



Universidad de Valladolid

Diseño y desarrollo de una lengua bioelectrónica potenciométrica modificada con nanomateriales para la industria láctea.

Máster en nanociencia y nanotecnología molecular

Autor: Clara Pérez González

Tutores: Ana Cristina García Cabezón

María Luz Rodríguez Méndez

AGRADECIMIENTOS

El primer agradecimiento tiene que ser para Ana Cristina García Cabezón, mi tutora, y María Luz Rodríguez Méndez, por haberme dado la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Master en su grupo de investigación; por su apoyo y colaboración que han sido fundamentales para la realización de este proyecto.

En segundo lugar, agradecer su ayuda y paciencia a Coral Salvo Comino, siempre dispuesta a ayudarnos a todos en el laboratorio con una sonrisa.

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

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia y amigos, que han compartido conmigo este complicado año. Por su paciencia, comprensión y apoyo en el camino que me ha llevado a la realización de este trabajo.

Muchas gracias a todos.

En última instancia quiero agradecer su colaboración a Calidad Pascual S.L sin la cual este trabajo no se podría haber llevado a cabo.

RESUMEN

El concepto de lengua electrónica se ha desarrollado rápidamente durante los últimos años debido a su gran potencial para discriminar y analizar alimentos y bebidas como tecnologías de detección, que contribuyen en gran medida a la gestión de la calidad. Estos dispositivos se basan en redes de sensores con baja selectividad y alta selectividad cruzada, así como la capacidad de analizar estadísticamente las señales de múltiples sensores.

El objetivo de este trabajo fue construir una lengua electrónica potenciométrica mediante una red de sensores trabajando en paralelo basados en membranas poliméricas cuyas mezclas se aplicaron sobre soportes conductores sólidos de plata-epoxi, para su aplicación en la industria láctea.

Para obtener una matriz de sensores con selectividad cruzada, las membranas se modificaron con nanopartículas de oro. Además, enzimas como la galactosa oxidasa, ureasa y lactato deshidrogenasa se unieron covalentemente a la superficie del PVC para aumentar la selectividad del sensor.

Los resultados obtenidos con la lengua bioelectrónica potenciométrica demostraron que el sistema desarrollado es capaz de detectar compuestos de interés encontrados en la leche (como ácido láctico, galactosa o urea), realizar la clasificación de leches con diferentes características nutricionales y, además, podría ser utilizado como sistema de predicción de los parámetros químicos de futuras muestras de leche.

Palabras clave: lengua electrónica, sensores, biosensores, potencimetría, leche.

ABSTRACT

The concept of electronic tongues has developed rapidly during recent years due to their large potential to discriminate and analyse foods and beverages as sensing technologies that greatly contribute to quality management. They are based on sensor arrays with low selectivity and high cross-selectivity and a capability of statistically analysing the outputs from multiple sensors.

The aim of this work was to construct an all-solid-state potentiometric e-tongue with an array of sensors based on polymeric membranes each working in parallel, in which the polymeric mixtures were applied on solid conducting silver-epoxy supports, to be applied in the dairy industry.

In order to obtain an array of sensors with cross-selectivity, the membranes were modified with gold nanoparticles. In addition, enzymes as galactose oxidase, urease and lactate dehydrogenase were covalent bonded to the PVC surface to increase the selectivity of the sensor.

The results obtained with the potentiometric electronic tongue demonstrated that the system developed is able to detect components of interest found in milk (such as lactic acid, galactose or urea), performing the classification of milk with different nutritional characteristics and, in addition, it could be used as a prediction system for the chemical parameters of future milk samples.

Keywords: electronic tongue, sensors, biosensors, potentiometry, milk.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Justificación del TFM.....	1
1.2 Objetivos	1
2. Fundamento teórico	2
2.1 Leche: composición y tipos	2
2.1.1 Composición química de la leche	2
2.1.2 Propiedades físico-químicas de la leche.....	4
2.1.3 Clasificación de los tipos de leche	6
2.2 Retos de la industria láctea 4.0.....	7
2.3 Lenguas electrónicas.....	9
2.3.1 Sensores utilizados en lenguas electrónicas.....	10
2.3.2 Análisis estadístico de datos multivariantes	15
2.3.3 Nuevos avances en lenguas electrónicas en la industria láctea.....	16
3. Desarrollo experimental	17
3.1 Materiales y reactivos.....	17
3.1.1 Construcción del soporte de la lengua electrónica	17
3.1.2 Elaboración de la lengua bioelectrónica potenciométrica.....	17
3.1.3 Disoluciones patrón utilizadas	19
3.1.4 Muestras de leche analizadas	20
3.2 Procedimiento experimental.....	21
3.2.1 Desarrollo y construcción de la lengua potenciométrica	21
3.2.2 Elaboración de la lengua bioelectrónica potenciométrica.....	23
3.2.3 Adquisición de medidas de la lengua potenciométrica.....	23
4. Resultados experimentales.....	24
4.1 Diseño y caracterización de la lengua electrónica.....	24
4.1.1 Efecto del porcentaje de nanopartículas.....	24
4.1.2 Efecto del tipo de PVC utilizado	26
4.1.3 Efecto de las enzimas utilizadas	27
4.2 Patrones de sabor básicos	29
4.3 Aplicación de la lengua electrónica en leche.....	34
4.3.1 Estudio previo de la lengua electrónica en leche.....	34

4.3.2 Análisis de muestras de leche.....	40
5. Conclusiones	48
6. Bibliografía	50

1. Introducción

1.1 Justificación del TFM

El sector lácteo dentro de la industria agroalimentaria facturó en 2019 alrededor de 9500 millones de euros, lo que supone un 2% de la producción industrial de todo el país, convirtiéndola en uno de los pilares de la industria agroalimentaria en España. La producción del sector se centra principalmente en leche de vaca y se produce principalmente en las comunidades autónomas de Galicia, Asturias y Castilla y León, con una producción aproximada de 7.6 millones de toneladas de productos lácteos al año.

Debido a la gran producción existente, el control de los parámetros de calidad y sabor óptimos de los diferentes productos lácteos se establece mediante una legislación cada vez más estricta, ello es consecuencia del interés por proteger al consumidor final de fraudes y/o intoxicaciones, lo que supone un reto constante en el desarrollo de técnicas rápidas y fiables para el control de calidad de los productos ofrecidos al consumidor. Así mismo, la llegada de la industria 4.0 supone nuevos retos en la digitalización de los datos de producción, el análisis de la información de la industria láctea y la adaptación de los sistemas tradicionales a estas nuevas tendencias.

El grupo de investigación UvaSens, un equipo multidisciplinar con sede en la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid dirigido por la profesora María Luz Rodríguez Méndez del Departamento de Química Física y Química Inorgánica, ha desarrollado en los últimos años nuevos materiales y métodos de análisis basados en sensores electroquímicos, especializándose 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 sobre el diseño, preparación y caracterización de películas nanoestructuradas para su posible aplicación como sensores; y una línea de investigación aplicada, dedicada a diseñar redes de sensores especializados en el ámbito del análisis y control de calidad en la industria alimentaria, como por ejemplo en el análisis de vinos y mostos, y recientemente en el análisis de productos lácteos mediante la aplicación de leguas electrónicas.

1.2 Objetivos

El objetivo principal que se persigue en la realización de este Trabajo de Fin de Master es el diseño, desarrollo y optimización de una lengua electrónica biopotenciométrica modificada con nanopartículas; y su aplicación en el análisis rápido y sencillo de muestras de leche con diferente contenido nutricional.

Para conseguir este objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Construcción de una lengua electrónica potenciométrica basada en membranas selectivas a iones modificadas mediante la adición de nanopartículas.
- Modificación de la lengua potenciométrica con enzimas para el desarrollo de una lengua biopotenciométrica de mayor especificidad.
- Acondicionamiento y calibrado de la lengua bio-electrónica desarrollada.

- Estudio de la capacidad de la lengua electrónica para distinguir entre los diferentes sabores básicos (salado, dulce, amargo y ácido) mediante el análisis de disoluciones patrón.
- Estudio de la capacidad de la lengua para distinguir entre diferentes muestras de leche de vaca con diferente contenido nutricional (clásica, sin lactosa, enriquecida en calcio, con ácido fólico y proactiva).
- Aplicación de análisis estadístico multivariante a los datos potenciométricos obtenidos en los análisis de las diferentes muestras, para el desarrollo de un sistema capaz de predecir correlaciones entre los datos químicos obtenidos por métodos tradicionales y los datos obtenidos con la lengua electrónica con el fin último de llegar a predecir todos estos valores químicos a partir de una medida única con la lengua electrónica.

2. Fundamento teórico

2.1 Leche: composición y tipos

El Código Alimentario Español define la leche natural como “el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas”. Además, se especifica que la denominación genérica de leche comprende única y exclusivamente la leche natural de vaca. Las leches producidas por otras hembras de animales domésticos (cabras, ovejas...) se deben designar indicando además el nombre de la especie correspondiente [1].

La leche de vaca es un fluido heterogéneo compuesto de una emulsión de materia grasa, en un líquido que así mismo es una suspensión de materias proteicas, con un suero constituido por azúcares y sales propios de la leche. Debido a la gran variedad de nutrientes que posee, los cuales se encuentran en proporciones equilibradas, se considera un alimento completo que aporta grandes beneficios para la salud humana [2].

2.1.1 Composición química de la leche

La composición de la leche varía en función de factores como la especie y raza animal, la alimentación y el momento del ordeño, entre otros. Se trata de un alimento líquido, con un aporte energético considerable de aproximadamente 65 kcal por cada 100 g de producto, cuyo componente mayoritario es el agua y en el que coexisten en equilibrio gran variedad de componentes [3].

La Tabla 1 muestra los valores de referencia de la composición de la leche de vaca.

Tabla 1: Composición básica de la leche de vaca.

Componentes	Contenido (%)
Agua	83.5
Proteínas	3.2
Grasas	3.6
Hidratos de carbono	4.7
Caseína	2.6
Albúminas	0.6
Cenizas	0.7

Por tanto, podemos considerar la leche como una emulsión de materia grasa en la cual se encuentran en suspensión proteínas, azúcares, principalmente lactosa, vitaminas y sales minerales. Todos estos componentes son considerados de interés en la alimentación humana, las proteínas que aporta la leche de vaca como complemento a la alimentación de un ser humano poseen una elevada digestibilidad y presentan una composición de aminoácidos equilibrada y esencial para el correcto crecimiento y desarrollo de un ser humano [2]. A continuación se describen los principales componentes de la leche [2-4]:

- **Proteínas:** la leche de vaca contiene entre un 3 y un 3,5% de proteínas, de las cuales la fracción caseínica es la mayoritaria, representando el 80% del total de proteínas. En la leche se encuentran cuatro tipos de caseína: la alfa, beta, kappa y gamma; que se encuentran en suspensión formando micelas. Entre ellas, la kappa caseína es la que posee mayor importancia pues se encuentra relacionada con la formación y estabilización de las micelas, que se caracterizan por precipitar o coagular a pH inferior a 4,6. El 20% restante estaría compuesto por proteínas solubles del lacto suero, entre las que se incluyen lacto albúminas, lacto globulinas, ser albúminas e inmunoglobulinas.

Por otra parte, en la leche también podemos encontrar diferentes enzimas como la fosfatasa alcalina, proteasas, lactasas, lisozima y catalasas. Existen diferentes orígenes para estas enzimas, siendo las principales fuentes la propia leche o distintos microorganismos que pueden entrar en contacto durante el periodo de ordeño o durante la manipulación del producto.

- **Hidratos de carbono:** la lactosa o azúcar de la leche es el hidrato de carbono mayoritario y su contenido se sitúa entre el 4 y el 5%. Consiste en un disacárido formado por una molécula de glucosa y una molécula de galactosa. No solo aporta sabor dulce a la leche sino que además puede ser fermentada por medio de la fermentación ácido láctica, responsable de la coagulación ácida de la leche que da lugar a gran número de derivados lácteos.

- **Grasas:** la leche entera tiene entre 3,5 y un 4% de grasa, observándose mayores concentraciones en la leche de cabra, oveja y búfala respecto de la leche de vaca. La grasa láctica se encuentra emulsionada constituyendo glóbulos lipídicos compuestos en un 98% por triglicéridos, responsables del sabor de algunos derivados de la leche, y en menor cantidad por fosfolípidos. Cuando esta emulsión se rompe, debido a su menor densidad, los glóbulos de grasa ascienden espontáneamente y se sitúan en la superficie, constituyendo lo que se conoce como crema o nata.

- **Vitaminas:** en la leche se encuentran prácticamente todas las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, destacando las vitaminas B1, B2, niacina, B12 y otras del complejo B, así como en menor medida la vitamina C. Las vitaminas liposolubles A y D están representadas en la grasa láctea. Las vitaminas, aunque en cantidades reducidas, poseen un alto interés biológico ya que son necesarias para el correcto rendimiento de los procesos vitales.

- **Minerales y elementos traza.** La concentración de estos compuestos es bastante estable, situándose en torno al 0,75% encontrándose la mayoría en complejos formados con la caseína o disueltas en el suero de la leche. Hay que destacar el alto contenido en calcio (120 mg/100 g en

leche de vaca) y el fósforo. Sin embargo, los elementos traza están en muy baja proporción en la leche como es el caso del magnesio y el hierro.

2.1.2 Propiedades físico-químicas de la leche

Los principales parámetros fisicoquímicos de la leche de vaca son los siguientes [3]:

- Punto de congelación. Debido a la presencia de sustancias disueltas el punto de congelación de la leche se encuentra ligeramente por debajo de 0°C encontrándose entre los -0,53 y -0,57°C.
- Punto de ebullición. Al igual que el punto de congelación, debido a la presencia de azúcares y minerales disueltos en la leche, el punto de ebullición es superior al del agua y se sitúa en 100,17°C a nivel del mar.
- Densidad. No presenta un valor constante puesto que depende de la concentración de sólidos disueltos, el contenido graso y la temperatura. No obstante se considera que su valor habitual se encuentra entre 1,0231 y 1,039 g/ml.
- Viscosidad. Es superior a la del agua debido a la materia grasa globular. Su valor general a temperatura ambiente es de 2.2cp y disminuye según se aumenta la temperatura.
- pH situado entre 6,6 y 6,71 en función de la temperatura.
- Apariencia. La leche es un líquido opaco y blanquecino debido a la organización de las caseínas en micelas.
- Conductividad eléctrica. Varía en función de la cantidad de agua presente y la acidez pero su valor medio ronda los 45×10^{-4} S/m.

Los laboratorios de análisis de leche y de productos lácteos utilizan diferentes técnicas para determinar los parámetros que deben cumplir estos productos antes de llegar al consumidor. Los análisis obligatorios para la leche están establecidos por el Real Decreto 1728/2007 por el cual se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo. Esta normativa fue modificada en el Real Decreto 217/2004 por el que se regula la identificación y registro de los agentes establecimientos y contenedores, que intervienen en el sector lácteo y el registro de los movimientos de la leche [5].

Estos análisis incluyen la determinación del punto crioscópico, del contenido en materia grasa, proteínas y lactosa, así como el extracto seco magro, el recuento de células somáticas y colonias bacterianas a 30°C y la presencia de antibióticos. Por otro lado también se puede incluir de forma individual la determinación de la acidez en la leche (Tabla 2).

Tabla 2: Parámetros analíticos convencionales en leche de vaca [5].

Parámetro	Leche de vaca
Materia grasa	≥3% en peso
Proteínas	≥3.2% en peso
Lactosa	≥4.2% en peso
Extracto seco magro (ESM)	≥8.2% en peso
Acidez	14-18 °D
Células somáticas	<400000 por ml
Colonias de gérmenes a 30°C	<100000 UFC/ml

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

Determinación del punto crioscópico. Este parámetro evalúa la cantidad de agua presente en la leche, se considera un parámetro físico de gran interés que se determina comparando el punto de congelación de la leche respecto al punto de congelación del agua como referencia. La diferencia entre la curva de congelación del agua y de la leche se denominan descenso crioscópico y es directamente proporcional a la concentración de soluto presente en la leche, lo que permite determinar si se han realizado diluciones del producto en agua [6].

Determinación de la materia grasa. Para su determinación se debe separar la grasa del resto de componentes de la leche mediante la rotura de la forma globular o por extracción de la grasa láctica mediante disolventes. En el proceso de determinación tradicionalmente se utiliza el método volumétrico de Albert, que consiste en medir el volumen de grasa que ha sido separada de la fase acuosa de la leche mediante un proceso de centrifugación de forma precisa y rápida, en el cual se produce en primer lugar la liberación total de la materia grasa por disolución de las proteínas y después se separan mecánicamente por centrifugado [7-8].

Determinación de proteínas en la leche. El contenido proteico de la leche se evalúa en función del porcentaje de nitrógeno en peso. Para la determinación del nitrógeno se utiliza el método Kjeldahl, el cual consiste en adicionar a una muestra de leche ácido sulfúrico en presencia de óxido de mercurio 2, transformando el nitrógeno presente en los compuestos orgánicos en nitrógeno amoniacal. Este amoniaco se libera con la adición de hidróxido sódico, se destila y se recoge sobre ácido bórico. A partir de este dato y con un factor de conversión, se calcula el porcentaje de nitrógeno en peso de la muestra [7-8].

Determinación del extracto seco magro. Se trata de un parámetro que se calcula a partir del valor del extracto seco y el porcentaje de materia grasa. Para obtener el porcentaje de extracto seco se debe pesar una muestra de leche y llevarla a un desecador a temperatura constante. Tras el proceso de desecación se vuelve a pesar y se obtiene el porcentaje de extracto seco [7-8].

Determinación de la acidez. Se utiliza para determinar si la leche se ha conservado de forma correcta y por tanto es apta para su manipulación y transformación de forma industrial. Para ello es necesario homogenizar la muestra de leche y adicionar fenolftaleína, tras lo cual se realiza una valoración ácida mediante adición de sosa. La acidez se expresa en grados Dronic donde un grado Dronic equivale a 0,1 mililitros de sosa. La leche posee naturalmente un carácter ácido debido a su composición, la cual presenta sustancias como el ácido cítrico, anhídrido, carbónico... Los valores establecidos son de entre 14 y 18 grados Dronic, cualquier muestra por debajo o por encima del valor de este intervalo no se considera apta para el consumo [8].

Determinación de las células somáticas. Este parámetro se emplea principalmente para comprobar la existencia de ganado con mastitis. Su valor normal oscila entre 200000 células por mililitro y 400000 células por mililitro; si este valor se encuentra por encima del límite superior indica la presencia de ganado enfermo. Para medir el número de células somáticas se emplean procedimientos de tinción del ADN y posteriormente equipos electrónicos de gran precisión [7].

Determinación de las colonias de gérmenes. A partir de este análisis se evalúa la higiene y el control en el ordeño, así como el correcto almacenamiento y transporte de la leche. Para realizar el recuento de colonias se pueden emplear diferentes técnicas. Tradicionalmente se realiza mediante el recuento en placa, para ello se requiere una muestra de leche refrigerada a 6°C tomada como máximo 24h antes de llevar a cabo el procedimiento. Otra técnica empleada es la citometría de flujo, en la cual un equipo automático de análisis realiza el recuento de colonias [7].

Determinación de presencia de antibióticos o inhibidores. La determinación de estas sustancias se realiza para comprobar la presencia de betalactámicos y tetraciclinas, los cuales convierte la leche en un producto no apto para el consumo humano. La metodología empleada es una cromatografía en papel, en la cual al poner en contacto los reactivos con la muestra de leche se obtienen diferentes coloraciones en función de la presencia o no de sustancias antibióticas [7].

2.1.3 Clasificación de los tipos de leche

Atendiendo al tratamiento que se aplique, las leches naturales se clasifican en: leches higienizadas, certificadas, especiales (concentradas, desnatadas, fermentadas o acidificadas, enriquecidas, con aromas y/o estimulantes añadidos) y conservadas (líquidas, evaporadas, condensadas y en polvo) [1].

La leche higienizada, es la leche natural sometida a un proceso tecnológico autorizado que asegure la destrucción de microorganismos patógenos y alterantes, sin modificación sensible de su naturaleza fisicoquímica, características biológicas y cualidades nutritivas. Según el tratamiento térmico utilizado para su conservación encontramos que la leche puede ser [1]:

- Leche cruda. Es la leche que no se ha sometido a ningún tratamiento térmico.
- Leche UHT. Se somete a una temperatura de entre 130 y 140°C durante un periodo de 25 segundos tras lo cual es enfriada rápidamente a 32°C. Este tipo de leche es la más consumida, se almacena en tetrabrik y se puede conservarse a temperatura ambiente durante periodos de hasta seis meses.
- Leche pasteurizada. En este caso la leche se somete a una temperatura de entre 71 y 72°C durante 15 segundos, destruyendo únicamente los microorganismos patógenos. Al no eliminarse los microorganismos alterantes la vida útil de esta leche es mucho más corta y se debe conservar refrigerada.

Las leches especiales proceden de la leche natural, la cual es sometida a diferentes procedimientos que tienen como fin modificar aspectos de su composición, como pueden ser su contenido graso o su contenido en azúcares. Por lo tanto, en función de su contenido nutricional la clasificación de las leches es la siguiente [1]:

- Leche entera. Es aquella leche que no ha sido modificada químicamente y mantiene su composición característica; es un producto rico en grasas saturadas y suele presentarse generalmente como leche UHT.
- Leche semidesnatada. En este tipo de leche se ha eliminado parte de la materia grasa de dejando como mínimo un 1% en peso de materia grasa. Pese a haber visto reducido su

contenido en grasas conserva la mayor parte de las vitaminas liposolubles y parte de los ácidos grasos.

- Leche desnatada. Es aquella leche en la cual se ha eliminado la mayor parte de la grasa láctica, y que por normativa no puede contener más de un 1 % de materia grasa. Aporta proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales con un bajo valor energético; sin embargo, no posee las vitaminas liposolubles naturales de la leche ya que estas son eliminadas en el proceso y deben ser añadidas de forma artificial.
- Leche sin lactosa. Se trata de un tipo de leche con un menor contenido en lactosa desarrollado para hacer frente a las necesidades de los consumidores con intolerancia a este disacárido. Estos azúcares se someten a un proceso de hidrólisis y se dividen en glucosa y galactosa, azúcares de fácil digestión.
- Leche con Omega 3. Este tipo de leche se caracteriza por haberse producido un cambio en su composición sustituyendo los ácidos grasos saturados por ácidos grasos insaturados omega 3.
- Leches enriquecidas. Durante el procesamiento de la leche, y en especial durante el tratamiento térmico, se pierden nutrientes beneficiosos para la salud humana. Estos nutrientes pueden ser repuestos en una proporción igual o mayor a la presente en la leche de forma natural, dando lugar a leches enriquecidas en diferentes compuestos. La leche puede enriquecerse con fósforo, calcio y vitaminas, siendo obligatorio indicar en el etiquetado el aditivo utilizado [1-2].

Según el estado físico que presente la leche en el momento de su conservación las leches pueden clasificarse también en los siguientes grupos [1]:

- Leche líquida.
- Leche evaporada, en la cual se elimina el 60% del agua en un proceso industrial que conlleva una pasteurización, una homogenización y finalmente una evaporación.
- Leche condensada. En ese caso la leche es concentrada con azúcar, eliminando también parte del agua. Tradicionalmente se utiliza sacarosa y representa entre un 40 y un 50% del producto final.
- Leche en polvo. Se trata de leche deshidratada con un contenido inferior al 5 % en agua. El proceso de obtención conlleva una evaporación hasta una concentración del 50% en sólidos, una posterior deshidratación y por último una granulación del producto obtenido.

Existen multitud de clasificaciones para la leche de consumo humano, algunas de ellos comprenden hasta 9 tipos de leche diferentes. No obstante, la clasificación basada en el contenido nutricional es la más utilizada para leche líquida, al ser aquella que facilita la elección del producto deseado a los consumidores.

2.2 Retos de la industria láctea 4.0

En la actualidad, más de 6.000 millones de personas consumen leche y productos lácteos en el mundo y la mayoría de ellas vive en países desarrollados. De hecho, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), considerando el volumen, la leche líquida es el producto lácteo más consumido en todo el mundo en desarrollo [9].

En España dentro de la industria agroalimentaria el sector lácteo factura alrededor de 13 mil millones de euros al año siendo uno de los pilares principales de la industria alimentaria en España y generando más de 60000 empleos directos en la producción transformación y comercialización de leche y productos lácteos derivados [10].

En los últimos años, ha habido un creciente interés por parte del consumidor en productos que no solo sean aptos para el consumo, sino que además aporten otros beneficios nutricionales garantizando al mismo tiempo su estabilidad y seguridad alimentaria. Este hecho, unido a una legislación cada vez más estricta en materia de calidad alimentaria, ha generado una necesidad en la industria láctea de obtener más información sobre los parámetros del procesado y la calidad de la leche [11].

Tradicionalmente, el control del procesado se realiza controlando los tiempos de los diversos eventos; por lo tanto, se obtiene poca información sobre el estado real de los parámetros de interés [11]. Además, actualmente los métodos de análisis convencionales (cromatografía, espectroscopia...) no son inmediatos y no se pueden realizar in situ, lo que facilitaría a ganaderos, transportistas y trabajadores el análisis de parámetros de interés de forma rápida. La utilización de sistemas transportables y más rápidos proporcionaría información que permitiría asegurar la calidad del producto, e incluso detectar la presencia de posibles adulteraciones o alteraciones en el mismo [12].

Además, la implementación de dispositivos y plataformas interconectadas ha producido un cambio en las expectativas de los consumidores respecto a los productos que adquieren, generando la necesidad de una nueva industria 4.0 conectada mediante la digitalización.

