



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

**GRADO EN INGENIERÍA MECÁNICA**

**SENSORES POTENCIOMÉTRICOS,  
VOLTAMÉTRICOS E IMPEDIMÉTRICOS EN EL  
CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS  
LÁCTEOS**

**Autor:**

**Vázquez Veci, Ismael**

**Tutora:**

**García Cabezón, Ana Cristina**

**CMeIM/EGI/IGGF/IM/IPF**

**Valladolid, Septiembre 2020**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Ana Cristina García Cabezón el permitirme hacer este trabajo con ella y todo lo que me ha enseñado durante este periodo, así como la paciencia y comprensión que ha mostrado conmigo en muchos momentos.

En segundo lugar, agradecer enormemente a la Prof. María Luz Rodríguez Méndez por permitirme unirme al grupo UvaSens y abrirme las pruebas de su laboratorio para permitirme realizar este trabajo. Agradecer también al Prof. Fernando Martín Pedrosa por ayudarme a entender varios aspectos que desconocía y ayudarme a profundizar en el análisis de datos. También a Jose, por ayudarme en todo momento y darme consejos que me han ayudado mucho.

En tercer lugar, me gustaría agradecer a todas las personas con las que he compartido tiempo durante la realización de este TFG, en especial a Clara, con la que he compartido gran parte de este tiempo, haciendo más amenas esas horas interminables de medidas, y por ayudarnos mutuamente en nuestros trabajos en esas partes en las que se solapaban. Mención especial también para Coral, a la que agradezco que sea como es, que nos alegrara a todos el día y que siempre estuviera dispuesta a ayudarme en todo momento y explicarme cada cosa que no entendía, así como compartir con ella muchos momentos, tanto buenos como malos. También agradecer a todos mis compañeros y compañeras de laboratorio, Marta, Celia, Ana, Javi, Alfonso, Sara, