactosa (Día 7)
7	Con calcio (Día 7)
8	Fólico B (Día 7)

Tabla 30. Numeración LDA envejecimiento.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

I Leches enteras

En este apartado se procederá a analizar el envejecimiento de las muestras de leche entera, comenzando con una evaluación visual de los datos obtenidos mediante potenciometría y continuando con el tratamiento estadístico de dichos datos.

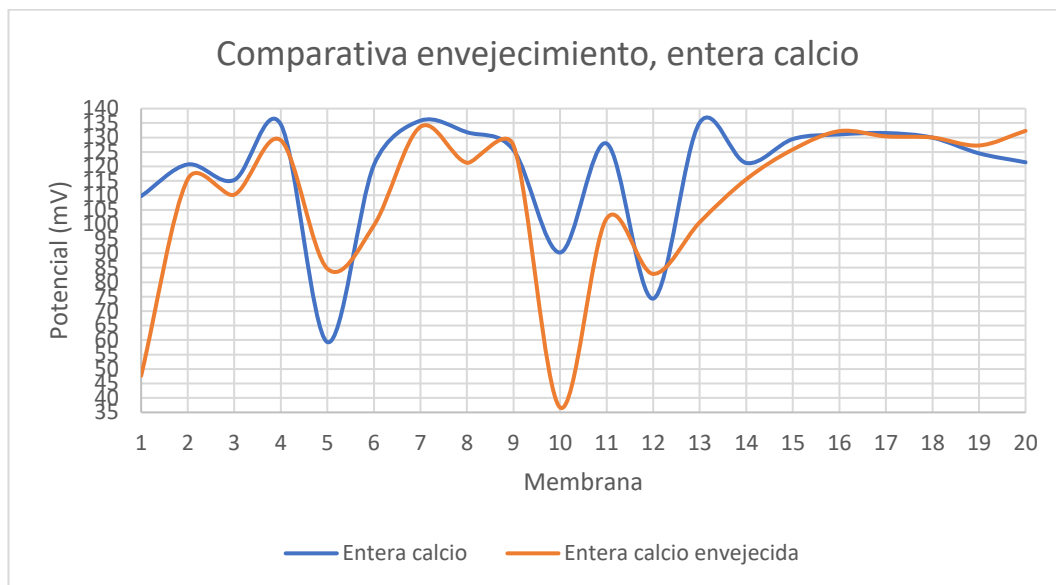


Figura 89. Comparativa del envejecimiento, entera con calcio.

A modo de ejemplo se presentan en la Figura 89 los registros de potencial observados en la leche enriquecida con calcio en función del tiempo, las muestras envejecida (Día 7) y no envejecida (Día 0) registran datos de potencial diferentes en la mayoría de las membranas en función del tiempo, lo que cualitativamente da idea de que la degradación del producto es detectable por la lengua potenciométrica. Por ejemplo, en el caso de la primera membrana se observa una gran diferencia de los valores para la muestra no envejecida (mayor valor, 110mV), que para la envejecida (47.6mV).

También se aprecia que entre las membranas 2-4 se mantiene la misma tendencia entre las dos muestras con un ligero cambio de potencial mientras que entre las membranas 9-11 se mantiene la tendencia, pero hay una clara diferencia en el valor de potencial, siendo mucho menor en la muestra envejecida.

De forma genérica y exceptuando únicamente algunas membranas específicas la muestra no envejecida presenta valores de potencial más altos, además se observa que en determinadas membranas reaccionan de forma contraria, por ejemplo, entre las membranas 8-9 la muestra envejecida aumenta de potencial y la no envejecida disminuye, esto ocurre también para los pares de membranas 13-14 y 19-20, en el caso del par 16-17 sucede lo contrario, la muestra envejecida disminuye su potencial y la no envejecida lo disminuye.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas de interés en la industria láctea

Con los resultados potenciométricos se procedió al estudio estadístico, utilizando la nomenclatura descrita en la Tabla 30 se analizan en la Figura 90 los resultados obtenidos mediante LDA para las muestras enteras medidas en los días 0 y 7.