El término de Industria 4.0, la conocida como cuarta revolución industrial, consiste en la introducción de las tecnologías digitales en los procesos de fabricación, con automatización, intercambio de datos, el Big Data, la Inteligencia Artificial... Para lograr objetivos industriales y de fabricación inteligentes mediante la interacción de personas, nuevas tecnologías e innovación [13].

La transformación digital ha adquirido gran importancia al ser la responsable de cambiar la industria tradicional y adaptarla a una industria conectada, con tecnología avanzada, que permitirá pasar de una producción en masa a una producción personalizada [14]. Es por ello, que las industrias continúan evolucionando en respuesta al desafío de garantizar el que los productos se entreguen correctamente, al precio correcto y a la persona adecuada a través de un proceso sofisticado.

El sector lácteo se caracteriza por una alta sensibilidad a los costes y a la producción en serie, al mismo tiempo que los envases innovadores y una creciente variedad de sabores caracterizan las demandas de los consumidores. Para satisfacer tanto los requisitos de la industria como los de los clientes, la digitalización está proporcionando a la industria láctea nuevas formas de optimizar toda la cadena de valor, desde la cadena de producción a la atención al cliente, reduciendo los costes al tiempo que se maximiza la calidad y aumenta la flexibilidad de los procesos [14].

Una de las posibles soluciones para hacer frente a las necesidades de la industria láctea podría ser la aplicación de lenguas electrónicas como sistemas implementados de control de calidad.

2.3 Lenguas electrónicas

Las lenguas electrónicas son dispositivos que tienen como objetivo discriminar y analizar alimentos y bebidas. Son conocidas como tecnologías de detección que contribuyen en gran medida a la gestión de la calidad alimentaria [15]. Se trata de instrumentos analíticos compuestos por un conjunto o red de sensores químicos, los cuales presentan baja especificidad, baja selectividad, alta estabilidad y sensibilidad cruzada, hacia los diferentes componentes de una disolución [16].

El objetivo principal de las lenguas electrónicas es por tanto el análisis cualitativo, como por ejemplo el reconocimiento, la clasificación o la identificación de muestras. La sensibilidad de los sensores junto con un tratamiento estadístico adecuado hace que este instrumento sea ideal en el caso de medidas rápidas y sencillas [17].

El principio de funcionamiento de las lenguas electrónicas se basa en el análisis de propiedades físico químicas y bioquímicas. Para ello, el conjunto de sensores que forman la red traducen estas propiedades a señales de tipo analíticas, lo cual generará una serie de datos que serán recogidos y tratados mediante análisis quimiométricos que proporcionan información para poder discriminar entre las distintas muestras. Los modelos de clasificación pueden construirse utilizando técnicas estadísticas no supervisadas como el análisis por mínimos cuadrados parciales (PCA) o técnicas supervisadas como el análisis discriminante lineal (LDA) y la red neuronal artificial [18].

Estas redes buscan asemejarse al funcionamiento de nuestros sentidos, en concreto al sentido del gusto y por lo tanto se prueban evaluando su capacidad para distinguir entre los diferentes estándares de sabor básicos: dulce, ácido, amargo, salado y umami [16]. Además, como las lenguas electrónicas también se utilizan como elemento de control de calidad de alimentos y bebidas se han desarrollado métodos para determinar la fecha de vencimiento de los alimentos utilizando sistemas de detección del sabor [15].

En comparación con otras metodologías analíticas, este tipo de dispositivos presentan características prácticas interesantes, como menores costes, buena precisión para tamaños razonablemente pequeños del conjunto de datos y fácil adaptabilidad a diferentes condiciones de trabajo gracias a su resistencia y versatilidad a la hora de modificarse para obtener una alta especificidad. Además, reducen el tiempo de análisis respecto de los sistemas de medida tradicionales y permiten realizar mediciones en continuo, facilitando detectar anomalías y corregirlas en poco tiempo [19].

En lo relativo a su desarrollo histórico podemos decir que este tipo de instrumento comenzó a implementarse con el uso de redes de sensores para análisis de metales pesados e iones en la década de 1990 [20]. En 1997 Winqvist y Lundström desarrollaron una lengua electrónica híbrida combinando las tecnologías para medir la potenciometría, la voltamperometría y la conductividad; y utilizando seis tipos diferentes de electrodos metálicos, mediante el análisis de componentes principales (PCA), fueron capaces de discriminar entre distintas muestras de alimentos [21]. Por otra parte, Legin aplicó electrodos selectivos de iones (ISE) basados en vidrio de calcogenuro a una lengua electrónica, y presentó ejemplos de cómo aplicar su sistema al análisis y gestión de calidad de alimentos y bebidas como el vino y agua mineral [22].

2.3.1 Sensores utilizados en lenguas electrónicas

2.3.1.1 Sensores y biosensores químicos

Un sensor químico es un elemento diseñado para detectar de forma selectiva un compuesto de interés en un medio y transformar la señal química detectada en una señal analógica. La forma de detección del compuesto de interés en un sensor químico es mediante la interacción química del sensor con el compuesto [23].

Un sensor está compuesto por una parte encargada de la detección química y por un transductor que transforma la señal química en una señal analógica. En función de cómo se detecta la señal química encontramos distintos tipos de sensores [24-25]:

- Ópticos. Son sensores basados en la detección del cambio de una característica espectroscópica. La determinación de la luminiscencia, absorbancia y reflectancia son las técnicas más utilizadas por este tipo de sensores.
- Piezoeléctricos. Estos sensores se fundamentan en la micro gravimetría, es decir miden los cambios de masa que se produce en la superficie del sensor debido a la interacción de las especies químicas.
- Calorimétricos. Se trata de aquellos sensores que miden el calor de la reacción química que involucra al analito de interés.
- Electroquímicos. Se dividen en diferentes tipos en función del parámetro que es estudiado y las condiciones de trabajo. Entre ellos encontramos los sensores potenciométricos, voltamétricos y amperométricos.

Los sensores voltamétricos, se basan en la medida de los cambios de corriente que se produce sobre el electrodo de trabajo cuando se aplican un potencial variable. Por otra parte los sensores amperométricos se basan en la medida de la intensidad de corriente derivada de la reacción de oxidación o reducción en la superficie del electrodo de trabajo cuando el potencial aplicado es constante. Ambos sistemas utilizan una celda electrocatalítica de tres electrodos: de trabajo, de referencia y el contra electrodo.

Por su parte, los sensores potenciométricos se basan en la medida de las diferencias de potencial que se producen en el electrodo de trabajo a circuito abierto, es decir, cuando no se aplica corriente al sistema.

Los sensores electroquímicos son sencillos, requieren instrumentación de bajo costo y la mayoría de las veces son adecuados para su uso sin pretratamiento de la muestra, incluso cuando esta se encuentra en condiciones que hacen que otras mediciones sean inviables, como por ejemplo en el caso de la espectrofotometría con muestras turbias. Además, permiten realizar mediciones en un amplio rango de concentraciones. Todas estas ventajas convierten a los sensores electroquímicos en sistemas adecuados para un gran número de aplicaciones, como su uso asociados con sistemas de reconocimiento iónico y molecular de naturaleza biológica, es decir biosensores [26].

Los biosensores son un subgrupo de sensores químicos que integran elementos biológicos con transductores físicos. Un biosensor se define generalmente como un sistema de medición que consiste en una sonda con elemento de reconocimiento biológico, a menudo llamado biorreceptor y un transductor. La interacción del analito con el biorreceptor está diseñada para producir un efecto

medido por el transductor que convierte la información en un efecto medible, como por ejemplo una señal eléctrica [27].

Los biorreceptores son una especie molecular biológica (un anticuerpo, una enzima, una proteína o un ácido nucleico) o un sistema biológico vivo (células, tejidos u organismos completos) que utilizan un mecanismo bioquímico para el reconocimiento de una molécula diana. Se utilizan para aumentar la especificidad del sistema al permitir una unión específica entre el analito de interés y el sensor.

Un ejemplo, es el uso de enzimas que actúan específicamente sobre un sustrato dando lugar a un producto, de manera que el resultado del proceso catalítico permita una mejor determinación del analito de interés en la muestra. Las reacciones enzimáticas de productos no iónicos a menudo producen especies iónicas. Por lo tanto, se han desarrollado una amplia variedad de biosensores para la determinación selectiva de muchas sustancias (por ejemplo, urea, glucosa...) utilizando membranas selectivas de iones en combinación con enzimas adecuadas [28].

En el caso de la industria láctea se han desarrollado biosensores para la detección de especies de interés como la urea, uno de los principales indicadores del nivel de higiene del proceso. Un ejemplo, es el estudio de Triyedi que permitió la fabricación de un biosensor potenciométrico sensible a la urea utilizando un electrodo sensible al ion NH_4^+ y mediante la inmovilización de la enzima ureasa (Ure). El biosensor no solo fue capaz de determinar de forma rápida los cambios en las concentraciones de urea en muestras de leche, sino que además exhibió un límite de detección de 2.5×10^{-5} mol/L [29].

Paralelamente, en otros estudios se ha intentado determinar el contenido en ácido láctico de diversas muestras lácteas. Así se ha desarrollado un biosensor electroquímico basado en una membrana selectiva sobre la que se inmovilizó mediante vapores de glutaraldehído la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). El límite de detección del biosensor fue de 17 y 20 μM de ácido láctico, lo que permitió realizar con éxito determinaciones de este compuesto en muestras de yogur líquido [30].

Otro ejemplo fue la utilización de biosensores electroquímicos de tipo amperométrico en la determinación de los principales azúcares presentes en la leche: glucosa, galactosa y lactosa. El sensor fue capaz de detectar glucosa y galactosa utilizando glucosa oxidasa (GOx) y galactosa oxidasa (GaOx), mientras que la lactosa se determinó mediante las enzimas beta-galactosidasa (βGal) y galactosa oxidasa. Los resultados mostraron respuestas similares a las obtenidas con métodos estándares tradicionales, como la espectrofotometría de infrarrojo, pero con una gran reducción del tiempo de análisis [31].

No obstante, el rendimiento de un biosensor depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas, las técnicas de inmovilización del elemento biológico y su concentración en la superficie del electrodo. En el caso de las enzimas, el método de inmovilización de la enzima y la cantidad de enzima inmovilizada están relacionados con muchos factores, como el tipo de grupos funcionales y la capacidad de enlace físico-químico de la superficie del electrodo, lo que puede suponer una limitación en algunos casos [32].

Pese a sus limitaciones, los biosensores representan un enfoque novedoso para la detección simultánea, en tiempo real e in situ de diferentes compuestos de interés. Las muestras requieren un procesamiento mínimo y la detección en tiempo real proporciona información inmediata sobre la

muestra que se está analizando, lo cual a su vez permite tomar medidas correctivas en caso de que tenga lugar algún problema [33].

Existen diferentes tipos de biosensores siendo los electroquímicos los más comunes. En los biosensores electroquímicos la variación en los flujos de electrones conduce a la generación de una señal electroquímica que puede ser de tipo voltamétrico, amperométrico o potenciométrico. Además, poseen una gran versatilidad en sus aplicaciones, desde el monitoreo de los niveles de microorganismos en muestras contaminadas, hasta la detección de glucosa en diferentes sistemas alimenticios [34-35].

2.3.1.2 Sensores potenciométricos

Como se ha visto anteriormente, los sensores potenciométricos se basan en el estudio del potencial eléctrico que presenta la superficie del material del sensor al introducirlo en una solución que contiene iones cuando no existe corriente; es decir, se mide el potencial a circuito abierto. Los iones interactúan con la superficie del sensor y crean un potencial superficial, la intensidad del potencial está relacionada con la concentración de iones en la solución, de manera que se registra la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia debe tener un potencial reproducible y conocido, debe ser fácil de instalar y mantenerse estable con el paso de las pequeñas corrientes [32].

La potenciometría se rige por la ecuación de Nernst [36]:

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

Donde: E=potencial corregido

E_0 = Potencial estándar

n= Número de electrones transferidos

F= Constante de Faraday

Q= coeficiente de reacción

En función de las características que presente el electrodo de trabajo podemos distinguir distintos tipos de sensores.

Los sensores de cristal están compuestos de óxido de silicio, de manera que el intercambio iónico tiene lugar sobre las imperfecciones del cristal. Por otra parte algunos electrodos de trabajo se construyen a partir de sales inorgánicas pocos solubles como por ejemplo la sal de fluoruro de lantano dopada con iones de europio, que se utiliza para determinar el ion fluoruro de forma selectiva [32].

Sin embargo, los electrodos potenciométricos más utilizados son los electrodos selectivos de iones (ISE) con membranas poliméricas que contienen portadores selectivos (ionóforos). Este tipo de sensores se han utilizado ampliamente en la determinación directa de diferentes iones inorgánicos y orgánicos en análisis médicos, ambientales e industriales [37-38]. En comparación con otras técnicas analíticas, los ISE tienen algunas características únicas, como pequeño tamaño, facilidad de operación, portabilidad y bajo coste. En los últimos años, los ISE han avanzado mucho en la

mejora del límite inferior de detección, explotando nuevos materiales de membrana y proponiendo nuevos conceptos de detección [39].

A pesar de sus numerosos usos, la potenciometría presenta un inconveniente bastante importante y es que solo las moléculas/iones cargados pueden ser detectadas directamente. Además, debe tenerse en cuenta que la mayoría de estos sensores potenciométricos se introdujeron para la determinación de iones inorgánicos, y los sensores potenciométricos para aniones orgánicos no se han sido tan estudiados [40]. Para superar estos obstáculos, alguno de los analitos debe experimentar una reacción que produzca un ion en una cantidad proporcional a la concentración del mismo en la muestra. Una de las mejores opciones para llevar a cabo este proceso es la utilización de biosensores que incluyan elementos biológicos en el electrodo de trabajo, como por ejemplo enzimas [33].

2.3.1.3 Sensores biopotenciométricos

Teniendo en cuenta el funcionamiento de los sensores potenciométricos podemos definir los sensores biopotenciométricos como elementos de detección capaces de determinar la variación de la carga iónica a corriente cero debida a la unión/interacción selectiva de un agente biológico en la superficie del electrodo de trabajo respecto del electrodo de referencia [32].

En cuanto a la aplicación de biosensores en dispositivos potenciométricos basados en membranas poliméricas, existen hasta la fecha pocos estudios sobre lenguas electrónicas en las que se incluyan sensores potenciométricos modificados con enzimas inmovilizadas en la superficie de las membranas. Esto es debido a que la unión de enzimas en la superficie hidrofóbica de membranas con una base de PVC plastificada es pobre. No obstante, en este trabajo se ha investigado el uso de PVC funcionalizado, con grupos carboxilo y amino, en la elaboración de membranas poliméricas. La utilización de un material funcionalizado facilitaría la inmovilización enzimática por medio de enlaces covalentes [41-42]. Algunos de los sensores construidos hasta ahora se han destinado a la detección de urea, creatinina, amoníaco, sodio y potasio en fluidos biológicos y algunos alimentos [43].

El primer electrodo biopotenciométrico para la detección de urea utilizó la enzima ureasa y fue fabricado por Guilbault y Montalvo [44] para la estimación de urea a través de su hidrólisis catalizada por enzimas. Posteriormente, se llevaron a cabo amplios estudios sobre el desarrollo de biosensores potenciométricos para la detección de iones de amonio producidos por la reacción enzimática de la ureasa, mediante su inmovilización en una matriz compuesta de alcohol polivinílico-poliacrilamida sintético (PVA-PAA) [45].

Por otra parte, uno de los estudios con lenguas potenciométricas desarrollados por el grupo del profesor Gutiérrez del Instituto de microelectrónica de Barcelona, empleó la enzima ureasa y la enzima creatinina amino hidrolasa en la detección de urea y creatinina. Actualmente el desarrollo de lenguas biopotenciométricas basadas en el empleo de enzimas de interés es uno de los temas más candentes en el campo de la investigación de las lenguas electrónicas [43], campo en el que este trabajo pretende ser una aportación.

2.3.1.4 Sensores y biosensores modificados con nanomateriales

En los últimos años la nanotecnología ha revolucionado el desarrollo de los sensores. Los sensores nanoestructurados o que presentan nanomateriales en su composición, suponen la integración de las ciencias físicas, la ingeniería molecular, la biología, la química y la biotecnología; y poseen un gran potencial para una amplia gama de aplicaciones industriales y domésticas. Entre esas aplicaciones destacan los sensores electroquímicos aplicados al análisis de alimentos, un área de gran interés para la industria agroalimentaria.

El gran interés en los nanomateriales se debe a sus muchas propiedades deseables. El uso de nanomateriales en sensores permite el uso de numerosas tecnologías de transducción de señales en su fabricación. Además, algunos nanomateriales como las nanopartículas tienen numerosas aplicaciones posibles en biosensores. Por ejemplo, se han desarrollado nanopartículas funcionales unidas a moléculas biológicas (péptidos, enzimas, ácidos nucleicos...) para su uso en la detección y amplificación de diversas señales de interés [46].

Es por ello que el comportamiento electroquímico de las nanopartículas y sus posibles aplicaciones reciben cada vez una mayor atención. Las nanopartículas metálicas se definen generalmente como partículas aislables de entre 1 y 100 nm de tamaño; debido a su pequeño tamaño, tales nanopartículas tienen propiedades físicas, electrónicas y químicas que son diferentes de las de los metales de mayor tamaño. La aplicación de nanopartículas metálicas en electrodos selectivos de iones (ISE) es un tema de investigación novedoso, en el que algunos estudios han demostrado la mejora del rendimiento de los sensores tras la incorporación de nanopartículas de oro o nanopartículas de platino [47].

Los nanomateriales han sido introducidos gradualmente en los últimos años en diferentes tipos de sensores químicos, como es el caso de los sensores potenciométricos. Las excepcionales propiedades eléctricas de los nanomateriales los hacen adecuados como contactos sólidos para electrodos selectivos de iones (ISE) y la inmovilización de ionóforos en nanomateriales no solo impide su posible separación de la membrana selectiva, sino que también permite el desarrollo de nuevas membranas de detección [48].

Michalska y sus colaboradores utilizaron nanopartículas de oro como contacto sólido para la detección de iones potasio en el desarrollo de un electrodo ISE en estado sólido [49], el cual mostró como resultado potenciales altamente estables debido a la alta conductividad y lipofilia de las nanopartículas modificadas con tioles alifáticos. Además, otros de sus estudios permitieron sintetizar nanopartículas de oro modificadas con ditizona capaces de actuar como una membrana selectiva en sensores potenciométricos para el ion Cu^{2+} [50].

Por otra parte, las nanopartículas metálicas pueden ser utilizadas para mejorar la cantidad de biomoléculas inmovilizadas en la construcción de sensores gracias a su gran relación superficie-volumen, a su alta actividad de reacción superficial y su fuerte capacidad de adsorción [51]. Además, poseen la capacidad única de promover la transferencia de electrones entre el centro activo de las enzimas y el material por el cual este compuesto el electrodo, mejorando la sensibilidad de los biosensores [48]. Un ejemplo de ello fue el sistema bioelectrocatalítico basado en la deposición directa de nanopartículas de oro sobre el electrodo, lo que permitió un contacto eléctrico altamente eficiente entre la glucosa oxidasa (GOx) y el soporte del electrodo [51]. Por lo tanto, la utilización de nanopartículas en la construcción de redes de sensores podría suponer un gran avance en el diseño y desarrollo de lenguas potenciométricas bioelectrónicas.

2.3.2 Análisis estadístico de datos multivariantes

Los resultados obtenidos con lenguas electrónicas y bioelectrónicas dan lugar a una cantidad de datos muy extensa. Estos datos han de ser tratados estadísticamente con técnicas multivariantes apropiadas que ayuden a disminuir el tamaño del conjunto de datos sin perder información en el proceso.

Los análisis estadísticos multivariantes más utilizados en el tratamiento de datos obtenidos con lenguas electrónicas incluyen aquellos que permiten discriminar entre las muestras analizadas, cómo es el caso del análisis de componentes principales (PCA), y otros que permiten realizar modelos de predicción para correlacionar los datos obtenidos con la lengua electrónica con aquellos obtenidos mediante los análisis químicos tradicionales cómo es el análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) [52-53].

2.3.2.1 Análisis por componentes principales (PCA)

El Análisis por Componentes Principales es una técnica estadística descriptiva que tiene como punto de partida una matriz de datos en las que una serie de muestras han sido medidas en función de diferentes variables. Es decir, es una técnica estadística que puede ser utilizada para discriminar entre muestras. Se basa en la reducción del conjunto de variables originales en un conjunto menor formado por nuevas variables denominadas componentes principales; de tal modo que, al calcular los componentes principales no se pierda información en el proceso. Las componentes obtenidas son independientes entre sí y resultan de las combinaciones lineales del conjunto de variables originales.

Las correlaciones obtenidas se consideran óptimas cuando al aumentar el número de variables se pierde información del conjunto inicial. Esto ocurre cuando se intenta modelar parte del error del sistema. Las variables, o componentes principales, obtenidas se ordenan entre sí por la cantidad de varianza que representan, siendo la componente 1 la que mayor información aporta seguida de la 2 la 3 y así sucesivamente [52].

2.3.2.2 Análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) es un método estadístico que tiene relación con el análisis por componentes principales. En este caso, en lugar de calcular aquellas componentes que poseen mayor varianza a partir de la matriz de datos original, se calcula una regresión lineal mediante la proyección de las variables de predicción y las variables observables. Se trata por tanto de un método utilizado para establecer modelos de predicción a partir de las respuestas obtenidas del análisis instrumental, como es el caso de la lengua electrónica, y los parámetros químicos obtenidos de los análisis químicos tradicionales.

De este modo el análisis por PLS modela simultáneamente las variables X e Y para encontrar las variables latentes en X que mejor predicen las variables latentes en Y. Los resultados obtenidos en la calibración se deben al ajuste de todos los datos mientras que en la validación se comprueba el nivel de ajuste para nuevos datos [52].

2.3.3 Nuevos avances en lenguas electrónicas en la industria láctea

En la última década, los sensores electroquímicos se han utilizado en la elaboración de lenguas electrónicas para el análisis de alimentos, como por ejemplo en el reconocimiento y clasificación de la leche [53-54], el análisis cuantitativo del vino y su correlación con la percepción sensorial humana [55], el reconocimiento de la cerveza [56], reconocimiento y clasificación de muestras de diversas bebidas [57-58] y clasificación de miel [59]. En estos trabajos, se han desarrollado diferentes tipos de sensores potenciométricos, como por ejemplo membranas lipídicas, sensores de calcogenuro, membranas basadas en PVC catiónico o aniónico, y membranas poliméricas formadas sobre soportes sólidos de plata respectivamente.

En el caso de la industria láctea se han realizado diferentes estudios con la intención de controlar diversos parámetros de calidad. Por ejemplo, un estudio permitió demostrar la aplicabilidad de una lengua electrónica para la determinación de recuentos bacterianos en la leche fresca durante su almacenamiento [60]. Collier y colaboradores [61] también utilizaron una matriz electroquímica serigrafiada para discriminar entre cuatro muestras de leche, cuatro muestras de yogur y cuatro productos lácteos en presencia o no de colonias bacterianas. Otros estudios demostraron la aplicabilidad de lenguas electrónicas para la detección y discriminación de sustancias nocivas en la leche, utilizadas en adulteraciones con la intención de aumentar su vida útil o aumentar el contenido proteico.

Del mismo modo, Ciosek y colaboradores [56] desarrollaron y aplicaron una lengua electrónica basada en una matriz de sensores potenciométricos en estado sólido miniaturizados, para la clasificación de diferentes muestras de leche en función de su origen y su contenido en materia grasa. Las señales obtenidas se analizaron mediante una red neuronal sin necesidad de un procesamiento previo. Los resultados de la clasificación de la leche por marca registrada y por contenido de grasa demostraron que el sistema propuesto era muy eficiente. De forma similar, se han utilizado lenguas electrónicas basadas en sensores recubiertos con material lipídico en la discriminación de muestras de leche y yogur procedentes de cinco marcas distintas mediante aplicación de métodos estadísticos no supervisados [62].

Las lenguas electrónicas también han sido utilizadas en el estudio de las propiedades organolépticas de muestras de leche fermentadas. Hruškar y colaboradores llevaron a cabo la determinación simultánea de contenido de etanol, acetaldehído, ácido láctico, ácido acético y ácido cítrico en la leche fermentada probiótica mediante una red de sensores potenciométricos. Los resultados obtenidos se utilizaron para el desarrollo de modelos de redes neuronales que permitieron la estimación rápida del contenido de compuestos aromáticos en la leche fermentada [63].

En otro estudio realizado por Dias y colaboradores, desarrollaron una lengua electrónica con 36 sensores de sensibilidad cruzada que permitieron un reconocimiento exitoso de los diferentes estándares básicos de sabor, con una alta sensibilidad a las sustancias de sabor ácido, salado y umami y un menor rendimiento a los sabores amargos y dulces. Posteriormente se comprobó su capacidad de detección de adulteraciones de leche de cabra con leche bovina, lo cual supone un gran problema para la industria láctea. Los diferentes perfiles de señal registrados por el dispositivo, junto con el análisis estadístico, permitieron la implementación de un modelo que podía distinguir entre los grupos de leche de cabra, vaca y mezcla, con una sensibilidad y especificidad general del 97% y 93%, respectivamente [16].

No obstante, la baja sensibilidad frente a ciertos compuestos orgánicos, la reducida actividad enzimática en sistemas poliméricos y la baja estabilidad de los sistemas a lo largo de periodos largos de utilización, todavía supone un reto para la posible aplicación industrial en el sector lácteo de lenguas electrónicas. La superación de estos retos en el desarrollo de lenguas electrónicas robustas

con alta estabilidad y sensibilidad, podría estar relacionada con la implementación de sistemas microfluídicos y la utilización de nuevos materiales, que permitan ampliar las capacidades actuales de las lenguas electrónicas y bioelectrónicas [64].