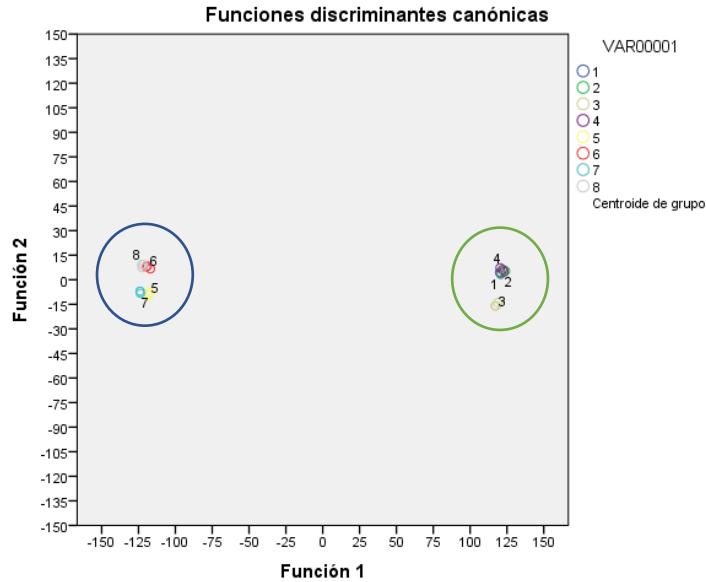


Figura 90. LDA envejecimiento, enteras.

Se produce una acusada distinción entre las muestras envejecidas y no envejecidas, pero la gran diferencia entre los dos grupos no hace posible realizar una discriminación entre los tipos de leche de cada grupo. Apenas existe una leve dispersión en las diferentes medidas. Esto indica fehacientemente que la lengua potenciométrica es muy útil para detectar la degradación de cualquier tipo de leche entera.

II Leches semidesnatadas

En este apartado se procederá de forma equivalente al análisis realizado con las muestras de leche entera envejecidas utilizando muestras de leche semidesnatada (Normal, sin lactosa, con calcio y con ácido fólico).

Se comenzará con un análisis visual comparativo del envejecimiento y después se procederá con el tratamiento estadístico de los datos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

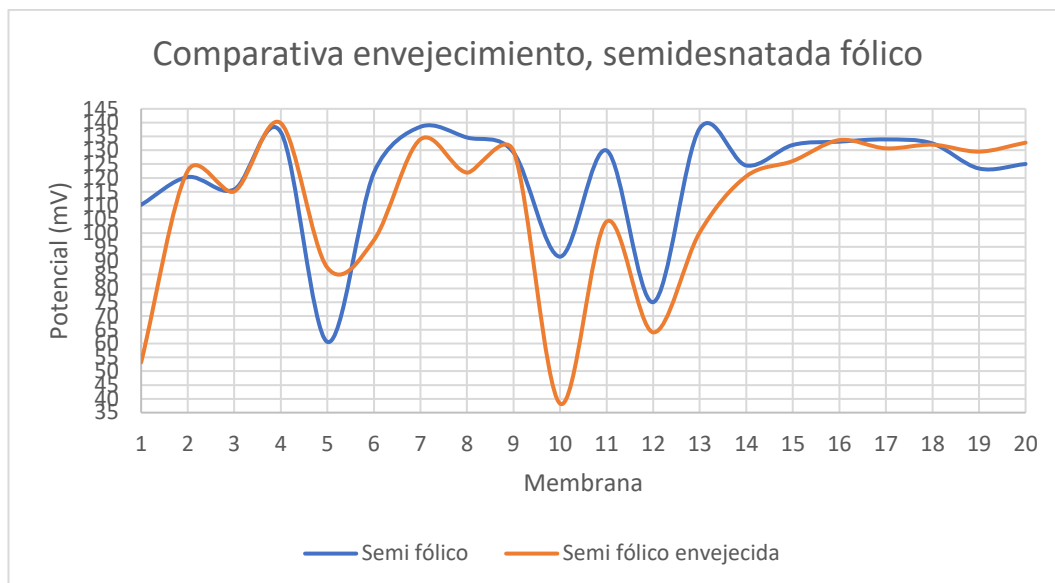


Figura 91. Comparativa del envejecimiento, semidesnatada fóllico B.

La Figura 91 muestra a modo de ejemplo los cambios de potencial final registrados en la muestra semidesnatada con ácido fóllico B añadido y se procederá de la misma forma que se hizo para el caso de las leches enteras.

En este caso no se puede afirmar que de forma genérica el envejecimiento provoque una disminución o aumento neto de los potenciales en todas las membranas, sino que de manera análoga a lo que ocurría con las muestras de tipo entero, se registran valores más altos o más bajos en función del tipo de sensor, pero en cualquier caso se observan diferencias significativas que indican la capacidad del sistema para detectar el efecto del tiempo. Esto se da, por ejemplo, entre las membranas 8-9 y 13-14 donde se produce un descenso de potencial para la muestra no envejecida y entre las membranas 16-17 donde se produce un aumento. Se mantiene la tendencia de potencial para los grupos de membranas de 2 a 5, pero con mayor potencial en la muestra envejecida, y lo mismo ocurre para las membranas 9-13, en este caso con menor potencial.

Es destacable que en este caso existe una disminución del potencial para las muestras no envejecidas entre las membranas 17-18 y que en el caso de las membranas 19-20 ambas muestras presentan un aumento de potencial, manteniéndose el mayor valor para la muestra envejecida.

De forma equivalente se observa que para la membrana 1 la muestra envejecida tiene un potencial claramente inferior a la no envejecida (53mV frente a 110mV); esto también se ha observado en otro tipo de leches semidesnatadas y en las leches enteras.

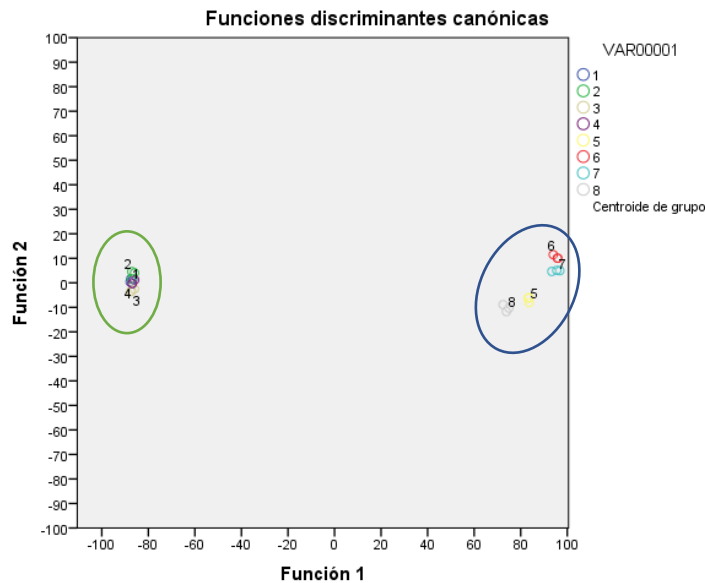


Figura 92. LDA envejecimiento, semidesnatadas.

El análisis estadístico realizado sobre las muestras semidesnatadas (Figura 92), en el que se ha utilizado la nomenclatura anterior, se aprecia que al igual que ocurría con la discriminación mediante LDA para las muestras de tipo entero, la distinción entre muestras envejecidas y no envejecidas es notablemente clara, como también ocurría en las leches enteras ello impide realizar una separación nítida entre los diferentes tipos de cada una de ellas. Se mantiene una pequeña dispersión para las diferentes medidas que no es significativa.

Finalmente, comparando la Figura 90 con la Figura 92, se intuye un desplazamiento entre los dos grupos de muestras hacia una región espacial más compacta tanto para la leche entera como para las leches semidesnatadas.

c) Correlaciones

Una vez se ha comprobado, gracias al análisis quimiométrico realizado, que es posible la discriminación de las muestras lácteas y también detectar el efecto del tiempo, se procede con el tratamiento estadístico mediante MLR para ambos conjuntos de muestras y los datos químicos del suministrador para establecer las oportunas correlaciones, para en una segunda fase utilizar estas correlaciones para poder crear un modelo de predicción.