El presente trabajo consiste en el diseño y desarrollo de una lengua bioelectrónica potenciométrica compuesta por una red de sensores basados en membranas poliméricas modificadas con nanopartículas de oro y enzimas. El sistema desarrollado se aplicó en la detección de componentes de interés presentes en las leches (como lactosa, galactosa o urea), así como en la discriminación y clasificación de leches con diferentes características nutricionales.

3. Desarrollo experimental

3.1 Materiales y reactivos

3.1.1 Construcción del soporte de la lengua electrónica

En la elaboración del soporte físico de la lengua electrónica se utilizaron los siguientes materiales y reactivos que nos permitieron construir el dispositivo:

- Cilindro de metacrilato
- Hilo de cobre
- Conector tipo macho/hembra de 9 pines
- Cable con pinza de cocodrilo
- Lija y bisturí
- Manguera en espiral
- Pegamento de cianocrilato
- Resina epoxi de plata 4110 10z
- Laca de plata

3.1.2 Elaboración de la lengua bioelectrónica potenciométrica

Los materiales empleados en la fabricación de las membranas potenciométricas y biopotenciométricas fueron los siguientes:

- Espátula
- Balanza analítica
- Agitador Vortex
- Baño de ultrasonidos
- Agitador magnético con estufa
- Espectrofotómetro UV/Visible
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Probetas, erlenmeyers y matraces de vidrio

Para la elaboración de las matrices poliméricas se utilizó PVC de alto peso molecular y PVC de alto peso molecular carboxilado (PVCcx). Así mismo se utilizó alcohol oleico como plastificante, la adición de nanopartículas de oro (AuNPs) en tres concentraciones distintas (0, 5 y 10%) y se utilizaron tres tipos de aditivos diferentes: Bis (1-butylpentyl) adipate, Tris (2ethylhexyl) phosphate y 2

Nitrophenylotylether, encargados de aportar selectividad iónica a la membrana. La nomenclatura correspondiente a cada uno de los aditivos y al plastificante, se encuentra en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3: Nomenclatura correspondiente al plastificante y los aditivos utilizados.

Nombre	Nomenclatura	Fórmula	Peso molecular	
Plastificante	Alcohol oleico	3	C ₁₈ H ₃₆ O	268.5 g/mol
Aditivos	Bis(1-butylpentyl)adipate	B	C ₂₄ H ₄₆ O ₄	398.6 g/mol
	Tris(2ethylhexyl)phosphate	C	C ₂₄ H ₅₁ O ₄ P	434.6 g/mol
	2Nitrophenylotylether	E	C ₁₄ H ₂₁ NO ₃	251.3 g/mol

Por otra parte, los reactivos utilizados en la síntesis de nanopartículas de oro fueron agua desionizada como disolvente, ácido tetracloroaurico trihidratadao (HAuCl₄) 0.25 mM y citrato trisódico (Na₃C₆H₅O₇) con una concentración 17 mM.

A continuación, Tabla 4 se muestra detalladamente la composición de las membranas empleadas y el porcentaje de cada uno de sus componentes:

Tabla 4: Composición de las matrices poliméricas empleadas en las membranas.

Membrana	Aditivo (g)	Plastificante (g)	PVC (g)	AuNPs (g)	Aditivo (%)	Plastificante (%)	PVC (%)	AuNPs (%)
3B	0.0131	0.2564	0.1279	-	3.2964	64.5194	32.1842	0.0000
3C	0.0121	0.2573	0.1277	-	3.0471	64.7948	32.1581	0.0000
3E	0.0123	0.2572	0.1278	-	3.0959	64.7370	32.1671	0.0000
3BAu5%	0.0116	0.2413	0.1277	0.0186	2.9058	60.4459	31.9890	4.6593
3CAu5%	0.0115	0.2452	0.1279	0.0181	2.8557	60.8890	31.7606	4.4947
3EAu5%	0.0134	0.2365	0.1278	0.0173	3.3924	59.8734	32.3544	4.3797
3BAu10%	0.0118	0.2156	0.1276	0.0381	3.0018	54.8461	32.4599	9.6922
3CAu10%	0.0117	0.2162	0.1278	0.0353	2.9771	55.0127	32.5191	9.4911
3EAu10%	0.0213	0.2153	0.1281	0.0356	3.0703	54.6308	32.5044	9.7945
Membrana	Aditivo (g)	Plastificante (g)	PVCcx (g)	AuNPs (g)	Aditivo (%)	Plastificante (%)	PVCcx (%)	AuNPs (%)
3Bcx	0.0130	0.2165	0.1275	0.0354	3.2878	54.7547	32.2458	9.7117
3Ccx	0.0121	0.2161	0.1283	0.0362	3.0656	54.7504	32.5057	9.6782
3Ecx	0.0124	0.2159	0.1279	0.0371	3.1528	54.8945	32.5197	9.4330

Para dispersar los diferentes componentes de las membranas se utilizó tetrahidrofurano (THF) como disolvente.

Par la elaboración de los biosensores potenciométricos se realizó la inmovilización de las enzimas: galactosa oxidasa (GaOx) de *Dactylium Dendroides*, ureasa (Ure) de *Canavalia Ensiformis* y lactato deshidrogenasa (LDH) de *Mus Musculus*. Estas enzimas fueron escogidas por su acción sobre compuestos de interés como son la galactosa, la urea y el ácido láctico respectivamente.

La galactosa se encuentra tanto en leche no procesada (0.5 g/l) como en la leche que ha sido sometida a la hidrólisis de la lactosa, donde su contenido se ve incrementado (20 g/l), convirtiéndola en un buen indicador del procesado de este producto [64]. La galactosa oxidasa debido a su acción catalítica convirtiendo la galactosa en D-galacto-hexodialdose y peróxido de hidrógeno [65], ha sido ampliamente utilizada en la construcción de biosensores para la monitorización de los niveles de este azúcar [66-69].

Por otra parte, la urea es un componente natural de la leche relacionado con la calidad nutricional de la misma, no obstante es utilizado para elevar el contenido en nitrógeno en leche adulterada con agua, imitando así el contenido proteico de las muestras sin adulterar [70]. La utilización de la enzima ureasa en biosensores para la determinación del contenido de urea, se basa en la transformación de este compuesto en dióxido de carbono y amonio (NH_4^+), especies fácilmente detectables mediante sistemas electroquímicos [70-75].

Por último, el ácido láctico es el resultado de la fermentación ácido láctica llevada a cabo por las bacterias presentes en la leche responsables del deterioro de este producto. Es decir, la determinación de los niveles de este compuesto permite controlar el envejecimiento de los productos lácteos [76]. La enzima lactato deshidrogenasa, encargada de la catálisis del lactato en piruvato [77], puede ser utilizada por tanto en el desarrollo de biosensores para la detección de cambios en los niveles de ácido láctico en leche [78-80].

En el proceso de inmovilización de estas enzimas se utilizó N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcabodiimide hydrochloride (EDHC), lo que dio como resultado la formación de enlaces covalentes entre la enzima y la superficie del PVC [81].

3.1.3 Disoluciones patrón utilizadas

Para la caracterización y puesta a punto de la lengua electrónica se utilizaros cinco disoluciones patrón que sirvieron a su vez como estándares básicos de sabor. Las disoluciones utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 5: Disoluciones patrón analizadas.

Disolución	Fórmula	Concentraciones
Cloruro de potasio	KCl	0.01 M ; 0.1M ; 0.2M
Cloruro de calcio	CaCl ₂	0.01 M ; 0.1M ; 0.2M
Ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	10 ⁻⁴ M ; 10 ⁻³ M ; 10 ⁻² M
Galactosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	10 ⁻⁴ M ; 10 ⁻³ M ; 10 ⁻² M
Urea	CH ₄ N ₂ O	10 ⁻⁴ M ; 10 ⁻³ M ; 10 ⁻² M

La disolución de urea fue preparada utilizando hidróxido de potasio 0.1M como disolvente, mientras que la disolución de galactosa se preparó a partir de buffer fosfato 0.1M. En el caso del ácido láctico se utilizó buffer fosfato 0.1M con una concentración 12 μ M de nicotinamida adenina di nucleótido (NAD⁺) que simulan el contenido encontrado en leche de vaca de este compuesto [82].

Se utilizaron por tanto las disoluciones de sales como estándar del sabor salado, el ácido láctico como estándar del ácido, la galactosa del dulce y finalmente la urea como estándar para el sabor amargo.

3.1.4 Muestras de leche analizadas

Con el fin de realizar un estudio previo del funcionamiento de la lengua bioelectrónica se analizaron muestras de leche de diferentes marcas y con diferente contenido de materia grasa (Tabla 6) con objeto de dilucidar si la lengua electrónica diseñada era capaz de discriminar entre muestras diferentes.

Tabla 6: Muestras de leche utilizadas en el estudio previo de la lengua electrónica.

Muestra	Tratamiento
Leche desnatada Hacendado	Dilución en agua relación 1:1
Leche semidesnatada Eroski	Dilución en agua relación 1:1
Leche entera Asturiana	Dilución en agua relación 1:1

En el análisis de la capacidad de discriminación de la lengua electrónica entre diferentes tipos de leche en función de su contenido nutricional se utilizaron muestras de trece tipos de leche (Tabla 7) facilitadas por el grupo de Calidad Pascual.

Tabla 7: Nomenclatura correspondiente a las muestras de leche analizadas.

Muestra		Nomenclatura
Desnatada	Clásica	Des
	Sin lactosa	SL-Des
	Calcio	CA-Des
	Fólico	FO-Des
Semidesnatada	Clásica	Sem
	Sin lactosa	SL-Sem
	Calcio	CA-Sem
	Fólico	FO-Sem
	Pro-active	PRO-Sem
Entera	Clásica	Ent
	Sin lactosa	SL-Ent
	Calcio	CA-Ent
	Fólico	FO-Ent

Con el fin de establecer correlaciones entre los datos experimentales a obtener con la lengua electrónica y las propiedades fisico-químicas de la leche, las muestras utilizadas en este trabajo

fueron analizadas por los laboratorios de Calidad Pascual. Los resultados de los análisis físico-químicos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros fisicoquímicos de las muestras de leche analizadas.

	Acidez	Densidad	MG (%m)	Prot (%m)	Lact (%m)	E.S.M (%m)	E.S.T (%m)
Des	12,65	1033,55	0,32	3,3	5	9,02	9,33
Sem	12,55	1031,6	1,56	3,27	4,91	8,91	10,47
Ent	12,17	1029,38	3,56	3,21	4,85	8,78	12,33
CA-Des	15,82	1039,47	0,29	3,93	5,59	10,51	10,8
CA-Sem	16,06	1037,29	1,55	3,9	5,49	10,4	11,95
CA-Ent	15,86	1035,71	3,55	3,91	5,54	10,45	14
SL-Des	12,67	1033,57	0,31	3,29	5,01	9,02	9,33
SL-Sem	12,19	1032,09	1,59	3,31	4,96	8,99	10,57
SL-Ent	11,98	1029,4	3,59	3,23	4,87	8,82	12,41
FO-Des	12,57	1033,7	0,4	3,29	4,95	9,04	9,43
FO-Sem	12,95	1032,38	1,64	3,21	4,93	8,94	10,58
FO-Ent	12,72	1030,55	3,1	3,18	4,94	8,92	12,02
PRO-Sem	12,28	1031,48	1,91	3,16	4,88	8,84	10,74

3.2 Procedimiento experimental

A continuación se describen los procedimientos que se han llevado a cabo en el diseño, desarrollo, puesta punto y aplicación de la lengua bioelectrónica potenciométrica.

3.2.1 Desarrollo y construcción de la lengua potenciométrica

3.2.1.1 Construcción del soporte

En primer lugar se construye el soporte de la lengua electrónica. Para ello se cortan tubos de metacrilato huecos de diámetro 0.5 cm en las longitudes deseadas, en este caso los tubos tienen una longitud aproximada de 10 cm. Se preparan los cables de cobre eliminando la protección de uno de sus extremos. Los cables de cobre son introducidos en los tubos haciendo sobresalir ligeramente la parte que ha sido pelada por uno de sus extremos, asegurándose que los cables no se mueven se fijan por el interior del tubo con una gota de pegamento cianocrilato. Es recomendable asegurarse de que quedan fijados correctamente.

A continuación, se realiza la mezcla de la resina epoxy de plata. Para ellos, se mantiene una relación 10:1 de sus componentes A y B respectivamente. La mezcla obtenida es ligeramente espesa lo que facilita su manejo. Con ayuda de una espátula se introduce una cantidad suficiente de resina en el tubo de metacrilato por el extremo por el que sobresale el cable pelado; es importante que el cable se encuentre en contacto con la resina para una buena conexión eléctrica. Una vez llenos todos los tubos, se procede a realizar el curado de la resina en el horno durante al menos dos horas y a una temperatura de 70°C.

Transcurrido este tiempo se sacan del horno y se dejan enfriar. Una vez fríos se corta la parte sobrante del extremo pelado del cable y con ayuda de una lija o bistorí se le da forma de pequeño pocillo a la resina en el extremo del tubo. Una vez se ha conseguido la forma deseada se procede a pulir el resultado eliminando los posibles restos de resina que se encuentren en el exterior del tubo. Por último se aplica una fina capa de laca de plata en cada pocillo para asegurar la cobertura del final del cable pelado.

Además, conviene comprobar las conexiones eléctricas de los cables mediante el uso de un polímetro. Finalmente, se sueldan los cables de cada uno de los tubos a cada uno de los pines de un conector macho/hembra y se suelda el cable con pinza de cocodrilo directamente a la carcasa del conector.



Figura 1: Construcción del soporte de la lengua potenciométrica.

3.2.1.2 Síntesis de las nanopartículas de oro

Para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) resulta de especial relevancia la correcta limpieza del material, de forma que no queden restos metálicos que puedan interferir en la reducción del ácido cloro áurico. Una vez limpio y seco el material a utilizar se comienza con la síntesis. Se toman 25 mililitros de una disolución 0,25 mM de ácido tetracloroaurico y se llevan a un matraz erlenmeyer con un agitador en su interior. A continuación se activa la agitación de la placa a 150 revoluciones por minuto y la resistencia térmica de la placa se ajusta a 170°C.

Una vez comienza la ebullición de la disolución se toma un volumen de 180 microlitros de la disolución de citrato trisódico y se adiciona gota a gota. Cuando se terminan con la adición se deja un tiempo de reacción de aproximadamente 20 minutos añadiendo si es necesario agua desionizada para mantener el volumen la reacción constante.

El final de la síntesis de estas nanopartículas da como resultado una disolución de color rojo vivo. Si la disolución que se obtiene es opaca o presenta tonos marrones significará que ha habido un problema de contaminación.

3.2.1.3 Preparación de las membranas poliméricas

Para la preparación de las membranas se pesan en un vial el PVC, el aditivo, el plastificante y las nanopartículas en los porcentajes correspondientes, que en el caso de este trabajo suman un peso total aproximado de 0.4g. A continuación se procede a su homogenización mediante la adición de tetrahidrofurano (TFH) de manera escalonada hasta que se obtiene una textura ligeramente viscosa. Si la preparación queda demasiado espesa en el momento de la deposición aparecerán burbujas que deberán eliminarse para un correcto funcionamiento del sistema.

El siguiente paso es la preparación de los electrodos. Para ello se colocan los tubos en posición vertical y se depositan las membranas en cada uno de los pocillos, sobre la capa de plata que ha debido dejarse secar durante al menos quince minutos.

La deposición de las membranas se realiza tomando una pequeña cantidad de membrana con una pipeta pasteur de vidrio y depositándolo con cuidado sobre el pocillo correspondiente, de manera que quede repartida uniformemente, cubriendo toda la superficie y eliminando posibles burbujas. Se deja secar y se repite el procedimiento añadiendo un total de tres gotas por pocillo y tubo.

Una vez depositadas todas las membranas se colocan en una disolución de KCl durante un mínimo de 12 horas para su hidratación. Siempre que no se esté usando el dispositivo es recomendable que se guarde con las membranas sumergidas en KCl de forma que siempre esté listo para su siguiente aplicación.

3.2.2 Elaboración de la lengua bioelectrónica potenciométrica

Para la mejor de la detección de compuestos de interés como la urea, la galactosa y el ácido láctico, se realizó la inmovilización de enzimas de interés en la superficie de las membranas compuestas por PVC carboxilado con objeto de facilitar la fijación de la enzima.

El proceso de inmovilización se llevó a cabo utilizando el método de la carbodiimida, una metodología bien establecida que permite la formación de enlaces covalentes entre grupos carboxilo y amina. En este caso se formaron enlaces covalentes entre los grupos carboxilo del PVC funcionalizado y las aminas secundarias de las enzimas.

Se prepararon tres disoluciones que contenían 5 mg de carbodiimida (EDCH) y 10 mg de enzima, ureasa, galactosa oxidasa y lactato deshidrogenasa respectivamente, por cada 1 ml de agua. Estas disoluciones se pusieron en contacto con cada una de las membranas correspondientes, durante un mínimo de 12 horas para asegurar la formación del enlace.

3.2.3 Adquisición de medidas de la lengua potenciométrica

Para la toma y registro de medidas de diferencia de potencial se ha empleado un Datalogger Keysight 34972^a LXI Data Acquisition/Switch Unit (Figura 2), combinado con el software Benchlink Data Logger 3 como procesador de datos obtenidos por el equipo.

En primer lugar se debe establecer la configuración del software específica para cada uno de nuestros sensores y configurar los nombres de los canales de entrada en función del sensor al que correspondan.



Figura 2: Equipo Datalogger Keysight.

También se deben definir el tiempo de ensayo y el número de medidas que se desean tomar. Para ello se puede modificar el momento de inicio de toma de datos, el intervalo de tiempo de toma de datos una vez iniciado el análisis y el momento de parada, que puede ser definido previamente o utilizando el botón de stop.

En este experimento se llevaron a cabo dos tipos de medidas en función del parámetro que se deseaba estudiar. En primer lugar, las soluciones estándar de sabor para la caracterización de los sensores y el análisis para la clasificación de las muestras de leche, se llevó a cabo mediante mediciones de 5 minutos de duración en las que se registraban los valores del potencial de membrana cada cinco segundos. En todos los casos se realizaron diez repeticiones del proceso para

cada disolución o muestra analizada, entre las cuales el sensor fue retirado de la disolución y limpiado con agua desionizada.

Por otra parte, la detección de la presencia de compuestos de interés en la leche (urea, ácido láctico y galactosa) se evaluó mediante adiciones a una muestra de leche entera, por lo que los parámetros de medida fueron: una hora de duración registrando los valores de potencial cada 10 segundos en presencia de agitación leve constante.

Una vez se han establecido las condiciones del análisis se coloca el conjunto de sensores en contacto con la muestra a analizar, asegurándose de que la membrana quede totalmente cubierta. Así mismo, se conecta el cable con pinza a un electrodo de referencia, que en este caso es de Ag/AgCl, y se introduce el mismo en la muestra junto al sensor teniendo cuidado de que no toque los sensores.

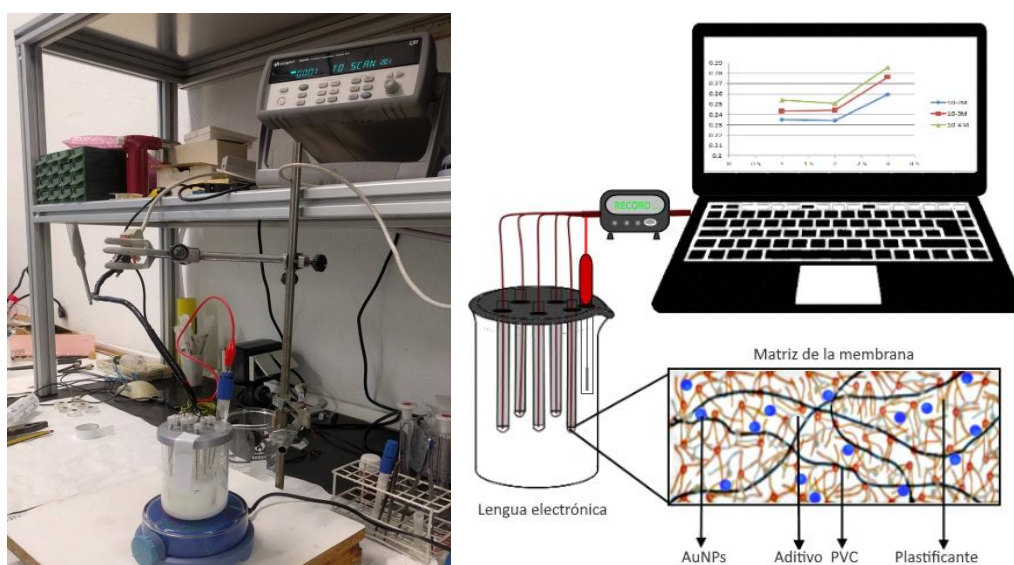


Figura 3: A) Imagen tomada durante el análisis de una muestra de leche. B) Esquema del funcionamiento de la lengua biopotenciométrica.

4. Resultados experimentales

4.1 Diseño y caracterización de la lengua electrónica

4.1.1 Efecto del porcentaje de nanopartículas

En primer lugar, en el diseño y puesta a punto de la lengua electrónica se realizó un estudio previo sobre el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas en la capacidad de los sensores para distinguir entre diferentes concentraciones de un compuesto, como por ejemplo el cloruro de potasio y la galactosa. En la Figura 4 podemos observar que al añadir un 5% de nanopartículas de oro en la composición de la membrana polimérica conseguimos aparentemente un resultado muy similar al que se obtiene sin ellas en la membrana, siendo la membrana 3B la única que muestra una mejora evidente respecto al caso anterior. No obstante al añadir un 10% en la composición de las membranas la capacidad de distinción del sensor incrementa notablemente siendo capaz de distinguir los diferentes concentraciones de cloruro de potasio en los tres tipos de membranas utilizadas.

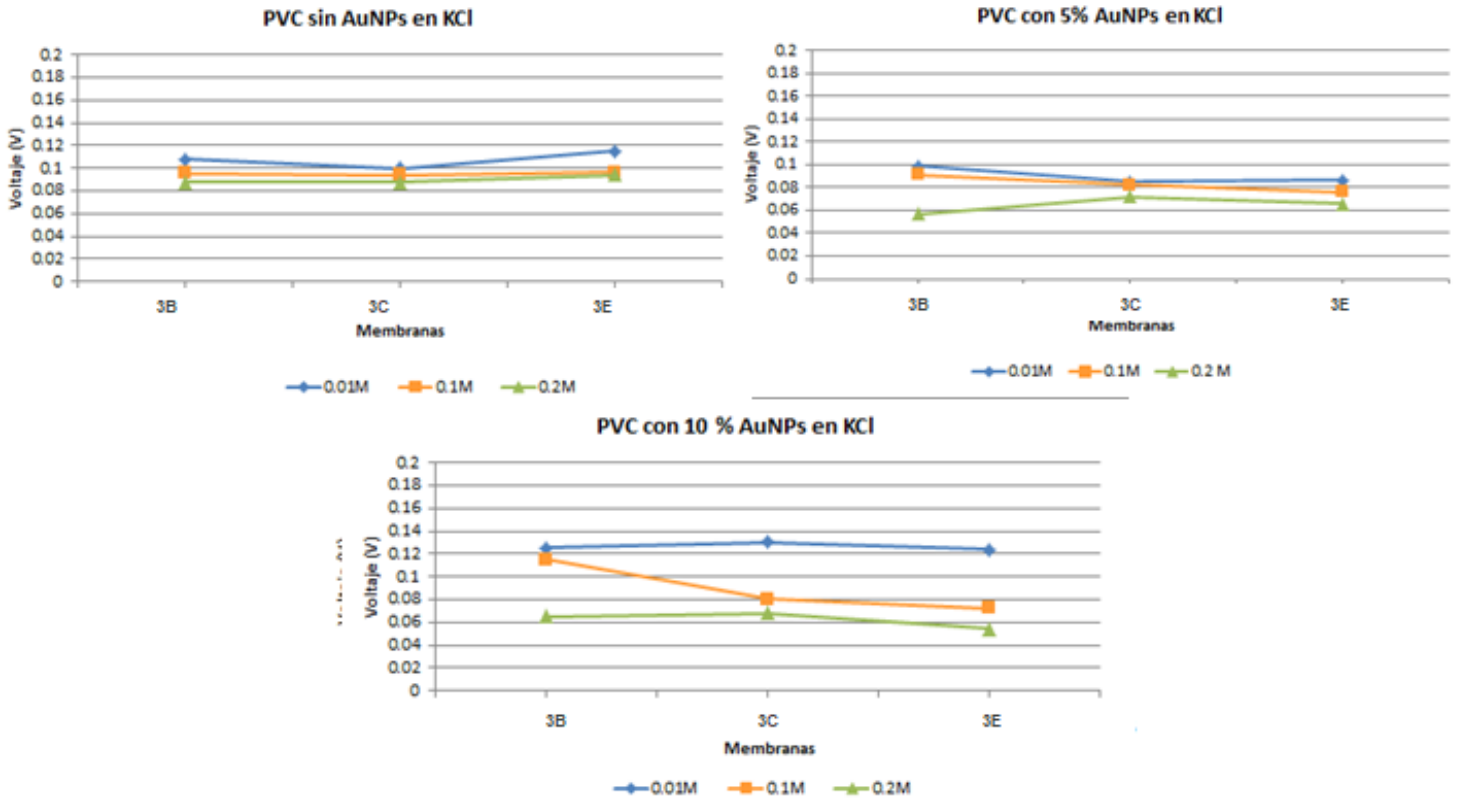


Figura 4: Efecto del porcentaje de nanopartículas en la capacidad de los sensores para distinguir diferentes concentraciones de KCl.