A continuación, en las siguientes figuras (Figura 93 - Figura 98) se exponen algunos ejemplos para los dos tipos de leches enteras y semidesnatadas de las correlaciones obtenidas entre los datos de potencial de la lengua potenciométrica con algunas de las variables químicas más características de este producto. En azul se muestran los datos del estudio de calibración y en rojo los obtenidos en el modelo de predicción. Los datos de todas las correlaciones en calibración y en predicción se recogen en Tabla 31 y Tabla 32.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

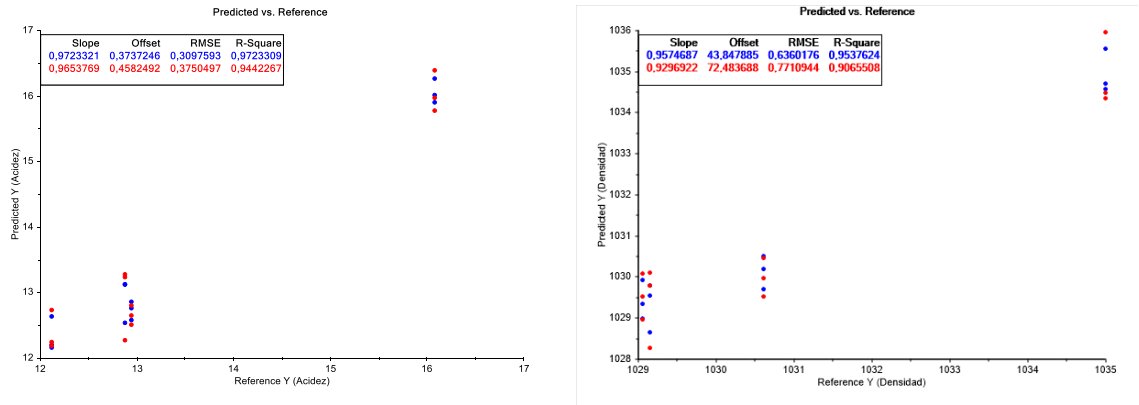


Figura 93. MLR leche entera, acidez y densidad.

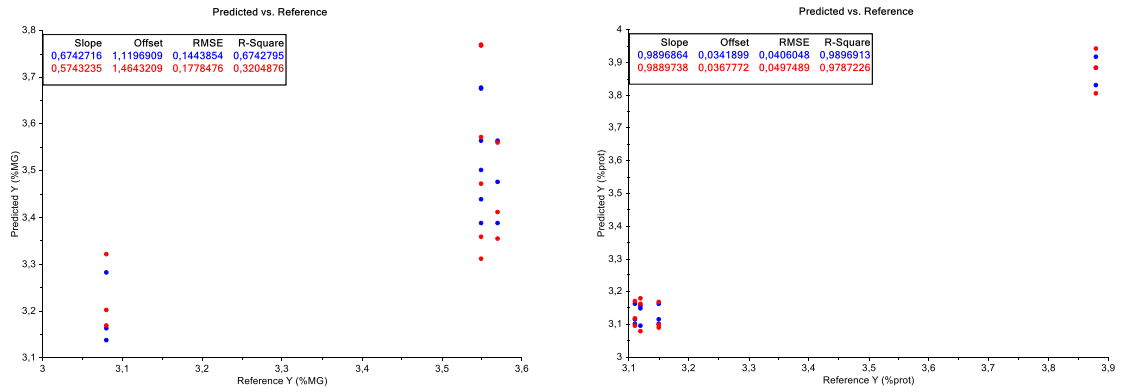


Figura 94. MLR leche entera, %MG y %proteína.

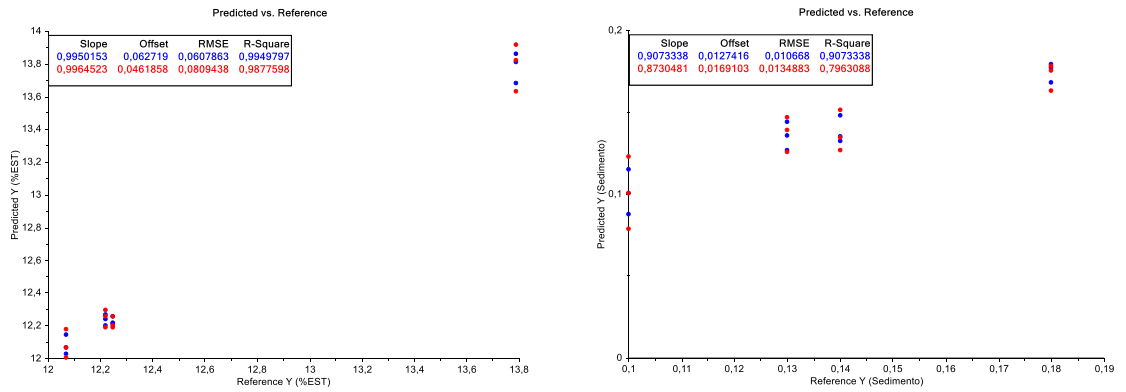


Figura 95. MLR leche entera, %EST y sedimento.

Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea

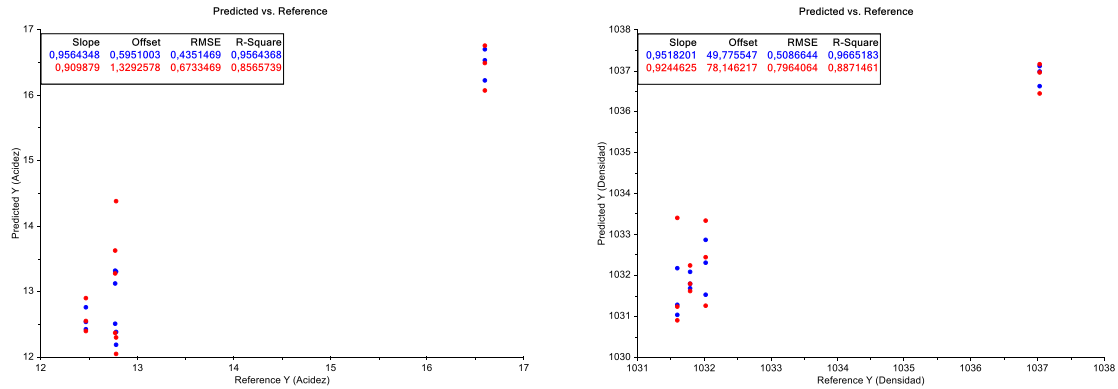


Figura 96. MLR leche semidesnatada, acidez y densidad.

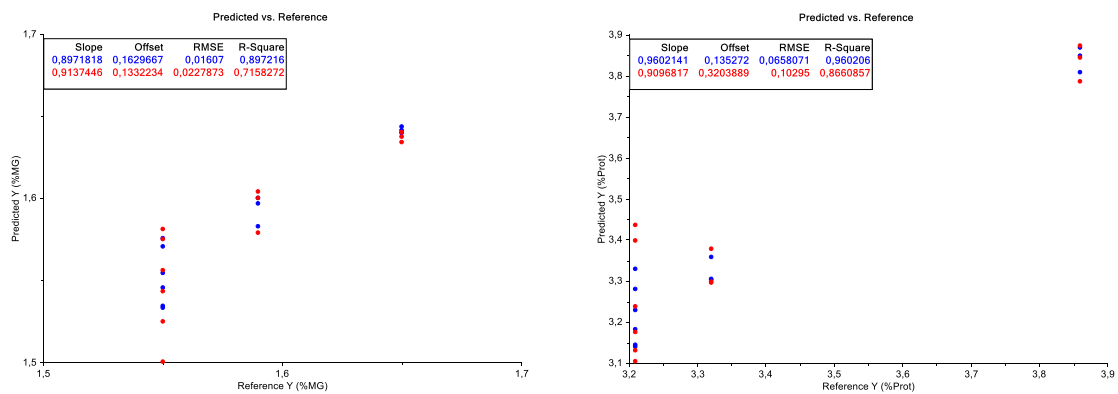


Figura 97. MLR leche semidesnatada, %MG y %proteína.