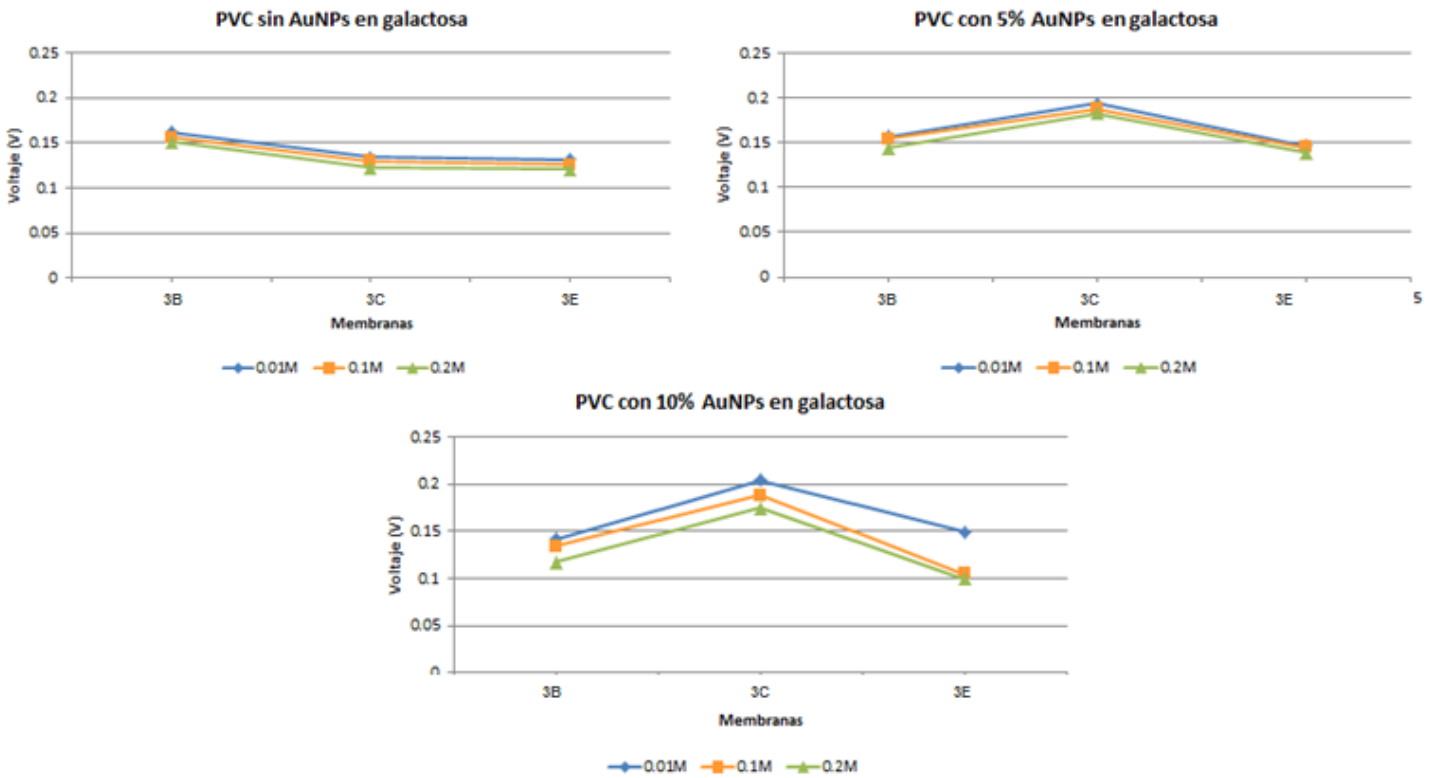


Figura 5: Efecto del porcentaje de nanopartículas en la capacidad de los sensores para distinguir diferentes concentraciones de galactosa.

Del mismo modo, en el caso de la detección de galactosa observamos en la Figura 5 al añadir un 5% de nanopartículas de oro la capacidad de distinción del sensor no parece mejorar significativamente, mientras que con un 10 % de nanopartículas observamos perfectamente la diferencia entre las diferentes concentraciones de galactosa.

Si bien en el caso del cloruro potásico independientemente de la concentración de nanopartículas de oro los sensores eran capaces de distinguir, con mayor o menor facilidad, las diferentes concentraciones del compuesto, en el caso de la galactosa únicamente se observan correctamente esas diferencias en el caso de las membranas que contienen un 10% de nanopartículas de oro. Dado que en este trabajo se desea desarrollar una lengua electrónica aplicable en la industria láctea, es necesario que el dispositivo posea una buena capacidad de distinción entre diferentes concentraciones de azúcares presentes en lácteos, por ello a lo largo del resto del presente trabajo se utilizará un 10% de nanopartículas de oro en la composición de las diferentes membranas poliméricas.

4.1.2 Efecto del tipo de PVC utilizado

Como paso previo al diseño de la lengua bioelectrónica a partir de la modificación de los sensores con diferentes enzimas fue necesario determinar si la utilización de PVC carboxilado, necesario para la formación del enlace covalente entre las enzimas y la superficie de las membranas, provocaba a su vez un cambio en el potencial detectado por el sensor. Este paso previo fue de gran importancia dado que permite asegurar que los resultados obtenidos posteriormente son reales y no un producto del cambio en el tipo de PVC.

Comparando los resultados obtenidos para las membranas preparadas con PVC y con PVC carboxilado (Figuras 6 y 7) podemos observar que los resultados en ambos casos son prácticamente idénticos, siendo la media de estas diferencias de 0.001V y alcanzando en el caso de la mayor diferencia los 0.007V; además en ambos casos se observa cómo pese a esas pequeñas diferencias la tendencia de los potenciales se mantiene. Estas pequeñas diferencias pueden ser debidas al propio proceso de deposición de las membranas, que como ya se ha descrito es manual.

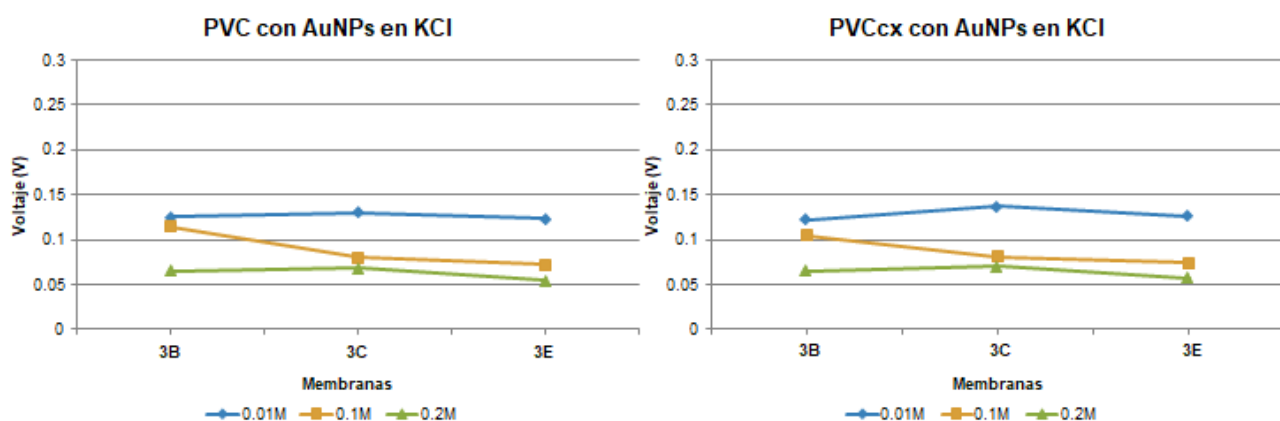


Figura 6: Efecto del PVC utilizado en la capacidad del sensor para distinguir diferentes concentraciones de KCl.

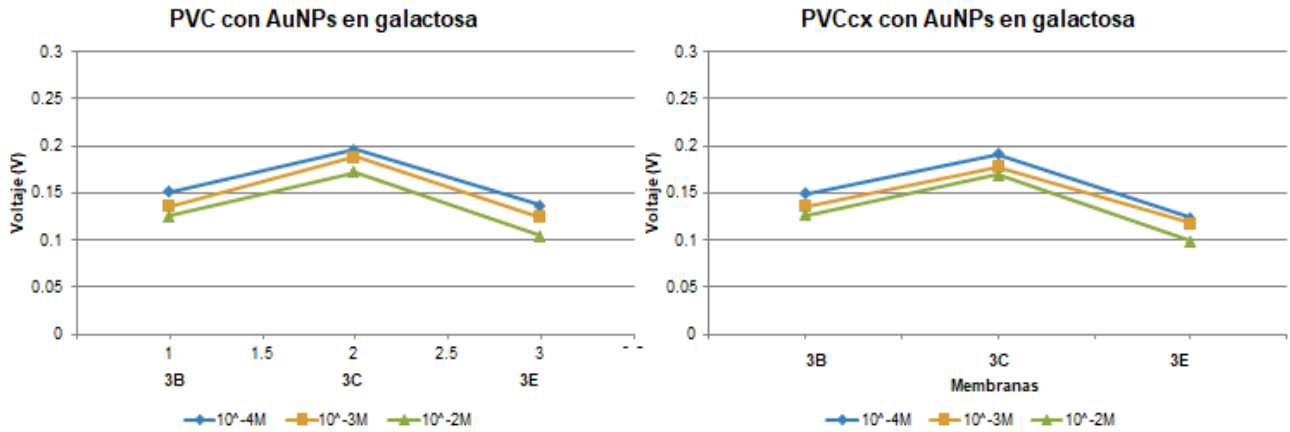


Figura 7: Efecto del PVC utilizado en la capacidad del sensor para distinguir diferentes concentraciones de galactosa.

Dado que los resultados obtenidos para ambos tipos de PVC podrían considerarse prácticamente idénticos, a lo largo de este trabajo se decidió utilizar PVC carboxilado siempre que sea necesario realizar una inmovilización enzimática y se utilizará PVC normal en aquellas membranas que no vayan a ser modificadas con enzimas.

4.1.3 Efecto de las enzimas utilizadas

A continuación, se estudió el efecto de la utilización de enzimas unidas covalentemente a la superficie de las membranas poliméricas de los diferentes sensores. Para ello, se prepararon sensores que presentaban tres enzimas diferentes (Ureasa, Lactato deshidrogenasa y Galactosa oxidasa) inmovilizadas sobre membranas preparadas con PVC carboxilado que contenían o no nanopartículas de oro. Estas combinaciones permitieron determinar el efecto de las enzimas, así como dilucidar si existía un efecto combinado entre las nanopartículas y las enzimas.

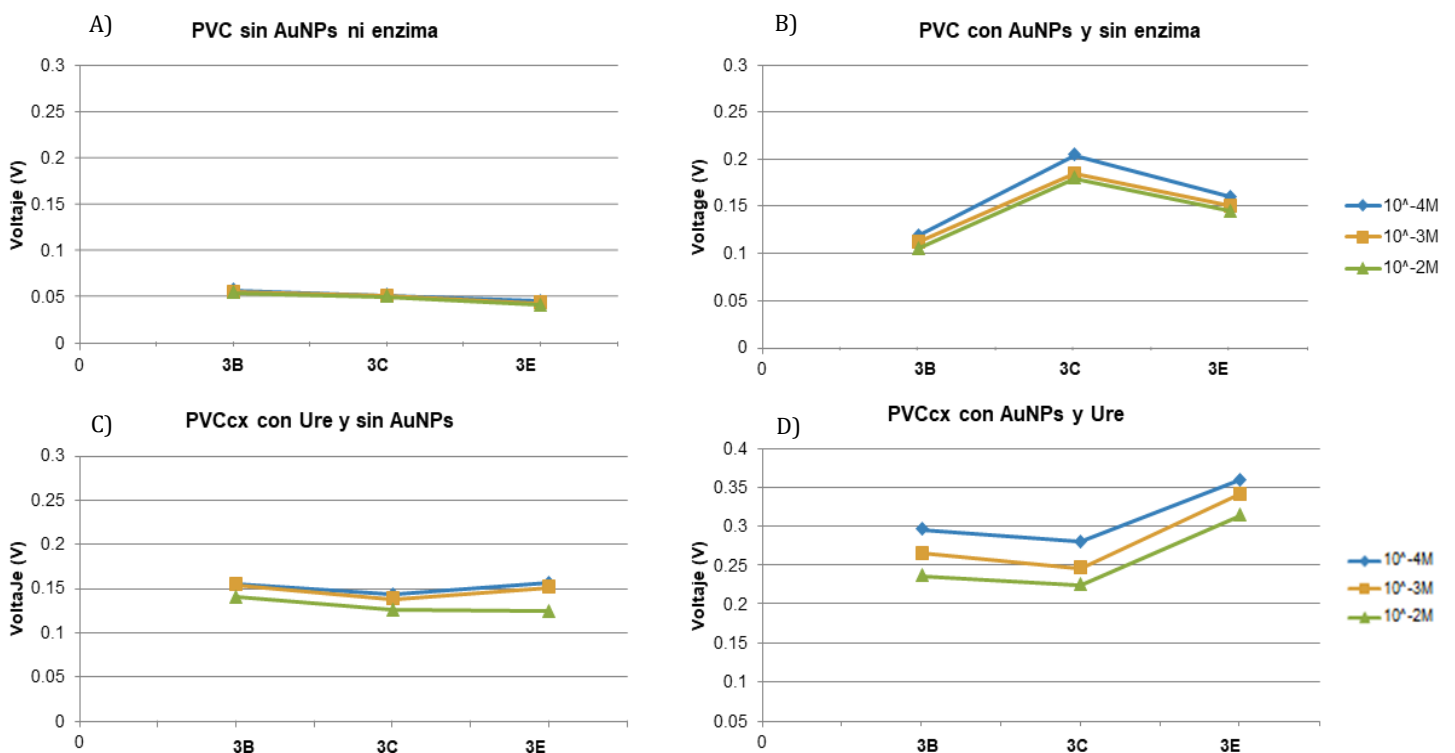


Figura 8: A) Respuesta de los sensores en ausencia de Ure y sin nanopartículas. B) Respuesta de los sensores en ausencia de Ure y con nanopartículas. C) Respuesta de los sensores con Ure y sin nanopartículas. D) Respuesta de los sensores con Ure y nanopartículas.

En la Figura 8 se muestra los resultados obtenidos para diferentes concentraciones de urea. En este caso vuelve a observarse como el efecto de las nanopartículas (B) permite una mejor distinción de las concentraciones, además en este caso también podemos observar que la utilización de la enzima ureasa (Ure) también provoca una mejora en la capacidad de discernir del sensor (C). Sin embargo, es la utilización conjunta de las nanopartículas y la enzima lo que consigue que el sensor sea capaz de diferenciar claramente entre las diferentes concentraciones de urea (D).

Por otra parte, también puede observarse que la combinación de ambos elementos en los sensores provoca un aumento del potencial de membrana respecto a las membranas que poseen tan solo uno de los elementos o ninguno de ellos.

Al igual que en el caso de la urea, la capacidad de los sensores para diferenciar entre las diferentes concentraciones de ácido láctico aumenta en presencia de las nanopartículas y las enzimas (Figura 9), siendo mucho mayor y a potenciales más altos en aquellas membranas que poseen nanopartículas en su composición y la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) inmovilizada en su superficie. No obstante, se ha de tener en cuenta que al contrario que con la urea los cambios en las concentraciones de ácido láctico podían detectarse sin necesidad de modificar los sensores, por lo que los efectos de la enzima y las nanopartículas parecen ser menores que en el caso anterior.

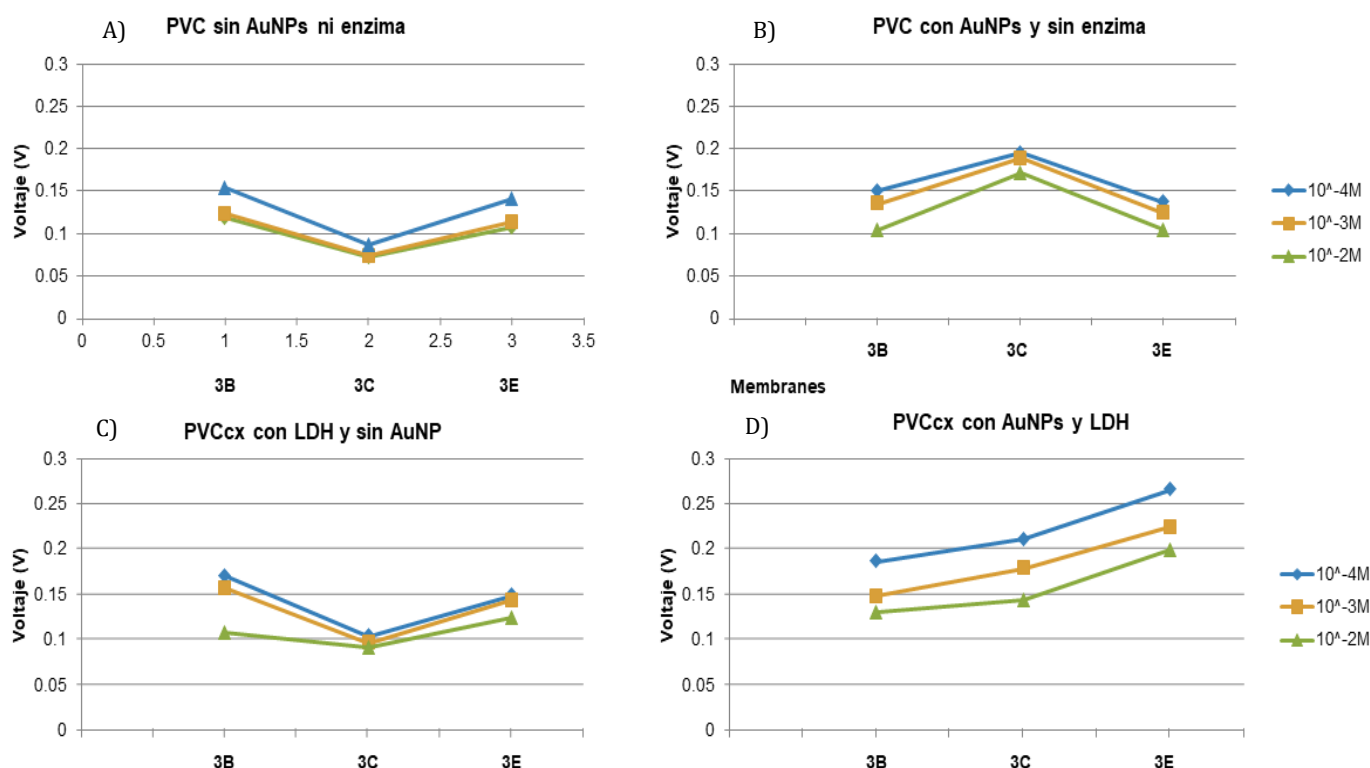


Figura 9: A) Respuesta de los sensores en ausencia de enzima LDH y sin nanopartículas. B) Respuesta de los sensores en ausencia de enzima LDH y con nanopartículas. C) Respuesta de los sensores con LDH y sin nanopartículas. D) Respuesta de los sensores con LDH y nanopartículas.

Por último, se estudió el efecto de la enzima galactosa oxidasa en los diferentes sensores (Figura 10). Del mismo modo que en los casos anteriores, se observó que los mejores resultados se obtenían con la combinación de enzima y nanopartículas. No obstante, en este caso se observa una menor

diferencia respecto a la capacidad de distinción del sensor, entre el uso de ambos elementos o la utilización de uno solo, aunque si se observa el incremento en el potencial.

Tal y como era de esperar, la utilización de enzimas permite mejorar la detección de aquellas sustancias a los cuales van dirigidas, como es el caso de la urea, el ácido láctico y la galactosa. Los buenos resultados obtenidos en el caso de los sensores con enzima y nanopartículas podría deberse a que las nanopartículas favorezcan la actividad catalítica de las enzimas, al poder actuar como intercambiadores de electrones con su centro activo. Por otra parte, la adición de nanopartículas puede estar modificando de por sí la selectividad iónica de las membranas lo que provocaría la mejora de las señales que se han visualizado.

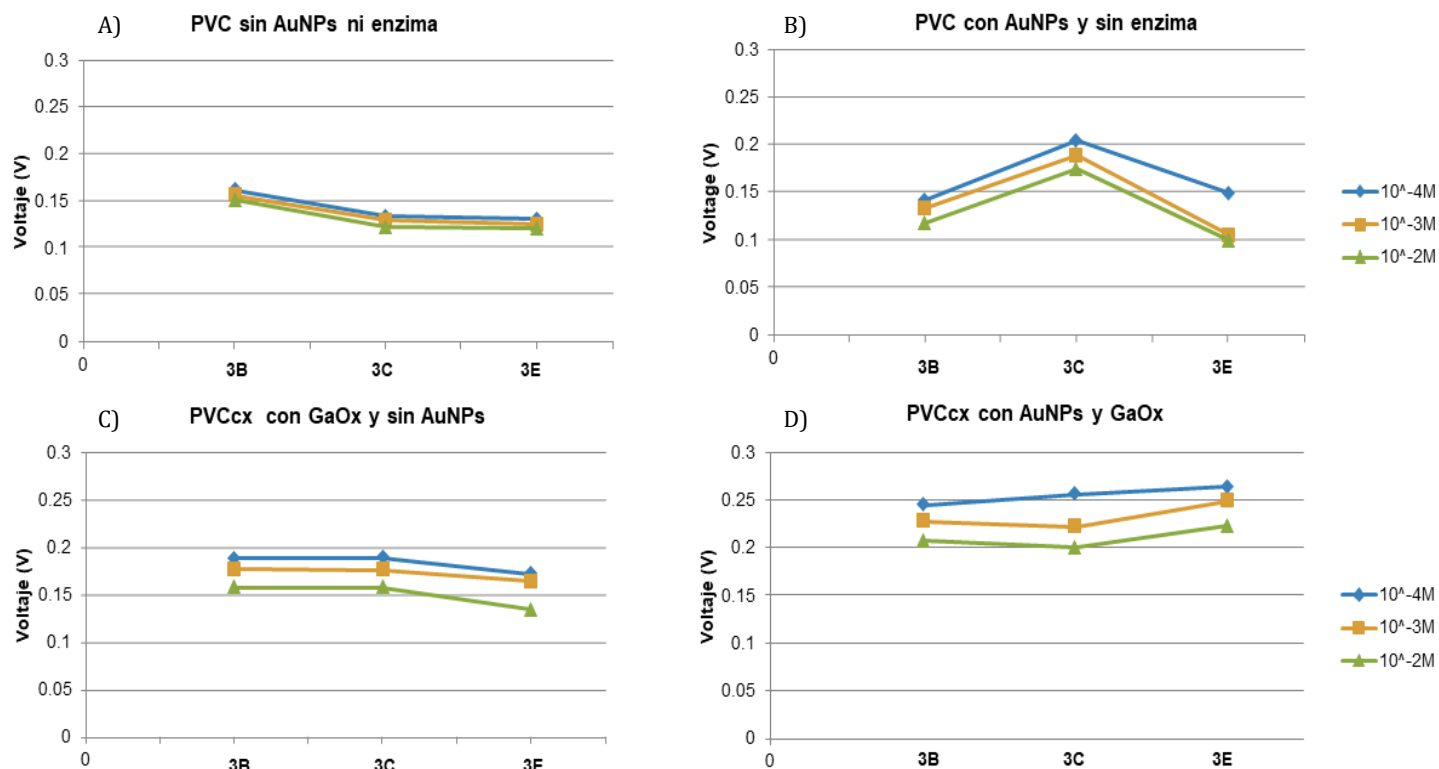


Figura 10: A) Respuesta de los sensores en ausencia de GaOx y sin nanopartículas. B) Respuesta de los sensores en ausencia de GaOx y con nanopartículas. C) Respuesta de los sensores con GaOx y sin nanopartículas. D) Respuesta de los sensores con GaOx y nanopartículas.

4.2 Patrones de sabor básicos

Una vez realizado el estudio de las diferentes variaciones en la composición de las membranas que forman los sensores, se pusieron a prueba los diferentes sensores desarrollados en la distinción de diferentes concentraciones de patrones de sabor básicos. Para ello se realizaron medidas en disoluciones de cloruro de potasio, cloruro de calcio, urea, ácido láctico y galactosa; los cuales corresponden con los sabores salado, amargo, ácido y dulce.

En primer lugar se comprobó su funcionamiento en las disoluciones que correspondían al sabor salado, utilizando disoluciones de KCl y CaCl₂ (Figura 11 y Figura 12) en las cuales se observó que prácticamente todos los sensores eran capaces de distinguir las tres concentraciones estudiadas. La única membrana que no mostró una buena distinción fue la 3C con ureasa y sin nanopartículas en el

caso del cloruro potásico, mientras que aquellas que poseían nanopartículas en su composición y ninguna enzima son aquellas que presentaron los mejores resultados.

Diferencias entre concentraciones de KCl

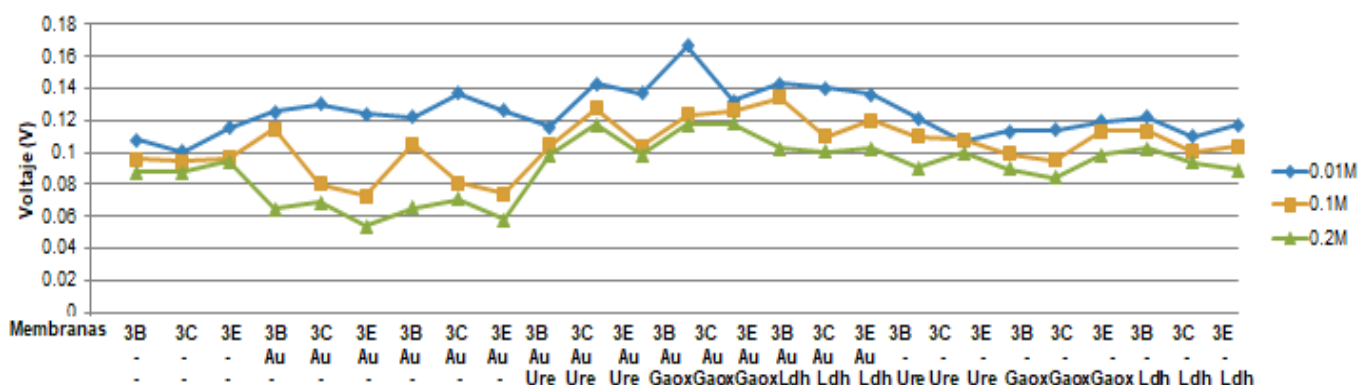


Figura 11: Capacidad de distinción de los diferentes sensores frente a diferentes concentraciones de KCl.