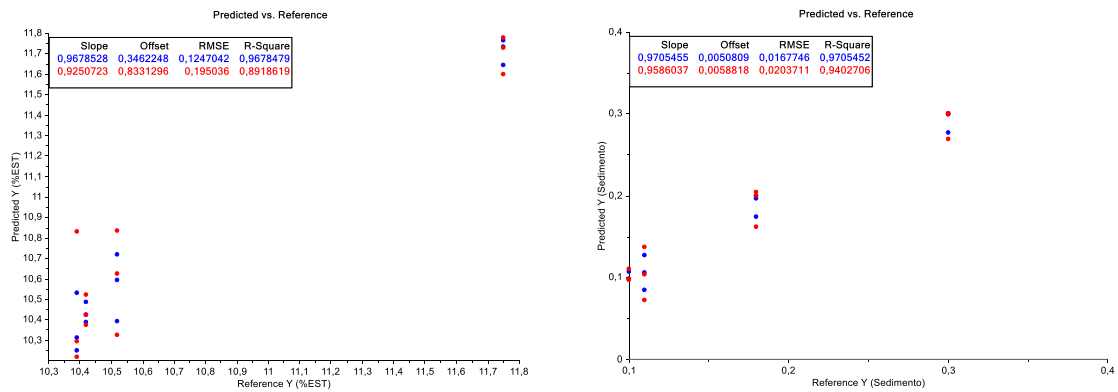


Figura 98. MLR leche semidesnatada, %EST y sedimento.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Parámetro	R ² _c	RMSE _c	R ² _p	RMSE _p
Acidez	0,9723	0,3098	0,9442	0,3750
Densidad	0,9538	0,6360	0,9066	0,7711
%MG	0,6743	0,1444	0,3205	0,1778
%Prot	0,9897	0,0406	0,9787	0,0497
%EST	0,9950	0,0608	0,9878	0,0809
Sedimento	0,9073	0,0107	0,7963	0,0135

Tabla 31. MLR muestras analizadas, leche entera.

Parámetro	R ² _c	RMSE _c	R ² _p	RMSE _p
Acidez	0,9564	0,4351	0,8566	0,6733
Densidad	0,9665	0,5087	0,8871	0,7964
%MG	0,8972	0,0161	0,7158	0,0228
%Prot	0,9602	0,0658	0,8661	0,1030
%EST	0,9678	0,1247	0,8919	0,1950
Sedimento	0,9705	0,0168	0,9403	0,0204

Tabla 32. MLR muestras analizadas, leche semidesnatada.

De forma general se puede concluir que se obtiene una buena correlación en la calibración, con valores de ajuste elevados y errores bajos, en el caso del modelo de predicción los errores son usualmente más elevados para ambos grupos de muestras, ligeramente mejores en el caso de las muestras de leche entera.

Resultan destacables algunos datos aislados que se apartan de este buen comportamiento general como por ejemplo en el porcentaje de materia grasa, especialmente notable para la leche entera cuyo R² es inferior a 0.70 (tanto en calibración como en predicción) lo cual denota una peor correlación con los datos químicos que en el resto de las variables químicas, pero en el caso de leche semidesnatada la correlación si es mucho mejor. También para ambos tipos de muestra los valores del ajuste RSME son más bajos especialmente en el caso del sedimento y el porcentaje de proteínas. Al margen de ello podemos concluir un buen funcionamiento de nuestro sistema de lengua potenciométrica y su adecuado uso para la detección de muestras lácteas.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

5.1. Conclusiones

- Los dos sistemas, lengua potenciométrica y voltamétrica, nos permiten obtener resultados diferentes en los distintos tipos de leches con y sin aditivos y tras su envejecimiento.
- Ambos sistemas ofrecen buenas discriminaciones y buenas correlaciones con los datos químicos.
- Ambas metodologías son sencillas, baratas y fáciles de manejar para el sector lácteo.
- El tratamiento de datos es más sencillo en el caso de la lengua voltamétrica y su implementación se realizaría más fácilmente que la de la lengua potenciométrica.
- En el caso de la lengua potenciométrica y al disponer de una amplia variedad de membranas existe la posibilidad de adecuar la combinación al tipo de muestras que se van a analizar.
- La lengua potenciométrica ofrece mayor versatilidad y por tanto la posibilidad de obtener más información sobre una mayor variedad de productos.
- La lengua potenciométrica nos permite realizar cuarenta medidas simultáneamente con un tiempo de análisis muy corto, unos minutos.