Diferencias entre concentraciones de CaCl₂

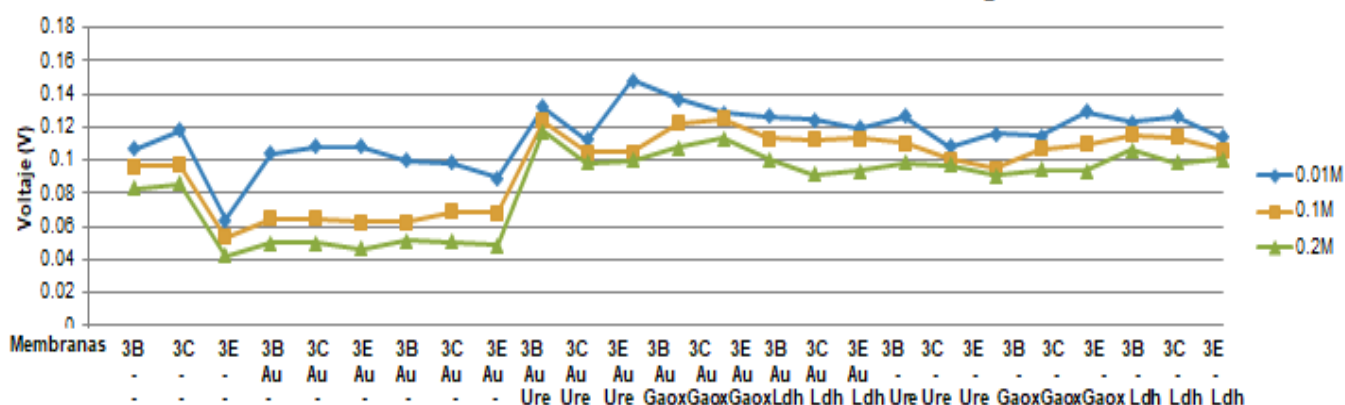


Figura 12: Capacidad de distinción de los diferentes sensores frente a diferentes concentraciones de CaCl₂.

En el caso de la urea (Figura 13), que corresponde al sabor amargo, se observó que en ausencia de nanopartículas y/o enzima la capacidad de distinción del sensor era prácticamente nula, mientras que incorporando nanopartículas en la matriz de la membrana o utilizando enzimas unidas covalentemente se mejoraba la sensibilidad del sensor frente a este compuesto. En este caso, tal y como se había visto previamente es la combinación de nanopartículas y enzimas (en concreto nanopartículas-ureasa) lo que permite una mejor distinción de las diferentes concentraciones de urea.

Por otra parte, se puede observar como aquellos sensores que presentan enzimas diferentes a la ureasa no muestran la misma respuesta respecto a los que sí. Este resultado es lógico dado que el resto de enzimas no presentan actividad catalítica al no estar en presencia de sus sustratos y, como consecuencia, muestran un resultado que se asemeja a aquellas membranas que no presentan enzima.

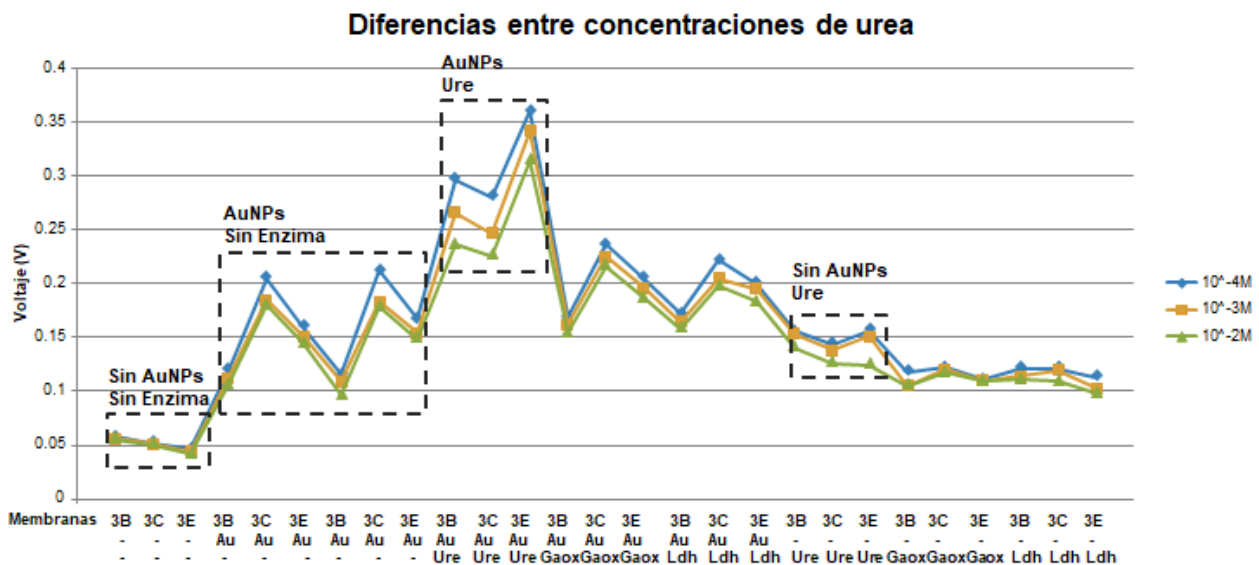


Figura 13: Capacidad de distinción de los diferentes sensores frente a diferentes concentraciones de urea.

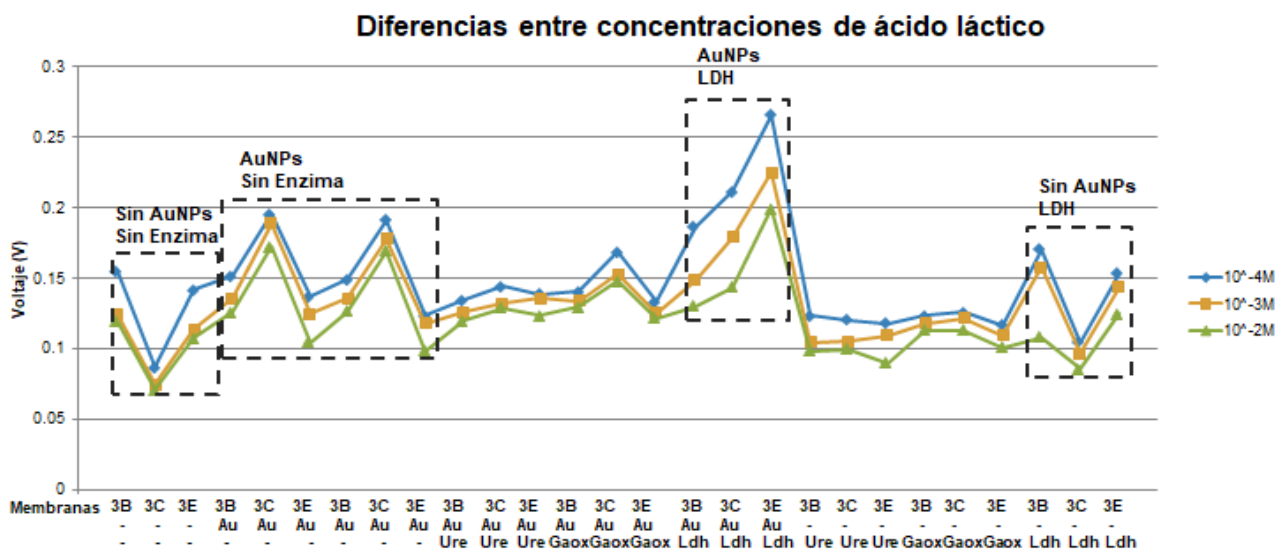


Figura 14: Capacidad de distinción de los diferentes sensores frente a diferentes concentraciones de ácido láctico.

Del mismo modo, en el caso del sabor ácido (Figura 14), observamos que los sensores modificados con nanopartículas y la enzima LDH presentan la mayor capacidad de discriminación entre las tres concentraciones de ácido láctico. No obstante, en este caso todas las membranas salvo la 3C sin modificar, son capaces de distinguir entre concentraciones, observándose pocas diferencias entre los diferentes sensores a excepción de aquellos que combinan ambas modificaciones.

Por último, se comprobó la capacidad de los sensores para diferenciar diferentes concentraciones del patrón de sabor dulce que en este caso corresponde a la galactosa (Figura 15). Al igual que en los dos casos anteriores, y como era de esperar, es la combinación de galactosa oxidasa y nanopartículas lo que consigue una mejor distinción entre las tres concentraciones, seguida de la utilización de la enzima en ausencia de nanopartículas.

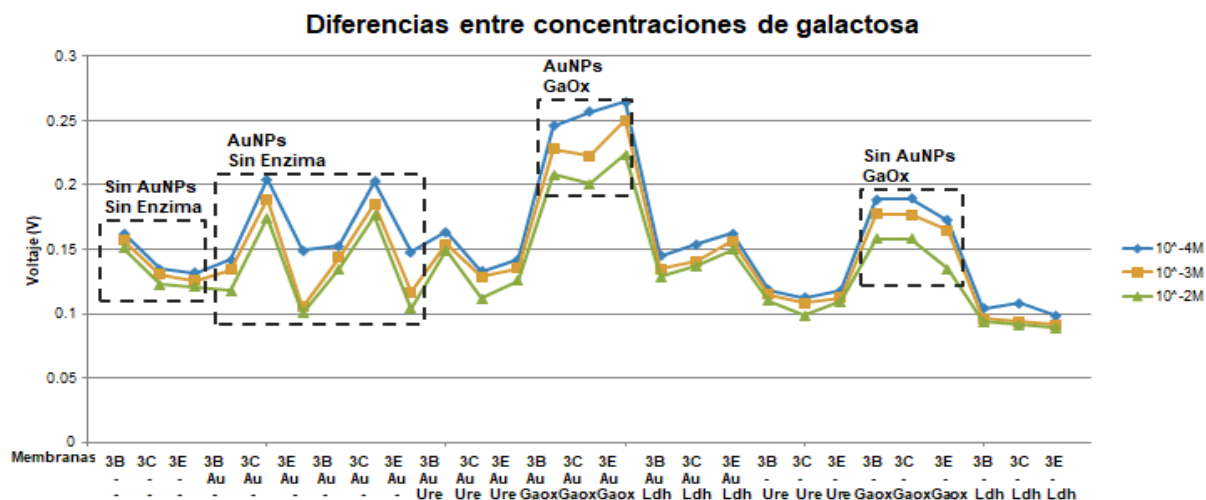


Figura 15: Capacidad de distinción de los diferentes sensores frente a diferentes concentraciones de galactosa.

Al observar las respuestas de los sensores frente a la urea, el ácido láctico y la galactosa, puede verse como la respuesta de los sensores que presentan enzimas varía en función de la disolución, de manera que podemos comprobar que los mismos sensores son más sensibles a aquellos compuestos de interés hacia los que van dirigidas cada una de las enzimas, sin que ello suponga una pérdida de su capacidad de diferenciar concentraciones de otros compuestos. Por ejemplo, las membranas que presentan lactato deshidrogenasa solamente mostraron una mejora en su respuesta en presencia de ácido láctico, mientras que los mismos sensores utilizados anteriormente en urea y posteriormente en galactosa mostraron diferencias entre las concentraciones de estos compuestos similares a las que se obtienen al no utilizar enzimas.

Pese a que las diferencias observadas parecen indicar que los sensores son capaces de diferenciar entre las diferentes concentraciones de las distintas disoluciones, es necesario realizar un estudio estadístico para confirmarlo. Para ello se realiza un análisis por componentes principales (PCA) utilizando como variables los diferentes sensores desarrollados, excluyendo aquellos que no presentan ninguna modificación en su composición o en su superficie dado que no aportan mayor información. Del mismo modo, para no analizar datos repetidos, únicamente se incluyen como variables las membranas con nanopartículas preparadas con PVC normal, ya que al ser sus datos tan similares a los del PVC carboxilado podrían introducir una fuente de error en el modelo.

Diagrama de scores. PCA de los patrones de sabor básico

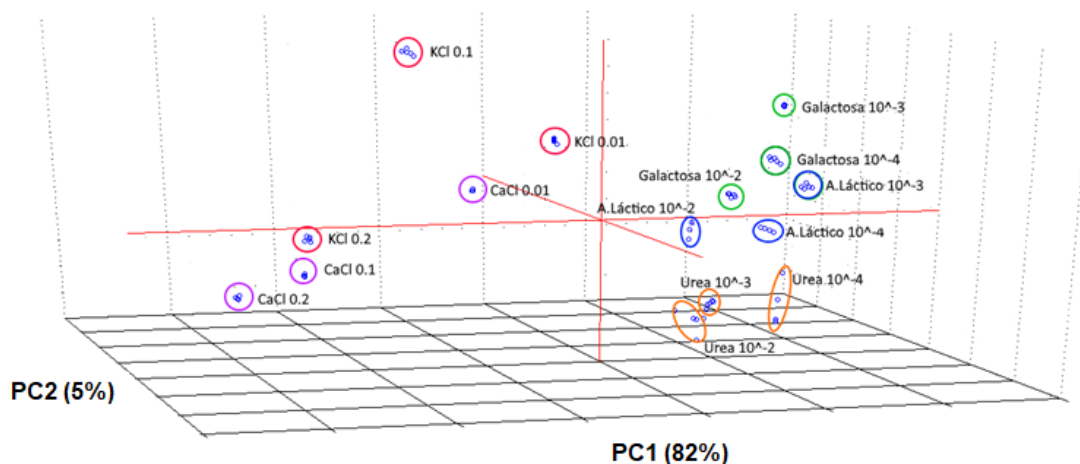


Figura 16: Diagrama de Scores del análisis por PCA de los patrones de sabor básicos.

Tal y como se puede observar, el modelo muestra los quince grupos que corresponden a las quince disoluciones analizadas. Además, las diferentes concentraciones de los patrones de sabor aparecen agrupadas y ordenadas de izquierda a derecha de mayor a menor concentración. Es decir, mediante el análisis por componentes principales hemos desarrollado un modelo capaz de distinguir entre los diferentes patrones de sabor básico. Por otra parte, también hay que destacar que en los primeros tres componentes principales se modela el 91% de la información del modelo, siendo la primera componente la que posee un mayor porcentaje de información (82%).

El análisis por componentes principales también nos proporciona información sobre la varianza que aporta cada uno de los sensores al modelo, de esta forma se puede determinar aquellos con menor importancia y que podrían eliminarse del modelo sin que se perdiera información significativa. Para ello se utiliza el gráfico mostrado en la Figura 17.

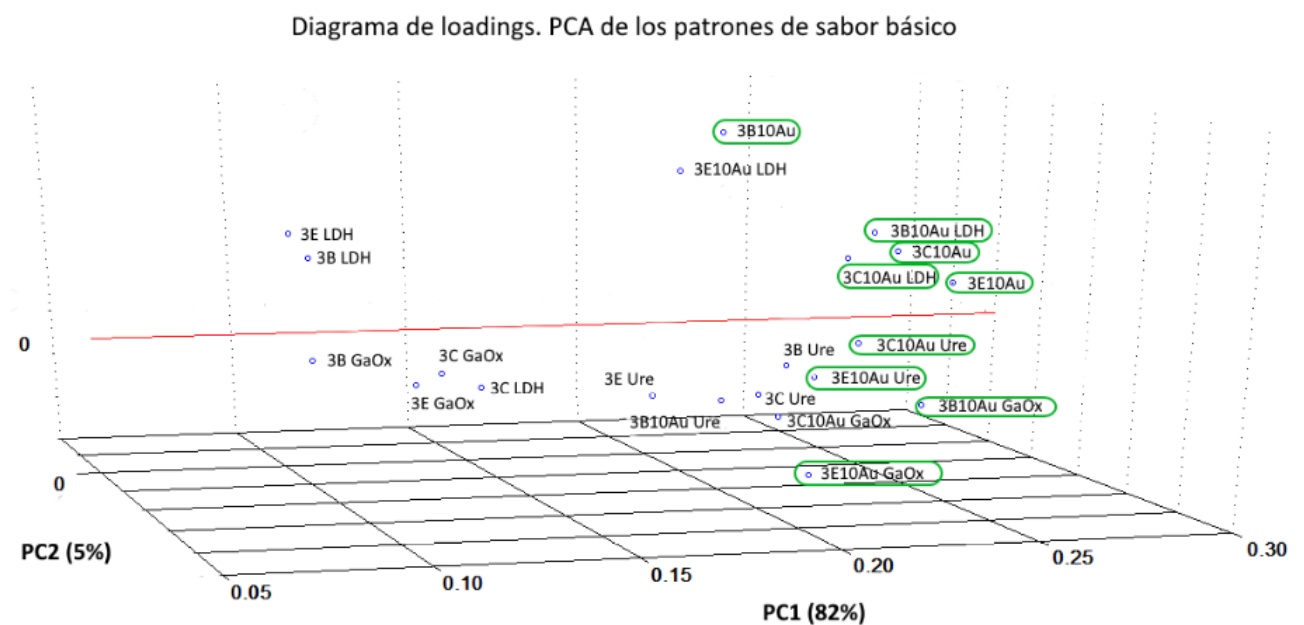


Figura 17: Diagrama de Loadings del análisis por PCA de los patrones de sabor básicos.

El diagrama de loadings nos muestra las variables del conjunto de datos en función de la varianza que aportan al sistema, en este caso nos permite conocer aquellos sensores que aportan más información para la distinción entre los diferentes patrones de sabor. Dado que la primera componente contiene el 82% de la información del conjunto original de datos, aquellos sensores más alejados del cero aportarán mayor información, tomando esto como referencia se eligen los sensores que aparecen más a la derecha del diagrama. Una vez seleccionados aquellos con valores más altos para la primera componente se puede hacer una segunda selección, en este caso eligiendo aquellos sensores que aparecen más alejados del cero para la segunda componente.

En este trabajo se decidió realizar una simplificación de la lengua electrónica mediante la selección de aquellos sensores de mayor importancia en el modelo, de manera que el dispositivo resultante pese a su sencillez fuera capaz de llevar a cabo la clasificación de diferentes muestras de leche. Para ello, se eligieron aquellos sensores que aparecen rodeados en color verde en la Figura 17; estos sensores comprendían aquellos que presentaban un mayor grado de varianza para las dos primeras

componentes. Además, se mantuvieron dos sensores con cada tipo de enzima para asegurar la capacidad de la lengua electrónica de detectar los compuestos de interés urea, ácido láctico y galactosa. Como resultado de esta selección se eligieron los siguientes sensores para su aplicación en muestras de leche: 3B10Au, 3C10Au, 3E10Au, 3C10Au-Ure, 3E10Au-Ure, 3B10Au-GaOx, 3E10Au-GaOx, 3B10Au-LDH y 3C10Au-LDH.

4.3 Aplicación de la lengua electrónica en leche

4.3.1 Estudio previo de la lengua electrónica en leche

Como paso previo a la aplicación de la lengua electrónica en el análisis de las muestras de leche suministradas por Calidad Pascual S.L, para su posterior clasificación, se realizó una prueba de la lengua electrónica en la cual se intentó detectar la presencia de compuestos de interés en la leche mediante la realización de medidas continuas durante las cuales se adicionaron cantidades fijas de urea, ácido láctico y galactosa, a una muestra de leche entera.

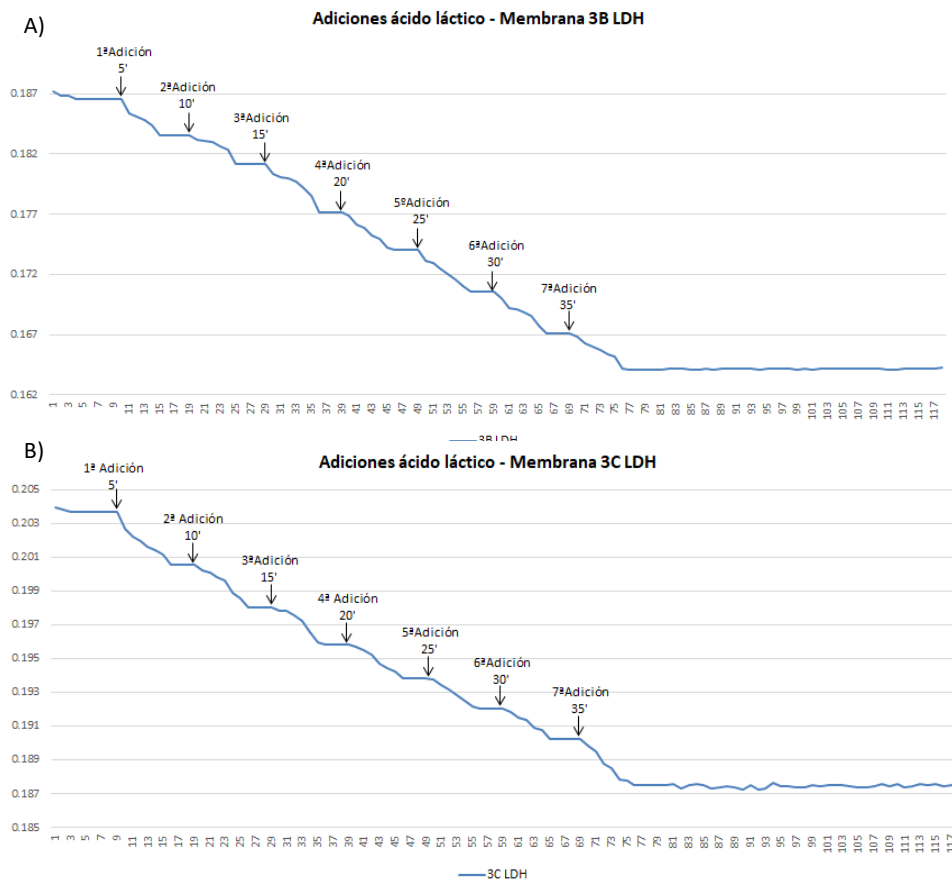


Figura 18: A) Resultado de las adiciones de 20µl de ácido láctico 0.1M en leche entera con el sensor 3B LDH. B) Resultado de las adiciones de 20µl de ácido láctico 0.1M en leche entera con el sensor 3C LDH.

En primer lugar, se estudió la capacidad de los diferentes sensores para detectar concentraciones crecientes de ácido láctico en las muestras de leche. Si observamos la Figura 18 vemos que a medida que se adiciona el ácido láctico el sensor registra un descenso del potencial de membrana, el cual

presenta una estabilización de sus valores entre cada una de las adiciones. En el caso de la membrana 3B LBH observamos un descenso del potencial desde los 0.187 voltios aproximadamente hasta los 0.164 voltios, con un descenso medio de 0.0031 voltios entre cada una de las adiciones. Del mismo modo, la membrana 3C LDH muestra un descenso del potencial entre cada una de las adiciones y una estabilización de los valores entre las mismas. En este caso el potencial desciende de 0.204 voltios hasta 0.187 voltios, con una descenso medio de 0.0027 voltios entre adiciones.

Además, en ambos casos, hay que destacar que tras la última adición el sensor continúa registrando el potencial durante 25 minutos en los cuales el potencial se mantiene prácticamente constante hasta el final del proceso, lo que permite descartar que el potencial bajara de forma constante a lo largo del tiempo independientemente de las adiciones.

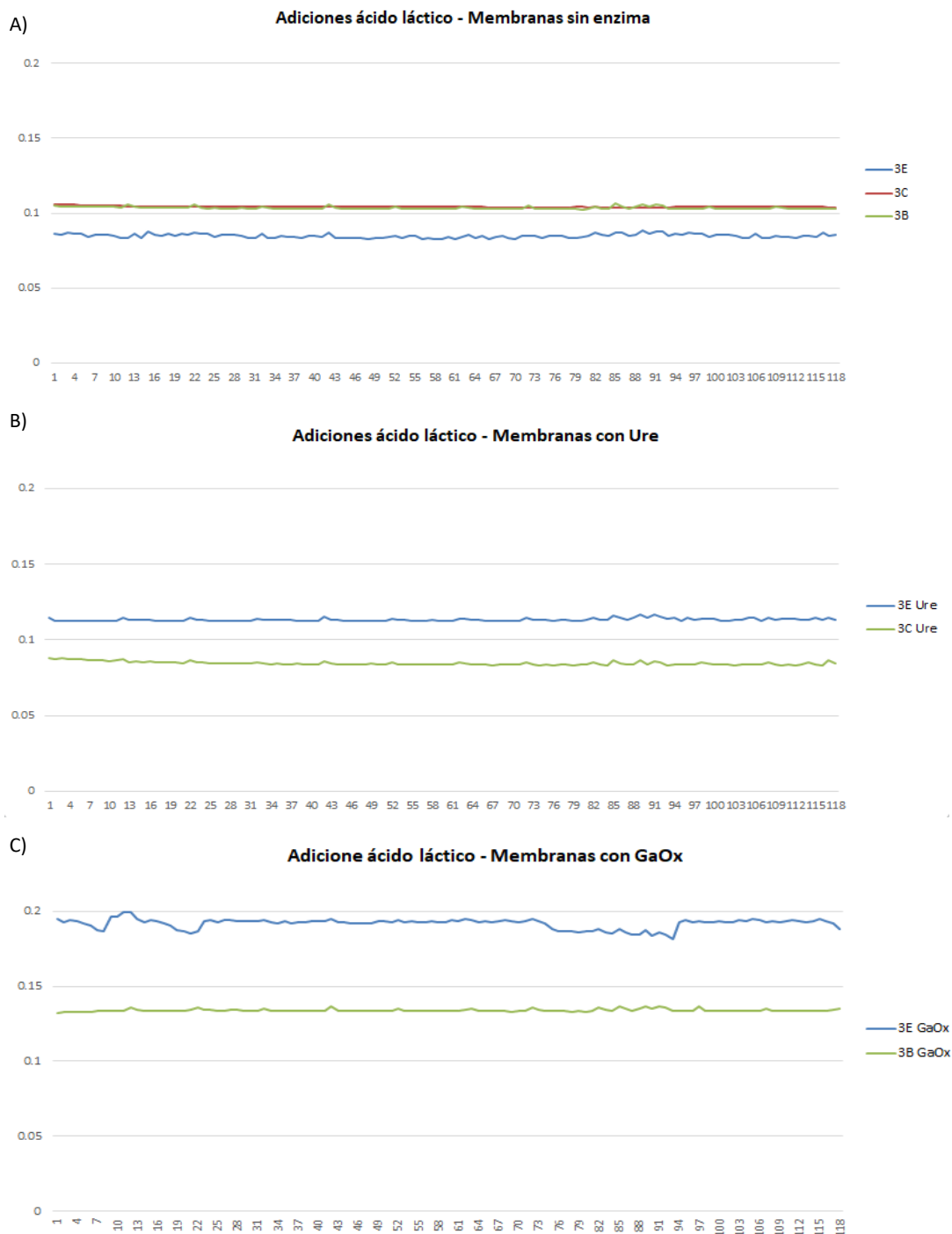


Figura 19: A) Resultado de las adiciones de 20µl de ácido láctico 0.1M en leche entera de los sensores sin enzima B) Resultado de las adiciones de 20µl de ácido láctico 0.1M en leche entera de los sensores con Ure. C) Resultado de las adiciones de 20µl de ácido láctico 0.1M en leche entera de los sensores con GaOx.

Adicionalmente y como comprobación, en la Figura 19 observamos el comportamiento frente a estas adiciones de sensores con membranas sin enzima, o bien con enzimas cuyo sustrato no es el ácido láctico, el potencial de membrana que se registra se mantiene constante a lo largo de todo el experimento presentando variaciones de potencial muy pequeñas. Estos cambios de potencial podrían deberse a la estabilización del sensor, como en el caso de la membrana 3E con galactosa oxidasa. Estos resultados nos indican que la lengua electrónica es capaz de registrar incrementos de ácido láctico, que de otra forma no se percibirían, gracias a la utilización de sensores dirigidos específicamente contra este compuesto.

En el caso de adiciones de galactosa observamos en la Figura 20 como las membranas que presentan galactosa oxidasa inmovilizada en su superficie, muestran un descenso del potencial de membrana similar al observado en el caso del ácido láctico. En el caso de la membrana 3B el potencial de membrana desciende desde los 0.135 voltios hasta los 0.102 voltios aproximadamente, con un descenso medio de 0.0045 voltios entre adiciones, mientras que la membrana 3E desciende desde 0.195 voltios hasta 0.184 voltios con bajada de 0.0015 voltios entre cada adicción. En ambos casos, una vez terminadas las adiciones los sensores muestran una estabilización del potencial durante los restantes 25 minutos.

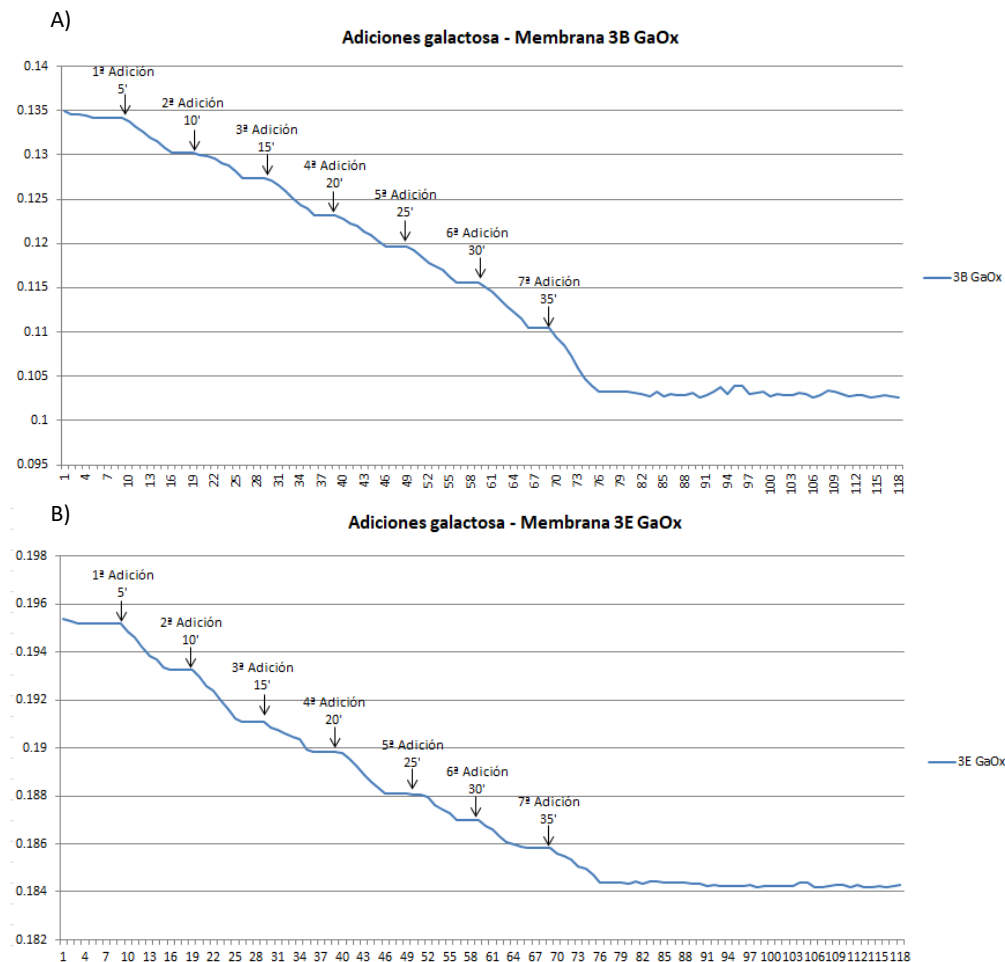


Figura 20: A) Resultado de las adiciones de 20µl de galactosa 0.1M en leche entera con el sensor 3B GaOx. B) Resultado de las adiciones de 20µl de galactosa 0.1M en leche entera con el sensor 3E GaOx.

En el caso de las membranas sin enzima así como aquellas que presentan una enzima distinta a la galactosa oxidasa (Figura 21), estos sensores no registran descensos del potencial de membrana si no que el potencial se mantiene constante a lo largo del tiempo. No obstante en el caso de la membrana 3B con lactato deshidrogenasa, se observa como la señal registrada no llega a estabilizarse en ningún momento, esto puede deberse a un fallo puntual en la conexión del sensor.

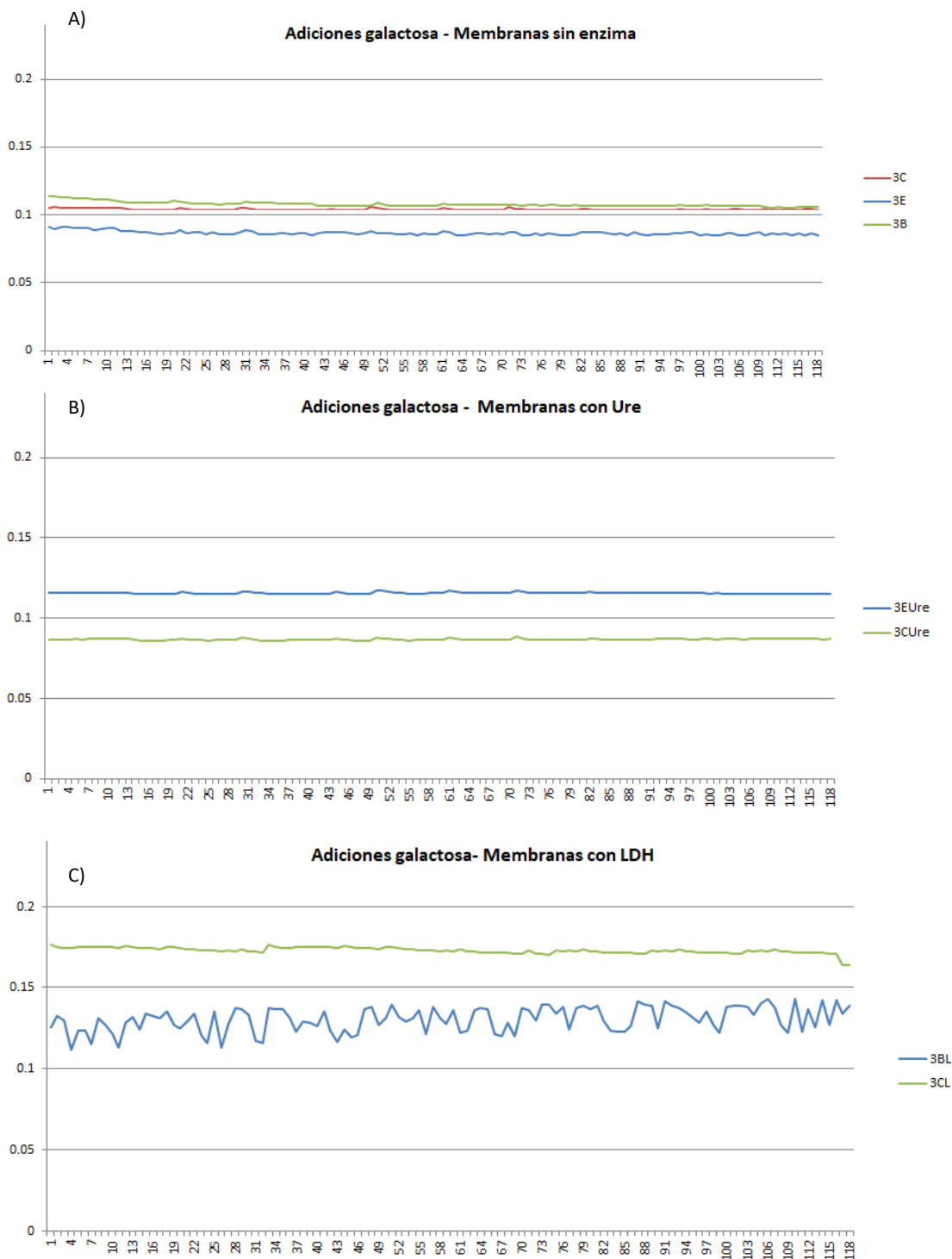


Figura 21: A) Resultado de las adiciones de 20µl de galactosa 0.1M en leche entera de los sensores sin enzima B) Resultado de las adiciones de 20µl de galactosa 0.1M en leche entera de los sensores con Ure. C) Resultado de las adiciones de 20µl de galactosa 0.1M en leche entera de los sensores con LDH.

Finalmente, se estudió la capacidad de los diferentes sensores para detectar cambios tras realizar adiciones de urea. Si observamos la Figura 22 vemos que a medida que tienen lugar las adiciones los sensores con ureasa inmovilizada registran un descenso del potencial de membrana. En el caso de la membrana 3C Ure observamos un descenso del potencial desde los 0.092 voltios aproximadamente hasta los 0.069 voltios, con un descenso medio de 0.0031 voltios entre las adiciones. Del mismo modo, la membrana 3E Ure muestra un descenso del potencial desde los 0.198 voltios hasta 0.166 voltios, con un descenso medio de 0.0045 voltios entre adiciones.

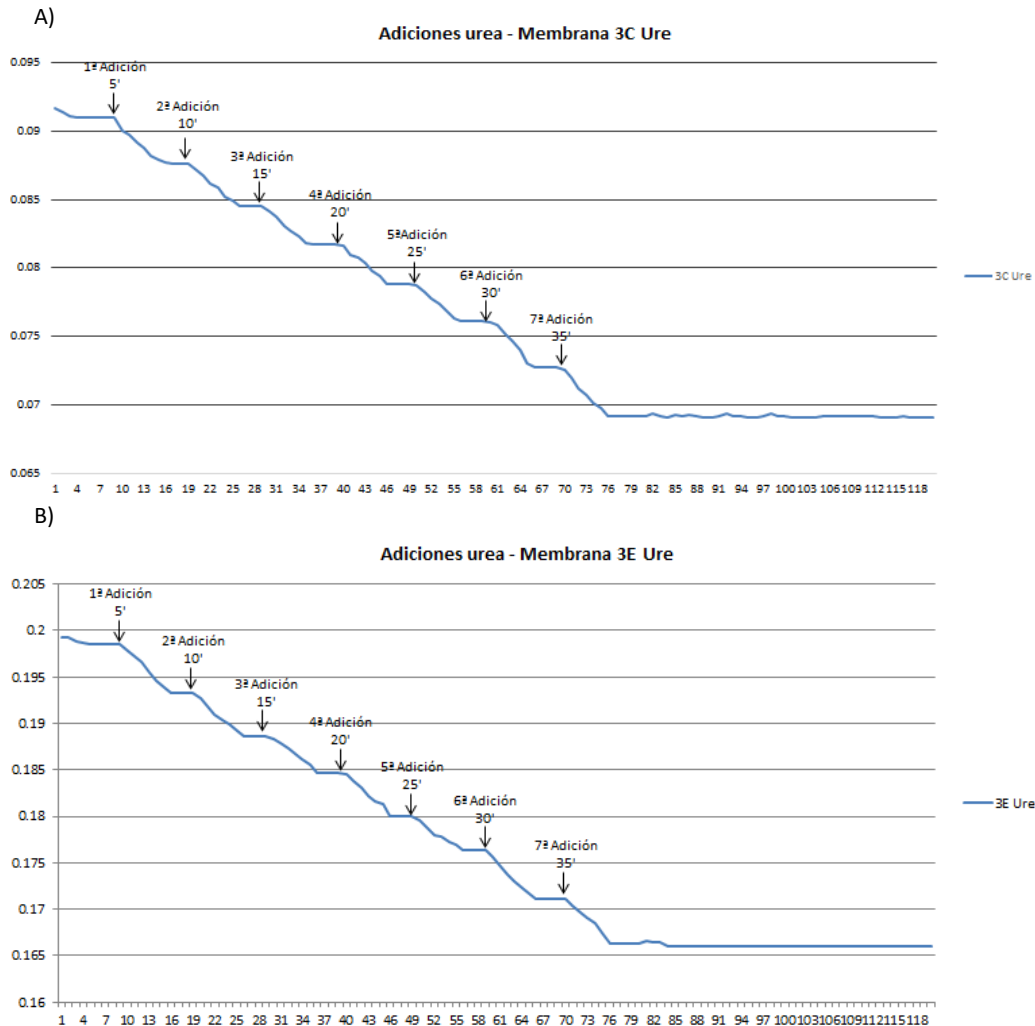


Figura 22: A) Resultado de las adiciones de 20µl de urea 0.1M en leche entera con el sensor 3C Ure. B) Resultado de las adiciones de 20µl de urea 0.1M en leche entera con el sensor 3E Ure.

Del mismo modo que en los casos anteriores, en ausencia de la enzima ureasa los sensores no son capaces de registrar el descenso del potencial manteniéndose este constante a lo largo de todo el experimento, con la excepción del sensor con la membrana 3B LDH. En el caso de este sensor, se produce una variación de potencial 0.007 voltios que aumenta y disminuye a lo largo del proceso lo que indica un fallo puntual en la conexión del sensor.

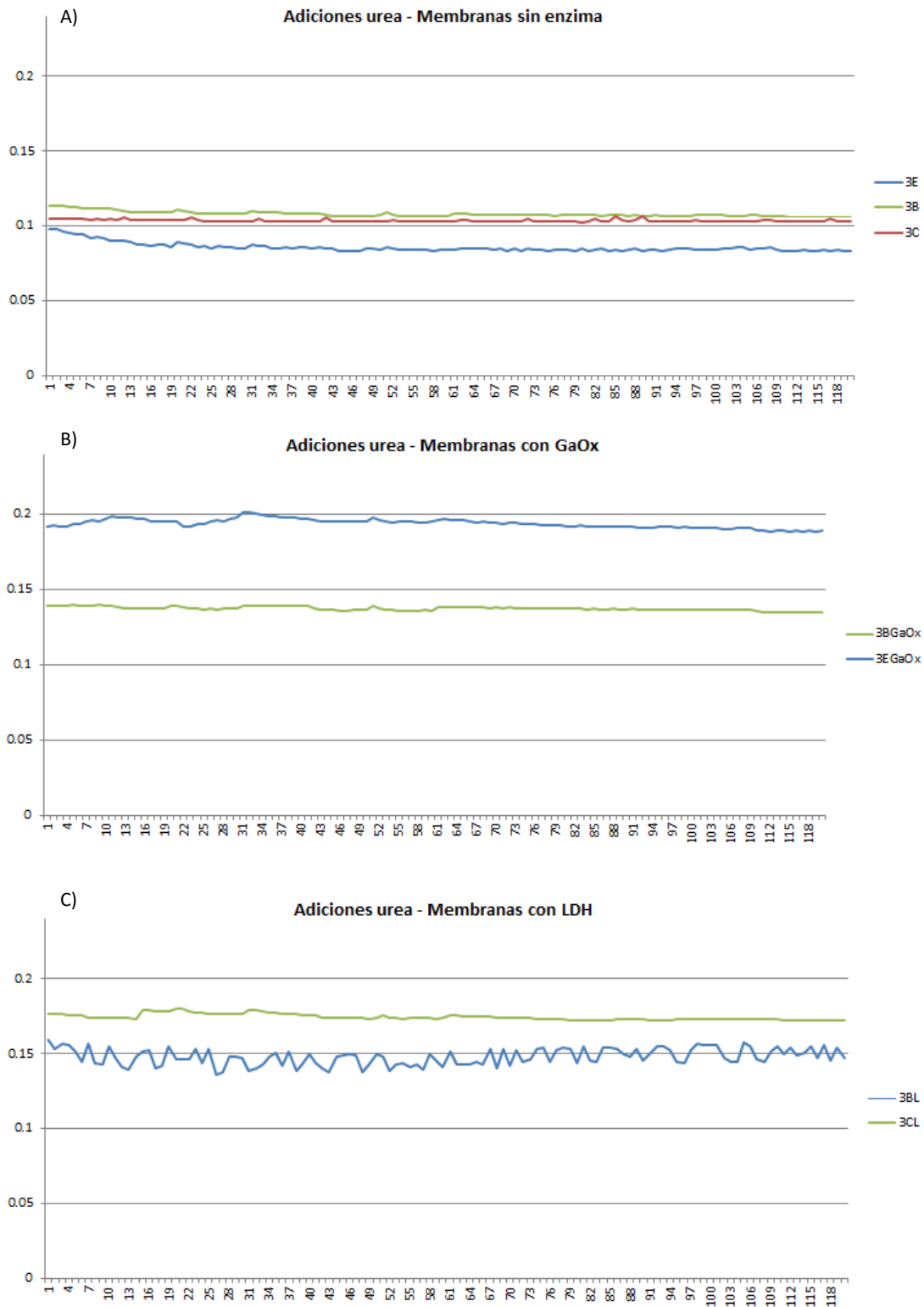


Figura 23: A) Resultado de las adiciones de 20µl de urea 0.1M en leche entera de los sensores sin enzima B) Resultado de las adiciones de 20µl de urea 0.1M en leche entera de los sensores con GaOx. C) Resultado de las adiciones de 20µl de urea 0.1M en leche entera de los sensores con LDH.

Los resultados obtenidos en el análisis de adiciones de los diferentes compuestos de interés demuestran que los sensores modificados con enzimas son capaces de distinguir concentraciones

crecientes de urea, ácido láctico y galactosa, que de otra forman no serían detectadas tal y como ocurre en el caso de los sensores que no presentan enzimas.

4.3.2 Análisis de muestras de leche

Como estudio previo a la aplicación de la lengua bioelectrónica en la clasificación de muestras de leche, se analizaron muestras de leche de diferentes marcas y con diferente contenido de materia grasa con objeto de dilucidar si la lengua electrónica diseñada era capaz de discriminar entre muestras diferentes.

En la Figura 24 puede observarse como todos los sensores son capaces de diferenciar entre las leches semidesnatada, desnatada y entera; ordenándose estas siempre de mayor a menor potencial respectivamente. Estos resultados parecen indicar que el dispositivo desarrollado será capaz de diferenciar entre las diferentes variedades de leche a analizar en el presente trabajo.

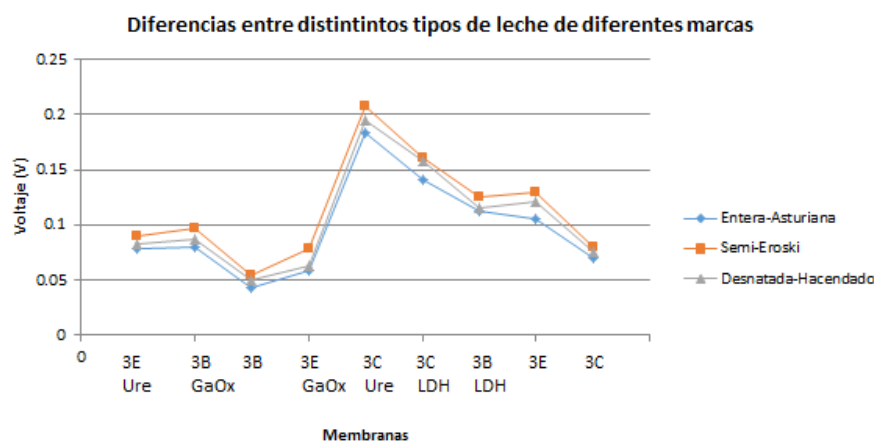


Figura 24: Estudio previo de la lengua bioelectrónica en muestras de leche.

A continuación, se procedió al análisis de las muestras de leche facilitadas por Calidad Pascual, que comprendían 13 tipos diferentes de leches agrupadas en cinco grupos en función de sus propiedades nutricionales (leche clásica, leche sin lactosa, leche con calcio, leche con ácido fólico y leche pro-active). Para facilitar el análisis de los resultados obtenidos los diferentes estudios se realizaron en función del contenido en materia grasa de los diferentes tipos de leche (leche desnatada, semidesnatada y entera) o bien en función de las características nutricionales.

En la Figura 25 se observan los resultados obtenidos por la lengua electrónica en función de sus características nutricionales. En todos los casos se observa que los sensores son capaces de distinguir entre leche desnatada, semidesnatada y entera, ordenándose estas en siempre de mayor a menor potencial empezando por la leche semidesnatada, seguida de la desnatada y finalmente la leche entera, lo que indicaría que un mayor contenido en materia grasa en la muestra da como resultado un menor potencial. Además, los mejores resultados en el caso de la leche clásica se obtuvieron con las membranas 3B, 3B LDH y 3E; en el caso de la leche sin lactosa con las membranas 3E GaOx, 3C LDH y 3B; para la leche con calcio los mejores resultados se observaron con las membranas 3B y 3B LDH; y finalmente para la leche con ácido fólico también se obtuvo el mejor resultado con la membrana 3E GaOx.

A)

B)

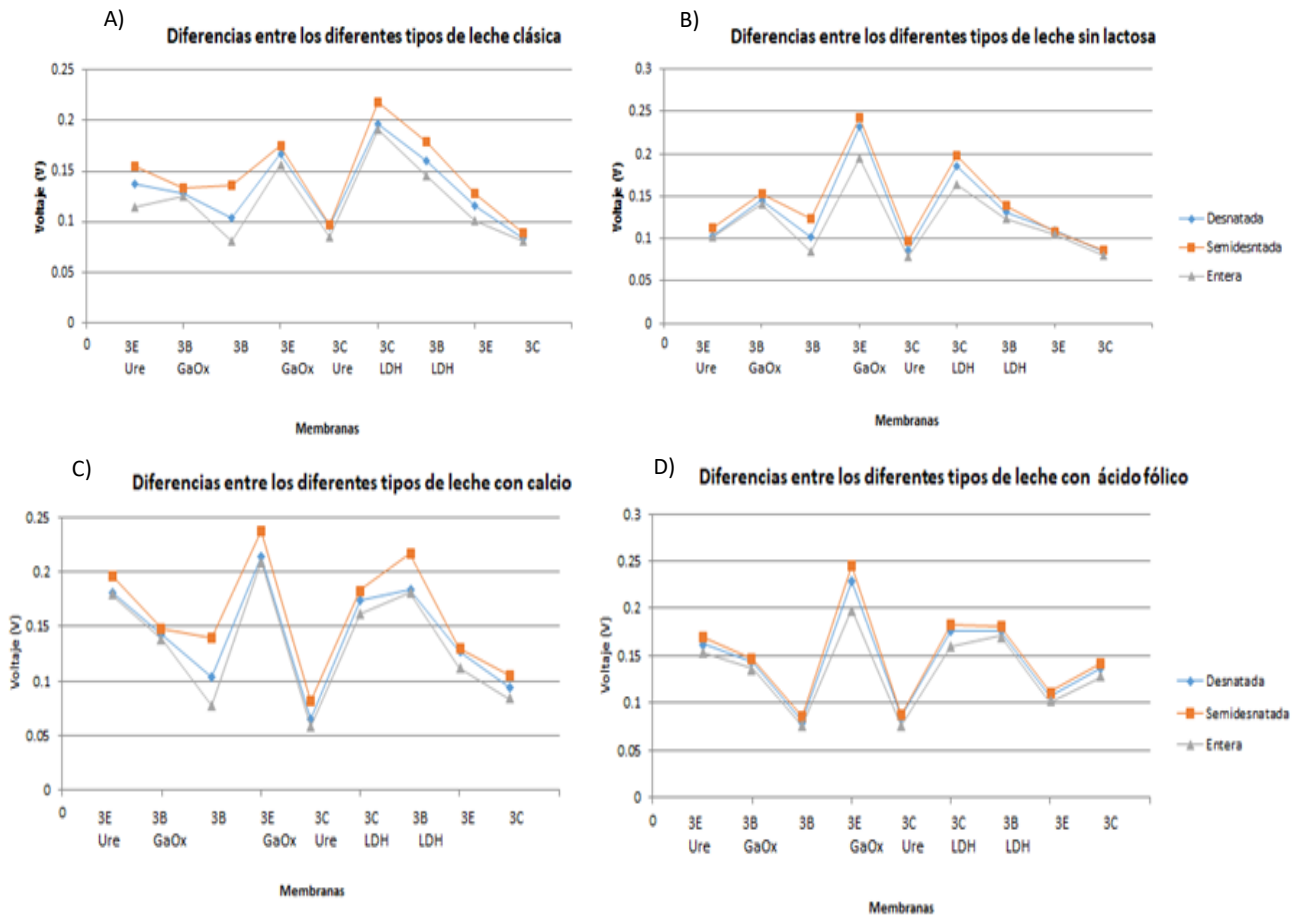


Figura 25: A) Resultados obtenidos por la lengua electrónica en leche clásica. B) Resultados obtenidos por la lengua electrónica en leche sin lactosa. C) Resultados obtenidos por la lengua electrónica en leche con calcio. D) Resultados obtenidos por la lengua electrónica en leche con ácido fólico.