5.2. Ventajas e inconvenientes

5.2.1. Lengua voltamétrica

- Ventajas:
 - Su fabricación es relativamente simple.
 - Los materiales necesarios son de bajo coste.
 - El sistema de medida es conocido y fácil de usar.
 - Son reutilizables.
 - El tratamiento estadístico de los datos obtenidos es sencillo.
 - Aporta bastante información, especialmente si se usan varias modificaciones diferentes en conjunto.
 - Pueden convertirse en biosensores mediante la deposición de enzimas.
- Inconvenientes:
 - Se necesita cierta destreza en la elaboración.
 - La toma de datos es discontinua y requiere de un periodo de medida relativamente largo (Entre 5 y 10min.).
 - Hay que tener cuidado en mantener las relaciones entre sus componentes.

5.2.2. Lengua potenciométrica

- Ventajas:
 - Son reutilizables.
 - Presentan gran cantidad de sensores diferentes, así como posibles combinaciones entre ellos.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

- Las membranas son fáciles de hacer, duraderas y se requiere depositar poca cantidad.
- Si las membranas se estropean pueden volver a depositarse fácilmente.
- Aporta gran cantidad de información.
- La toma de datos puede realizarse de forma continua.
- Inconvenientes:
 - Precisa mucho tiempo de elaboración debido a su complejidad,
 - Tanto la lengua como las membranas requieren de un almacenamiento particular.
 - Algunos de los materiales necesarios pueden ser caros o difíciles de conseguir.
 - La información aportada no es específica.
 - El tratamiento de dicha información puede ser complejo.

5.3. Posibles mejoras

En ambos tipos de lengua electrónica se pueden realizar mejoras, algunas de ellas se comentarán en este apartado.

5.3.1. Lengua voltamétrica

- Algunas posibles mejoras de tipo funcional son:
 - Se pueden realizar modificaciones mediante la adición de pequeñas cantidades de nanopartículas.
 - Se pueden personalizar las enzimas de los biosensores ajustándolas al tipo de muestra a analizar y de los resultados que se quieran obtener.
- Se podrían realizar mejoras de tipo estético, por ejemplo:
 - Se podría utilizar algún tipo de tapa superior que haga más refinado el sensor y que puede evitar que la muestra entre dentro del tubo y estropee el sensor.
 - Se puede introducir un papel o algún otro sistema que tape el cable y embellezca el sensor.

5.3.2. Lengua potenciométrica

- Se podría optimizar el diseño para disminuir el tamaño de la lengua simplemente recolocando la posición de los pocillos.
- Así mismo se podría utilizar un tubo macizo taladrado para evitar filtraciones en la unión con la tapa inferior.
- De igual forma que en la lengua voltamétrica, se podría usar algún tipo de tapa superior para evitar que la muestra entre dentro del tubo.
- Se podrían utilizar enzimas tratando de conseguir una mayor especificidad de las membranas.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 6 **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Universidad de Valladolid, “Sensor Group UVA.” [Online]. Available: <http://www.eis.uva.es/inorganica/index.php/component/content/article/73-grupo-uvasens>. [Accessed: 07-Dec-2018].
- [2] Ministerio de agricultura pesca & alimentación, “Cifras de la industria alimentaria.” [Online]. Available: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/Cifras-de-la-industria-alimentaria/>. [Accessed: 07-Dec-2018].
- [3] Área sectorial del Centro de Predicción Económica (CEPREDE), “Informe economico FIAB,” Madrid, España, 2017.
- [4] Ministerio de agricultura pesca & alimentación, “Informes Lácteos.” [Online]. Available: <https://www.mapa.gob.es/es/megustalaleche/estudios-e-informes/>. [Accessed: 07-Dec-2018].
- [5] M. Valdespino San José, “Diseño y desarrollo de redes de sensores potenciométricos y voltamétricos para su aplicación en vinos,” Universidad de Valladolid, 2019.
- [6] W. Göpel, *Sensors, a comprehensive survey, volume 2, part 1, chemical and biochemical sensors*. VCH, 1992.
- [7] J. G. Ruiz, “Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria,” Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.
- [8] M. C. Horrillo Güemez, “Estudio y realización de sensores para CO basados en la modulación de la conductividad eléctrica del semiconductor SnO₂,” Universidad Complutense de Madrid, 1992.
- [9] M. C. Luna, “Tesis Doctoral Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras,” Universidad de Córdoba, 2008.
- [10] V. Gago Cabezas, Lara; Ruiz Galán, Olga; García Iglesias, Esther y González Rumayor, “Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria,” Madrid, 2005.
- [11] C. Karunakaran, R. Rajkumar, and K. Bhargava, “Introducing to biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, 2015.
- [12] F. G. Bănică, *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2012.
- [13] D. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, S. Cervantes González, and M. B. Anzures, *Principios del Análisis Instrumental*, 5^a. McGraw Hill, 2008.
- [14] R. G. Compton and C. E. Banks, “Understanding voltammetry,” *London Imp. Coll. Press*, 2007.