Si bien prácticamente todos los sensores fueron capaces de distinguir entre los tres tipos de leche en función de su contenido graso, las membranas 3E y 3C parecen mostrar una menor capacidad para diferenciar entre los tipos de leche sin lactosa, así como la membrana 3C en el caso de la leche clásica. No obstante, estas representaciones gráficas únicamente permiten hacerse una idea de la capacidad de distinción de los sensores y será necesario un análisis estadístico de los resultados obtenidos para asegurar que los sensores desarrollados son capaces de realizar estas discriminaciones.

Del mismo modo, en la Figura 26 se presentan las gráficas resultantes de comparar los distintos tipos de leche según su variedad nutricional para los tres tipos de contenidos en materia grasa. En este caso, observamos que los resultados obtenidos no permiten distinguir con la misma facilidad que en el caso anterior entre las diferentes variedades de leche, además los resultados obtenidos tampoco parecen mostrar un orden lógico en función de su potencial. Si nos fijamos en la leche desnatada el sensor 3E GaOx y el 3C Ure son aquellos que muestran un mejor resultado, mientras el sensor 3D no parece distinguir entre las cuatro variedades de leche.

Del mismo modo, para la leche entera las membranas 3E Ure, 3E GaOx y 3B LDH son aquellas que parecen ser capaces de distinguir entre las cuatro variedades de leche, mientras que las membranas 3B y 3E tan solo son capaces de distinguir aparentemente entre dos variedades de leche. Por último, en el caso de la leche de semidesnatada observamos como los resultados obtenidos por los sensores

en general parecen mostrar una cierta mejora en su capacidad de distinción pese a haber, en este caso, un total de cinco variedades de leche; siendo de nuevo la membrana 3E GaOx la que obtuvo los mejores resultados y la membranas 3B la que presentó peor discriminación.

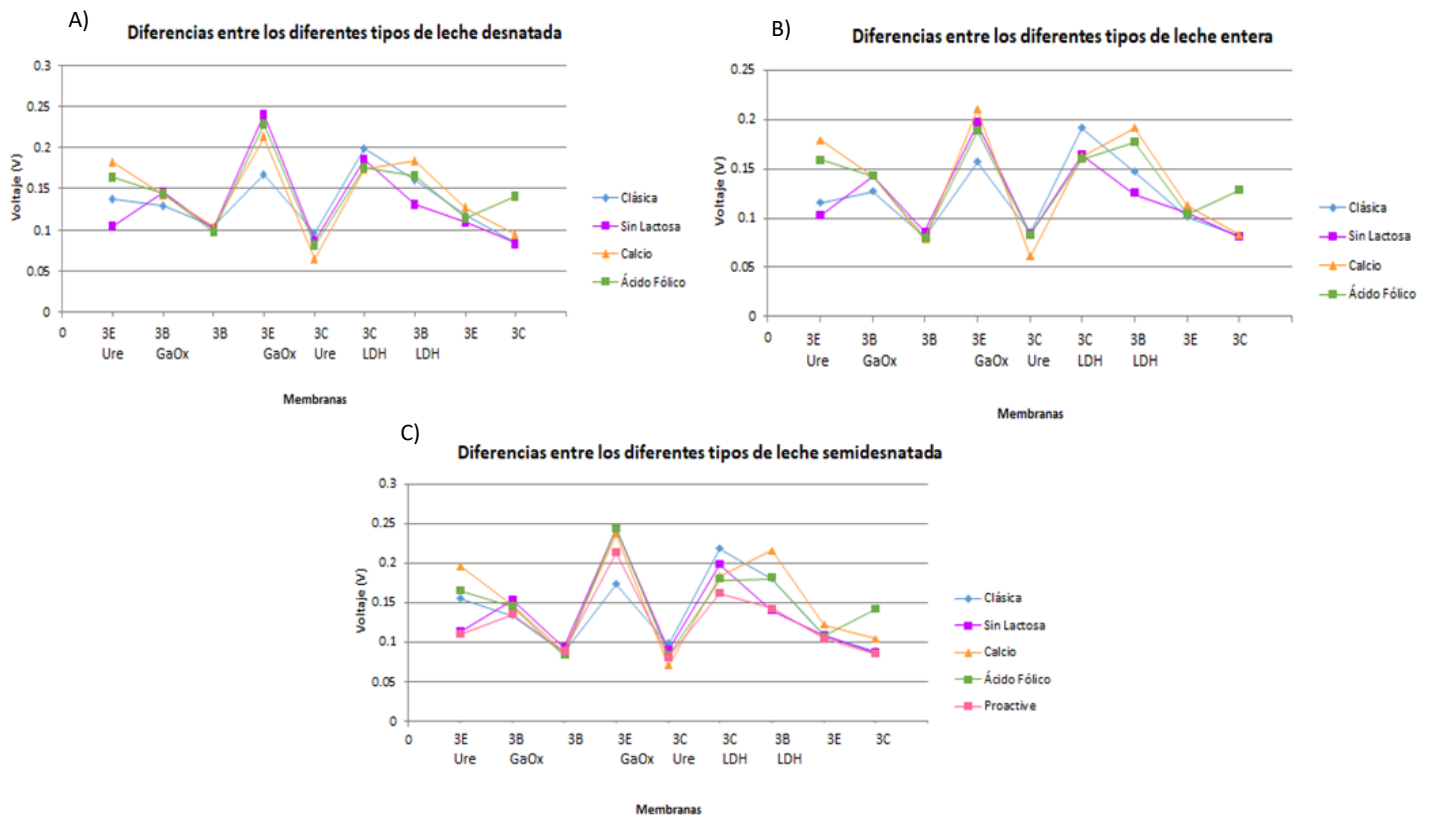


Figura 26: A) Resultados obtenidos por la lengua electrónica en leches desnatadas. B) Resultados obtenidos por la lengua electrónica en leches enteras. C) Resultados obtenidos por la lengua electrónica en leches semidesnatadas.

Si bien los resultados anteriores parecen indicar que los sensores podrían no ser capaces de distinguir entre las diferentes características nutricionales de la leche, es necesario realizar un análisis estadístico multivariante que nos permita confirmar o desmentir esta deducción, para ello se empleó la técnica estadística del análisis por componentes principales.

PCA de los diferentes tipos de leche desnatada

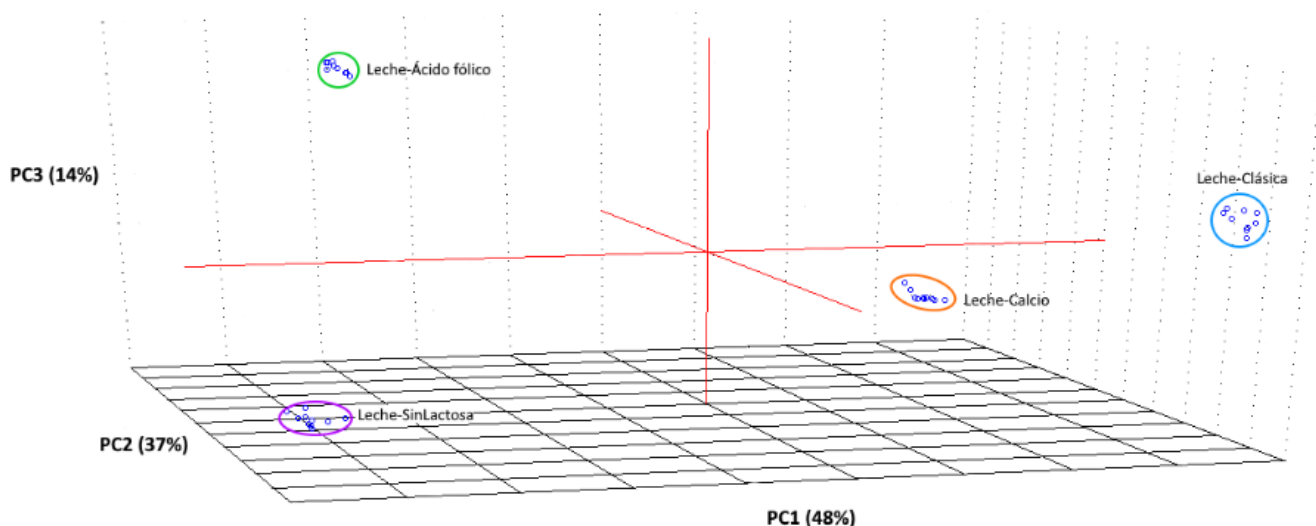


Figura 27: Diagrama de scores del análisis por PCA de los diferentes tipos de leche desnatada.

El análisis por componentes principales se realizó en función del contenido en materia grasa de las para los diferentes tipos de leche con características nutricionales distintas. En la Figura 27 puede observarse cómo este análisis permite obtener un modelo en el cual se diferencian perfectamente los cuatro tipos de leche desnatada empezando desde la derecha con la leche clásica, seguida de la leche con calcio y por último la leche con ácido fólico y la leche sin lactosa. Además, la información recogida en las tres primeras componentes suma el 99 % de la información del modelo, siendo la mayor varianza de un 48 % en la primera componente, seguida de un 37 % en la segunda componente. Estos datos nos indican que existe una gran cantidad de información contenida tanto en la primera como la segunda componente, entre las cuales alcanza un 85% de la varianza del sistema.

En el caso de la leche semidesnatada (Figura 28), observamos como el diagrama de scores obtenido del análisis por componentes principales también permite distinguir entre los cinco tipos de leche con un total del 86% de la información original del conjunto de datos en las primeras tres componentes. En este caso, observamos que los cinco tipos de leche se distinguen claramente entre sí, siendo la leche con ácido fólico y la leche pro-active aquellas que aparecen más próximas entre sí, lo cual tiene sentido dado que pertenecen a un mismo tipo de leches producidas por Leche Pascual denominadas como “Flora”.

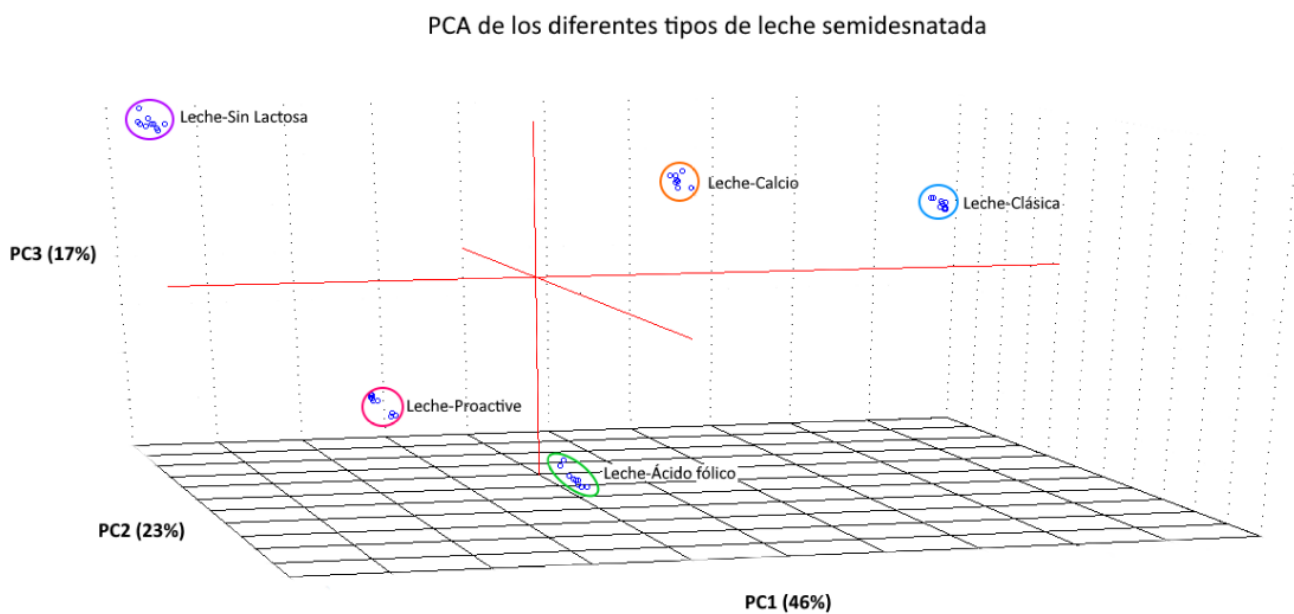


Figura 28: Diagrama de scores del análisis por PCA de los diferentes tipos de leche semidesnatada.

Por último, en la Figura 29 se muestra el diagrama de scores resultado del análisis por componentes principales de los diferentes tipos de leche entera, cuyo resultado da lugar a un modelo que contiene de nuevo el 99% de la información en sus primeras tres componentes y que permite distinguir perfectamente los cuatro tipos de leche, cada uno de los cuales aparece en un cuadrante diferente del gráfico lo que indica que existen grandes diferencias entre los mismos.

PCA de los diferentes tipos de leche entera

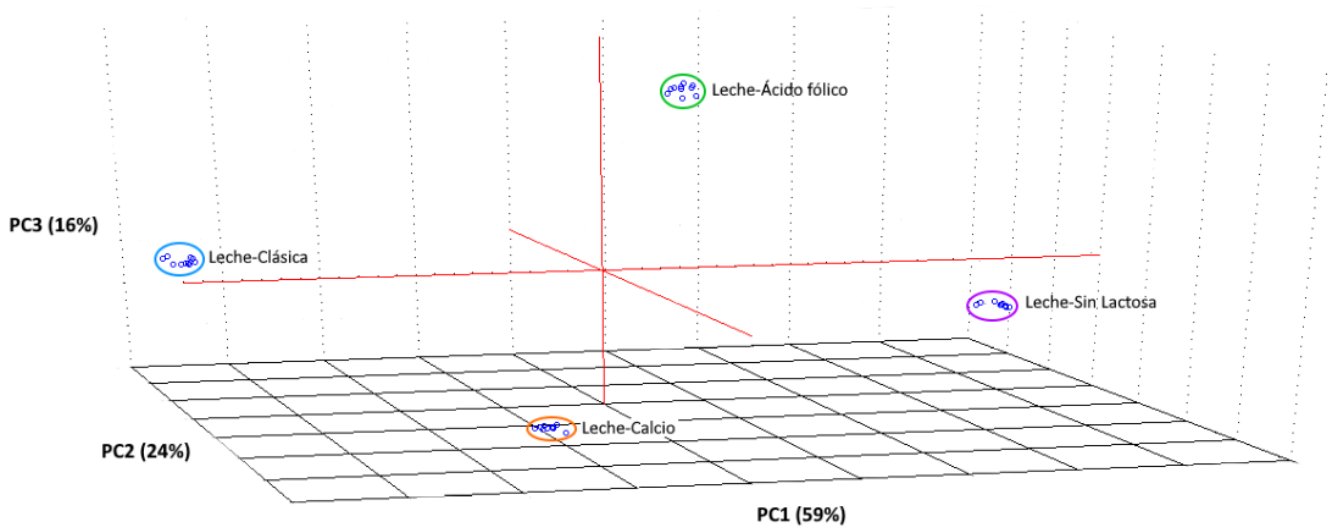


Figura 29: Diagrama de scores del análisis por PCA de los diferentes tipos de leche entera.

Por otra parte, también se puede realizar un estudio estadístico conjunto por componentes principales de todos los tipos de leche independientemente de su contenido en materia grasa o sus características nutricionales. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 30, en la cual se puede observar cómo el modelo permite distinguir no solo entre los 13 tipos de leche sino que además estos aparecen agrupados en función de sus características nutricionales, lo que nos permite confirmar que la lengua electrónica desarrollada es capaz de clasificar los diferentes tipos de leche estudiados.

PCA de todos los tipos de leche

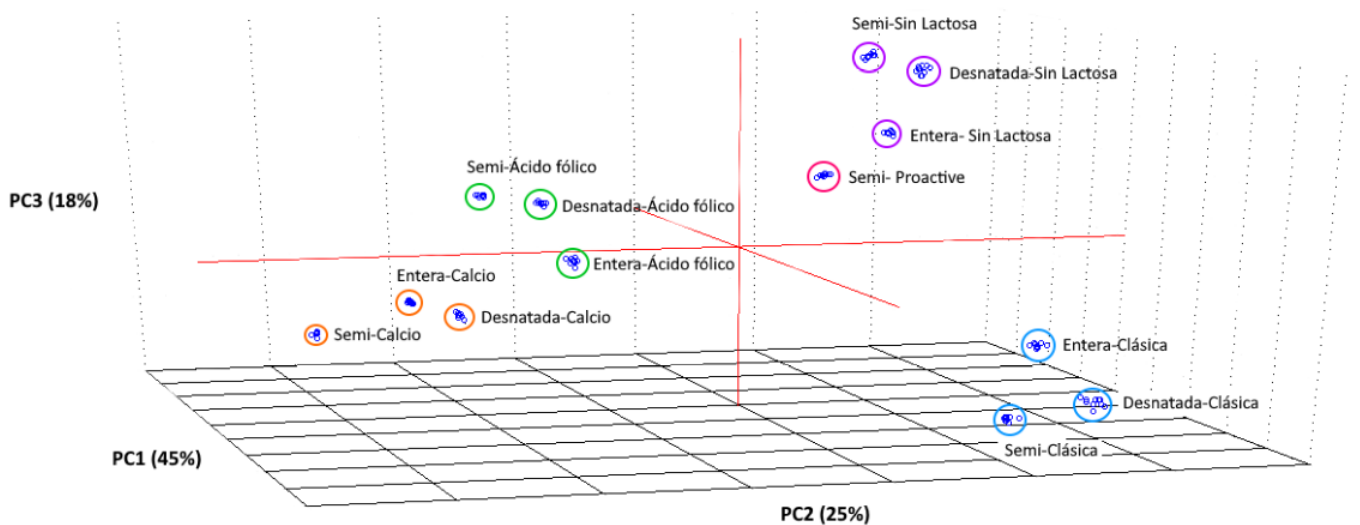


Figura 30: Diagrama de scores del análisis por PCA de los diferentes tipos de leche.

Además, si observamos el porcentaje de información que contienen las tres primeras componentes del modelo observamos que estas alcanzan el 88 % de la información del conjunto original de datos, con la intención de mejorar este resultado y conseguir un modelo todavía más preciso es posible realizar otros tipos de análisis multivariantes que además permitan realizar predicciones para el análisis de futuras muestras.

Con la intención de desarrollar un modelo capaz de llevar a cabo la clasificación de los diferentes tipos de leche, así como la posible predicción de características de interés de futuras muestras, se realizó un análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS) en el cual no sólo se utilizaron los datos obtenidos por la lengua electrónica sino que además utilizaron los datos fisicoquímicos, aportados por Calidad Pascual, de las diferentes muestras de leche.

Por tanto, este estudio se ha llevado a cabo con la intención de estudiar si, a partir de los resultados obtenidos del análisis de las leches por la lengua electrónica, se podrían determinar los parámetros químicos que tradicionalmente se obtienen mediante análisis en laboratorios.

Si observamos el diagrama de scores resultado de la PLS (Figura 31) obtenemos como resultado un modelo que contiene el 91% de la información del modelo en sus tres primeras componentes siendo este capaz no solo de distinguir los diferentes tipos de leche sino además de agruparlas en función de sus características nutricionales. Además, en este caso se observa como a lo largo del eje correspondiente a la tercera componente los diferentes tipos de leche se ordenan en función de su contenido en materia grasa, apareciendo en la parte superior la leche entera seguida de la leche desnatada y finalmente la leche semidesnatada, justo al contrario de cómo se presentaban los potenciales de membrana para cada tipo de leche en la Figura 24.

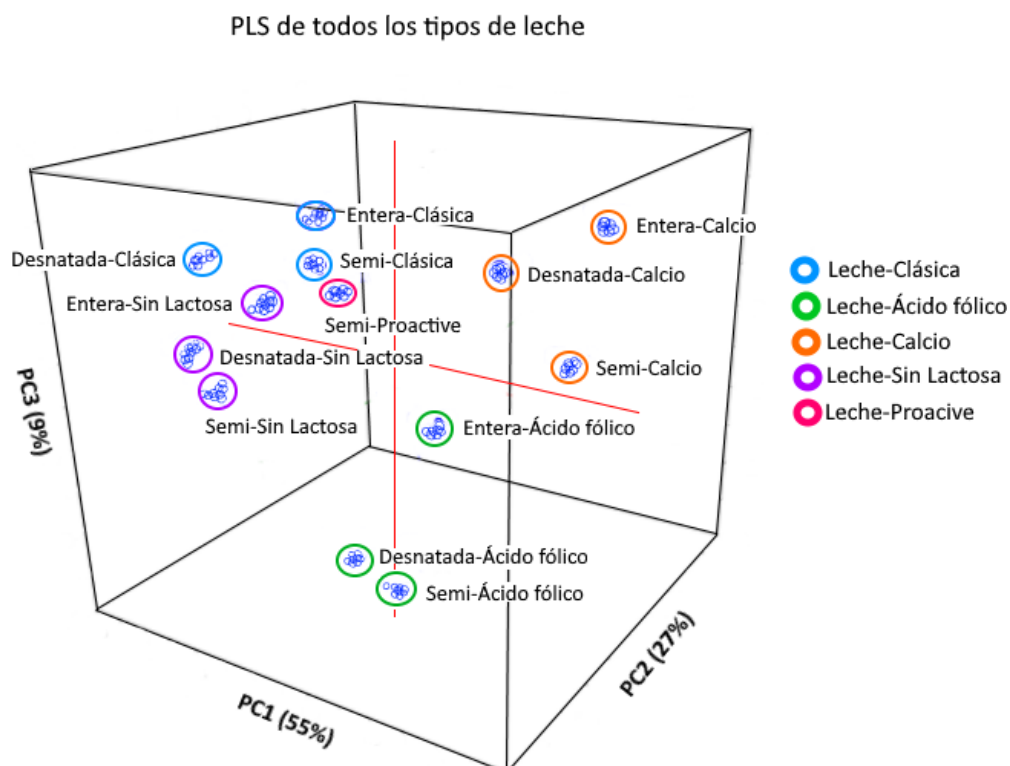


Figura 31: Diagrama de scores del análisis por PLS de los diferentes tipos de leche.

Si observamos la Figura 32 puede verse como aumenta la información contenida en el modelo a medida que aumenta el número de componentes estudiadas. Si bien el modelo alcanza el máximo en su séptima componente, la estabilización de la curva entre la tercera componente y la quinta puede indicar que la información aportada por las últimas dos componentes podría deberse a que se esté modelando parte del error del sistema. Es por ello que consideraremos el número óptimo de componentes como cinco.

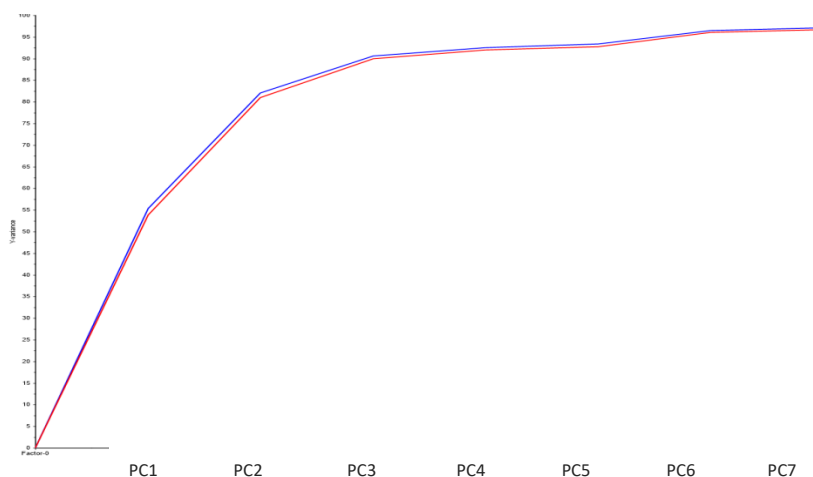


Figura 32: Diagrama de la variación de varianza explicada respecto del número de componentes principales.

Por último, la Tabla 9 recoge los resultados obtenidos en el modelo de regresión (PLS) que correlacionan los datos potenciométricos de la lengua electrónica con los parámetros químicos de las muestras de leche. En la tabla se muestran los siguientes parámetros:

- R^2_c : coeficiente de correlación en la calibración
- $RMSE_c$: error cuadrático medio de la calibración
- R^2_p : coeficiente de correlación en la predicción
- $RMSE_p$: error cuadrático medio en la predicción

Tabla 9: Resultados obtenidos en el modelo de regresión (PLS).

Parámetro	R^2_c	$RMSE_c$	R^2_p	$RMSE_p$	Variables latentes
Acidez	0.9861	0.1157	0.9847	0.1222	5
Densidad	0.9865	0.1154	0.9849	0.1221	5
%Proteína	0.9886	0.1051	0.9871	0.1116	5
%MG	0.9744	0.1608	0.9724	0.1711	5
%Lact	0.9843	0.1236	0.9829	0.1306	5
%ESM	0.9938	0.0771	0.9929	0.0816	5
%EST	0.9756	0.1564	0.9737	0.1667	5

Tal y como puede observarse, se encontraron buenas correlaciones tanto para la calibración como para la predicción, con coeficientes de correlación en todos los casos por encima del 0.95, además se obtuvieron valores bajos en los errores cuadráticos medios. Las mejores correlaciones se obtuvieron con respecto a los parámetros de %ESM, Proteína y Densidad, mientras que las peores correlaciones se obtuvieron para el contenido en materia grasa.

El número de variables indica el número de variables latentes necesarias para explicar la covarianza que existe entre la matriz de datos obtenidos con la lengua bioelectrónica potenciométrica y la matriz de datos procedente de los parámetros químicos obtenidos en los laboratorios. Un menor número de variable es indicativo de que la correlación entre las matrices es más alta, en este caso se ha considerado que el número de variables es de 5 para obtener la mayor información posible sin que ello suponga modelar parte del error del sistema.

Por lo tanto, con estos resultados preliminares se puede esperar que la lengua biopotenciométrica desarrollada en el presente trabajo pueda utilizarse para establecer modelos de predicción que permitan analizar las muestras de leche, clasificarlas y predecir parámetros químicos de interés para la industria láctea.

Por último, las Figuras 33, 34 y 35 muestran algunos ejemplos de la reproducibilidad de la lengua bioelectrónica. En las siguientes figuras ponemos observar como a lo largo de las cinco repeticiones, entre las cuales los sensores fueron extraídos de la muestra de leche y lavados, el potencial que registran no sufre ninguna variación, aportando una gran reproducibilidad al sistema.

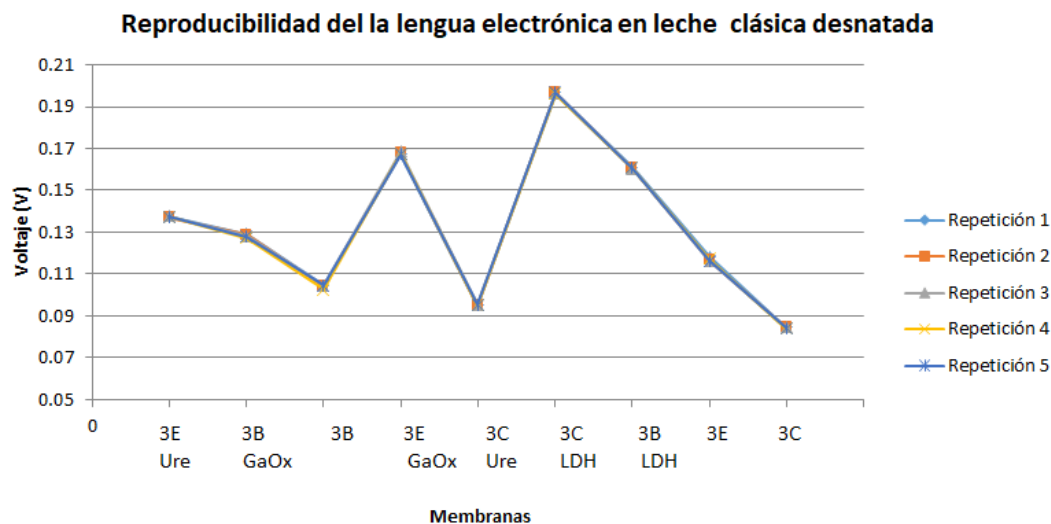


Figura 33: Reproducibilidad de la lengua electrónica en leche clásica desnatada.

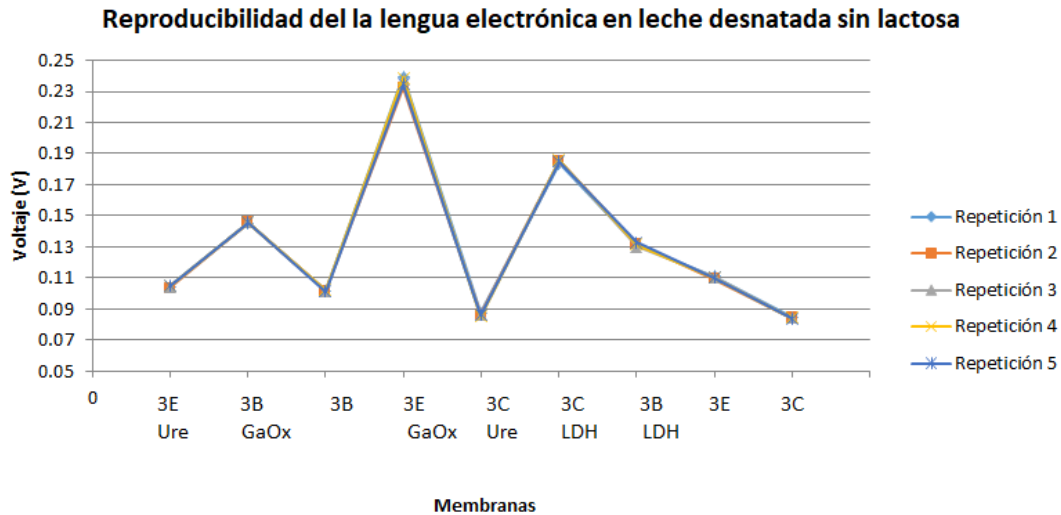


Figura 34: Reproducibilidad de la lengua electrónica en leche desnatada sin lactosa.

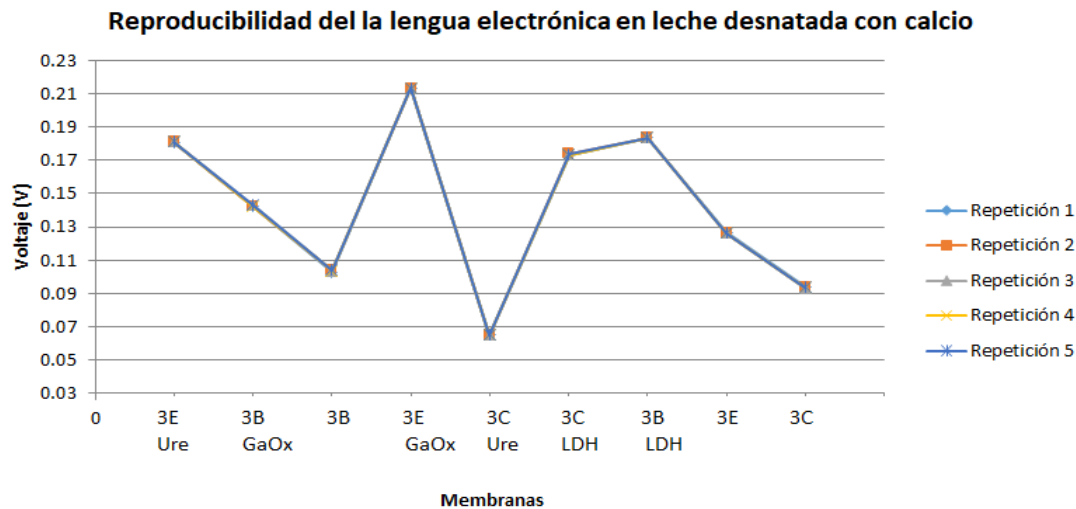


Figura 35: Reproducibilidad de la lengua electrónica en leche desnatada con calcio.

5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas como resultado del presente Trabajo de Fin de Master son las siguientes:

- La modificación de las membranas poliméricas con la adicción de nanopartículas de oro en su composición y el uso de enzimas unidas covalentemente a su superficie dio como resultado un incremento de la capacidad de los diferentes sensores para distinguir entre compuestos y entre las diferentes concentraciones de estos compuestos de interés. Además, se ha demostrado que las enzimas inmovilizadas responden de manera específica en presencia de sus sustratos sin que ello suponga una menor capacidad para diferenciar entre concentraciones de otros compuestos de interés.

- El sistema de sensores empleado presenta la capacidad de diferenciar entre los estándares básicos de sabor: salado (KCl y CaCl₂), ácido (ácido láctico), dulce (galactosa) y amargo (urea); tal y como demuestran los resultados del análisis por componentes principales.
- A partir de los sensores desarrollados para el análisis de los estándares de sabor básicos y mediante el análisis de los resultados obtenidos en la PCA, es posible realizar una simplificación de la lengua electrónica. Esta nueva lengua electrónica compuesta de 9 sensores fue capaz de distinguir incrementos en las concentraciones de productos de interés para la industria láctea, gracias a la utilización de enzimas dirigidos contra ellos, las cuales mejoran la sensibilidad de los sensores hacia la urea, el ácido láctico y la galactosa.
- Utilizando la lengua bioelectrónica potenciométrica desarrollada se realizaron medidas en trece muestras de leche con diferentes características nutricionales y, mediante la aplicación del análisis por componentes principales (PCA) en el tratamiento de los datos, se obtuvo como resultado que la lengua electrónica era capaz de discriminar entre todas las muestras de leche de vaca en función de su contenido en materia grasa y según sus características nutricionales.
- En cuanto al análisis mediante mínimos cuadrados parciales (PLS) realizado con las trece muestras de leche, no solo se pudo realizar la clasificación de las mismas sino que se obtuvieron buenas correlaciones entre los datos obtenidos por el sistema de la lengua potenciométrica y los datos químicos aportados por los laboratorios de Calidad Pascual. Este hecho demuestra que la lengua electrónica se puede utilizar como sistema de clasificación de muestras de leche y además podría utilizarse como sistema de predicción de los parámetros químicos de futuras muestras de leche.
- Finalmente, hay que considerar que se trata de un sistema portátil, barato y que realiza medicadas de forma rápida, lo que permitiría su empleabilidad en procesos industriales reduciendo de manera significativa tanto el tiempo de trabajo como los costes.
- Como perspectivas de futuro, el dispositivo desarrollado podría adaptarse para su implantación en planta con medidas en tiempo real que proporcionarían información sobre el estado del proceso permitiendo llevar a cabo medidas correctivas de forma rápida y eficaz. Además, se podría rediseñar la forma de la lengua bioelectrónica de forma que disminuyendo su tamaño se obtuviera un dispositivo compacto de fácil transporte para su aplicación fuera de la cadena de producción.

6. Bibliografía

1. Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español (Boletín Oficial del Estado, núm. 248, de 17 de octubre de 1967). BOE-A-1967-16485 Texto Consolidado. Última modificación 17 de diciembre de 2016 Disponible en: <http://www.boe.es/buscar/pdf/1967/BOE-A-1967-16485-consolidado.pdf>
2. Fundación Española de Nutrición FEN y Fundación Iberoamericana de Nutrición FINU. *La leche como vehículo de salud para la población*, (2015).
3. Ruiz, A.L & Velo D.B. La leche composición y características. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura Pesca y Desarrollo Rural, (2015)
4. CODEX ALIMENTARIUS, *Leche y productos lácteos 2ª Edición*. Codex Aliment. Leche y Prod. lácteos, p. 2-265 (2011).
5. Real Decreto 1728/2007 del 21 de diciembre *por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el real decreto 217/2004 del 6 de febrero por el que se regulan la identificación y registro*. Real decreto, Ministerio de la Presidencia, España.
6. Mallqui, L.A. *Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos*. Libros y editoriales TEIA, (2014)
7. Ruiz, A.L, Velo, D.B, Muñoz, J.J. & Luque, J.M. *Determinaciones en leche, analíticas*. Consejería de Agricultura Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de investigación y Formación Agraria de Córdoba, (2015).
8. Real Decreto 1533/1986 1 del 18 de octubre *por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos*. Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la secretaria del gobierno. Agencia estatal, Boletín Oficial del Estado.
9. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Leche y productos lácteos. Calidad y evaluación*. Disponible en: http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productoslacteos/calidad-y-evaluacion/es/#.WRA7Kt11_IV
10. FeNIL. El sector lácteo en España 2019. Disponible en: <http://fenil.org/sector-industrial-lacteo/>
11. Sliwinska, M., Wisnievska, P., Dymerski, T. & Wardencki, W. *Advances in Electronic Noses and Tongues for Food Authenticity Testing*. Technology and Nutrition. Advances in Food Authenticity Testing p. 201-225, (2016).
12. Alais, Ch. *Física y fisicoquímica. Efectos de los tratamientos tecnológicos. Ciencia de la leche*. Principios de técnica lechera, España: Reverte S.A p. 253-319, (1985).
13. Yáñez Brea F. *Las 20 Tecnologías Clave De La Industria 4.0*. [S.l.] (2017).
14. LILCYL Junta de Castilla y León. *Industria Láctea 4.0 Avanzando hacia a fabrica inteligente del futuro*, (2017).

15. Tahara, Y. & Toko, K. *Electronic Tongues—A Review*. IEEE Sensors Journal 13, p. 3001-3011, (2013).
16. Dias L, Peres A, Veloso A, Reis F, Vilas-Boas M, Machado A. *An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk*. Sensors and Actuators B: Chemical. 136, p. 209-217 (2009).
17. Yu. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C.DiNatale, A. D'Amico, *Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids*, (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry 77 p.1965–1983 (2005).
18. P. Ciosek, E. Augustyniak, W. Wróblewski, *Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitive electrode-based electronic tongue for qualitative analysis of beverages*, Analyst 129 p.639–644 (2004).
19. K. Brudzewski, S. Osowski, T. Markiewicz, *Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network*, Sensors and Actuators B 98 p. 291–298 (2004).
20. Rodriguez Mendez, M.L., *Electronic Noses and Tongues in the Food Industry*, Ed:Elsevier Inc:Amsterdam, The Netherlands, (2016).
21. Winqvist, F., *Voltammetric electronic tongues—Basic principles and applications*, Microchim. 163, nos. 1–2, p. 3–10 (2008).
22. A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, C. Di Nataleb, and A. D'Amicob, *Evaluation of italian wine by the electronic tongue: Recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception*, Anal. Chim. 484, p. 33–44, (2003).
23. Cattrall, R.W. *Chemical Sensors*. Oxford:Oxford Science Publications (1997).
24. Lalauze R. *Chemical Sensors And Biosensors*. London: ISTE; (2012).
25. Honeychurch K, Piano M. *Electrochemical (Bio) Sensors for Environmental and Food Analyses*. Biosensors (Basel). 8, 57 (2018).
26. Alegret S, Martínez-Fàbregas E. *Biosensors based on conducting filled polymer all-solid-state pvc matrix membrane electrodes*. Biosensors (Basel). 4, p.287-297 (1989).
27. Viswanathan S. , Radecki J. *Nanomaterials in electrochemical biosensors for food analysis - a review*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 58, p.157-164 (2008).
28. Mello L.D., Kubota L.T., *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. Food Chemistry 77, p. 237–256 (2002).
29. Trivedi U, Lakshminarayana D, Kothari I et al. *Potentiometric biosensor for urea determination in milk*. Sensors and Actuators B: Chemical. 140 p. 260-266 (2009).
30. Chan D, Barsan M, Korpan Y, Brett C. *L-lactate selective impedimetric bienzymatic biosensor based on lactate dehydrogenase and pyruvate oxidase*. Electrochim Acta. 231, p. 209-215 (2017).

31. 12. Rajendran V, Irudayaraj J. *Detection of Glucose, Galactose, and Lactose in Milk with a Microdialysis-Coupled Flow Injection Amperometric Sensor*. Journal of Dairy Science. 85, p.1357-1361 (2002).
32. 4. Bakker E., *Electrochemical sensors*. Anal. Chem. 76, p. 3285–3298, (2004).
33. Chen J., Miao Y., He N., Wu X., Li., *Nanotechnology and biosensor*. Biotechnology. Advm 22, p. 505–518 (2004).
34. Stobiecka A., Radecka H., Radeck J., *Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples*. Biosensor and. Bioelectronics, 22, p. 2165–2170 (2007).
35. Vamvakaki V., Chaniotakis N.A., *Pesticide detection with a liposome-based nanobiosensor*. Biosens. Bioelectron, 22, p. 2848–2853 (2007).
36. D. Rooij, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Anti-Corrosion Methods and Materials.50, (2003).
37. E. Bakker, E. Pretsch, *Potentiometry at trace levels*, Trends Analytical Chemistry. 20, p. 11–19 (2001).
38. J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstam, *Potentiometric ion sensors*, Chemistry. Rev. 108, p. 329–351 (2008).
39. Yin T, Qin W. *Applications of nanomaterials in potentiometric sensors*. Trends in Analytical Chemistry.51, p. 79-86 (2013).
40. 15. Abdalla N, Youssef M, Algarni H, Awwad N, Kamel A. *All Solid-State Poly (Vinyl Chloride) Membrane Potentiometric Sensor Integrated with Nano-Beads Imprinted Polymers for Sensitive and Rapid Detection of Bispyribac Herbicide as Organic Pollutant*. Molecules. 24 (2019).
41. Mohy Eldin, M.S., Elaassar, M.R., Elzatahry, A.A., Al-Sabah, M.M.B. and Hassan, E.A., *Covalent immobilization of β -galactosidase onto amino-functionalized PVC microspheres*. J. Appl. Polym. Sci. 125, p. 1724-1735 (2012).
42. Viswanath, S., Wang, J., Bachas, L.G., Butterfield, D.A. and Bhattacharyya, D. *Site-directed and random immobilization of subtilisin on functionalized membranes: Activity determination in aqueous and organic media*. Biotechnology. Bioengineering. 60, p. 608-616 (1998).
43. Gutiérrez M, Alegret S, del Valle M. *Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples*. Biosensors and Bioelectronics.23, p. 795-802 (2008).
44. G.G. Guilbault, J.G.Montalvo Jr., *Urea-specific enzyme electrode*, J. Am. Chemistry. Soc. 91 p. 2164–2165 (1969).
45. Ramesh R, Puhazhendi P, Kumar J, Gowthaman M, D'Souza S, Kamini N. *Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized Arthrobacter creatinolyticus urease*. Materials Science and Engineering: C. 45, p. 786-792 (2015).

46. Wang J., *Nanomaterial-based electrochemical Biosensors*. *Analyst*, 130, 421–426 (2005).
47. Jaworska E, Wójcik M, Kisiel A, Mieczkowski J, Michalska A. *Gold nanoparticles solid contact for ion-selective electrodes of highly stable potential readings*. *Talanta*. 85, p. 1986-1989 (2011).
48. Woźnica E, Wójcik M, Wojciechowski M et al. *Dithizone Modified Gold Nanoparticles Films for Potentiometric Sensing*. *Analytical Chemistry* 84, p. 4437-4442 (2011).
49. Woźnica E, Wójcik M, Mieczkowski J, Maksymiuk K, Michalska A. *Dithizone Modified Gold Nanoparticles Films as Solid Contact for Cu²⁺-Ion-Selective Electrodes*. *Electroanalysis*. 25 p.141-146 (2012).
50. 14. Çevik E, Şenel M, Baykal A. *Potentiometric urea biosensor based on poly(glycidylmethacrylate)-grafted iron oxide nanoparticles*. *Current Applied Physics*.13, p. 280-286 (2013).
51. 15. Saha K, Agasti S, Kim C, Li X, Rotello V. *Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing*. *Chemistry Rev*. 112, p. 2739-2779 (2012).
52. Johnson R, Wichern D. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. 6th ed. Prentice Hall; 2007.
53. K. Brudzewski, S. Osowski, T. Markiewicz, *Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network*, *Sensors and Actuators B*. 98, p. 291–298 (2004).
54. P. Ciosek, K. Brudzewski, W. Wróblewski, *Milk classification by means of an electronic tongue and Support Vector Machine neural network*, *Measurement Science Technology*. 17, p. 1379–1384 (2006).
55. Rodríguez-Méndez M, De Saja J, González-Antón R, *Electronic Noses and Tongues in Wine Industry*. *Front Bioeng Biotechnology* 4, (2016).
56. P. Ciosek, W. Wróblewski, *The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes*, *Talanta* 69, p. 1156–1161 (2006).
57. P. Ciosek, B. Pokorska, E. Romanowska, W. Wróblewski, *The recognition of growth conditions and metabolic type of plants by a potentiometric electronic tongue*, *Electroanalysis* 18, p.1266–1272 (2006).
58. A. Legin, A. Rudnitskaya, Yu. Vlasov, C. Di Natale, E. Mazzone, A. D’Amico, *Application of electronic tongue for qualitative analysis of complex liquid media*, *Sensors and Actuators B*, 65 p. 232–234 (2000).
59. Dias, L. A., Peres, A. M., Vilas-Boas, M., Rocha, M. A., Estevinho, L., & Machado, A. A. *An electronic tongue for honey classification*. *Microchimica Acta*, 163, 97-102 (2008).
60. F. Winqvist, C. Krantz-Rulcker, P. Wide, I. Lundstrom, *Monitoring of fresh milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry*, *Measurement Science and Technology* 9 p. 1937–1946 (1998).

61. W.A. Collier, D.B. Baird, Z.A. Park-Ng, N. More, A.L. Hart, *Discrimination among milks and cultured dairy products using screen-printed electrochemical arrays and an electronic nose*, *Sensors and Actuators B* 92, p. 232–239 (2003).
62. Mirjana, H., Major, N., Panjkota, I. *Evaluation of milk and dairy products by electronic tongue*. *Scientific note*. p. 193-200 (2009).
63. Hruškar M, Major N, Krpan M, Vahčić N. *Simultaneous determination of fermented milk aroma compounds by a potentiometric sensor array*. *Talanta*. 82:p. 1292-1297 (2010).
64. 12. Wasilewski T, Kamysz W, Gębicki J. *Bioelectronic tongue: Current status and perspectives*. *Biosensors and Bioelectronics*.150 (2020).
65. Ohlsson J, Johansson M, Hansson H et al. *Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products*. *Int Dairy J*. 73, p. 151-154 (2017).
66. GAOA - Galactose oxidase - *Gibberella zeae* (Wheat head blight fungus) - GAOA gene & protein. Uniprot.org. <https://www.uniprot.org/uniprot/POCS93>.
67. Adányi, N., Szabó, E. & Váradi, M. *Multi-enzyme biosensors with amperometric detection for determination of lactose in milk and dairy products*. *Eur Food Reserch Technology* 209, p. 220–226 (1999).
68. Khun K, Ibusoto Z, Nur O, Willander M. *Development of Galactose Biosensor Based on Functionalized ZnO Nanorods with Galactose Oxidase*. *J Sensors*. 1-7 (2012).
69. Sharma S, Suman, Pundir C, Sehgal N, Kumar A. *Galactose sensor based on galactose oxidase immobilized in polyvinyl formal*. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 119, 15-19 (2006).
70. Çevik E, Şenel M, Fatih Abasıyanık M. *Construction of biosensor for determination of galactose with galactose oxidase immobilized on polymeric mediator contains ferrocene*. *Current Applied Physics*.10, p. 1313-1316 (2010).
71. Godden S, Lissemore K, Kelton D, Leslie K, Walton J, Lumsden J. *Factors Associated with Milk Urea Concentrations in Ontario Dairy Cows*. *Journal of Dairy Science*. 84, p. 107-114 (2001).
72. Ezhilan M, Gumpu M, Ramachandra B et al. *Design and development of electrochemical biosensor for the simultaneous detection of melamine and urea in adulterated milk samples*. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 238, p. 1283-1292 (2017).
73. Renny E, Daniel D, Krastanov A, Zachariah C, Elizabeth R. *Enzyme Based Sensor for Detection of Urea in Milk*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 19, p. 198-201 (2005).
74. Ramesh R, Puhazhendi P, Kumar J, Gowthaman M, D'Souza S, Kamini N. *Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized *Arthrobacter creatinolyticus* urease*. *Materials Science and Engineering: C*. 49, p. 786-792 (2015).
75. Urease - *Canavalia ensiformis* (Jack bean). gene & protein Uniprot.org. <https://www.uniprot.org/uniprot/P07374>.

76. Alm L. *Effect of Fermentation on L(+) and D(-) Lactic Acid in Milk*. Journal of Dairy Science. 65, p. 515-520 (1982).
77. Idh - L-lactate dehydrogenase - Thermus caldophilus - Idh gene & protein. Uniprot.org. <https://www.uniprot.org/uniprot/P06150>.
78. Skladal P, Mascini M, Salvadori C, Zannoni G. *Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an l-lactate biosensor*. Enzyme Microb Technol. 15, p.508-512 (1993).
79. Rahman M, Shiddiky M, Rahman M, Shim Y. *A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film*. Analytical Biochemistry. 384, p. 159-165 (2009).
80. Nguyen-Boisse T, Saulnier J, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F. *Highly sensitive conductometric biosensors for total lactate, d- and l-lactate determination in dairy products*. Sensors and Actuators B: Chemical. 179, p. 232-239 (2013).
81. Głąb S, Koncki R, Kopczewska E, Wałczak I, Hulanicki A. *Urea sensors based on PVC membrane pH electrode*. Talanta. 41, p. 1201-1205 (1994).
82. Trammell S, Yu L, Redpath P, Migaud M, Brenner C. *Nicotinamide Riboside Is a Major NAD+ Precursor Vitamin in Cow Milk*. Journal of Nutrition. 146, p. 957-963 (2016).