*Diseño, desarrollo y puesta a punto de lenguas electrónicas voltamétricas
y potenciométricas de interés en la industria láctea*

- [15] R. Chang and K. G. A., *Química*, 11th ed. McGraw-Hill, 2013.
- [16] J. Gonz, “Métodos Experimentales en Electroquímica Volumen II : Métodos Polarográficos y voltamétricos Métodos de Barrido de Potencial,” *Madrid Espaa Cultiv.*, no. October, 2014.
- [17] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *A.J. Bard and L.R. Faulkner. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications . Wiley, 2000. John Wiley & Sons, 2000.*
- [18] Á. Arrieta Almario and O. Fuentes Amín, “Lengua electrónica portátil para el análisis de leche cruda basada en tecnología PSoC (Programmable System on Chip) y Android,” *Ingeniare. Rev. Chil. Ing.*, vol. 24, no. 3, pp. 445–453, Jul. 2016.
- [19] F. Faridbod, M. R. Ganjali, R. Dinarvand, and P. Norouzi, “Developments in the field of conducting and non-conducting polymer based potentiometric membrane sensors for ions over the past decade,” *Sensors*, vol. 8, no. 4, pp. 2331–2412, 2008.
- [20] J. Gallardo, S. Alegret, and M. Del Valle, “Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis,” *Talanta*, vol. 66, no. 5, pp. 1303–1309, Jun. 2005.
- [21] J. Janata, “Principles of chemical sensors.,” *Springer Sci. Bussines media*, 2010.
- [22] Boletín oficial de Estado, “Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.,” Madrid, España, 1967.
- [23] CODEX ALIMENTARIUS, “Leche y Productos Lácteos, segunda edición,” *Codex Aliment. Leche y Prod. lcteos 2a edicin*, pp. 2–265, 2011.
- [24] C. Alais, *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. Barcelona, España: Reverte S.A., 1985.
- [25] C. Shellhorn and V. Valdés, “La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche animal,” Chile, 2010.
- [26] D. Lopez, A. y Barriga, “La leche. Composición y características,” Sevilla, España, 2016.
- [27] J. M. Zavala Pope, “Aspectos Nutricionales Y Aspectos Tecnológicos De La Leche,” Lima, Perú, 2005.
- [28] “Sigma-Aldrich.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>. [Accessed: 07-Dec-2018].
- [29] L. A. Dias, A. M. Peres, A. C. A. Veloso, F. S. Reis, M. Vilas-Boas, and A. A. S. C. Machado, “An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 136, no. 1, pp. 209–217, 2009.
- [30] L. A. Dias, A. M. Peres, M. Vilas-Boas, M. A. Rocha, L. Estevinho, and A.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- A. S. C. Machado, "An electronic tongue for honey classification," *Microchim. Acta*, vol. 163, no. 1-2, pp. 97-102, 2008.
- [31] M. Śliwińska *et al.*, "Discrimination of apple liqueurs (Nalewka) using a voltammetric electronic tongue, UV-Vis and Raman spectroscopy," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 10, 2016.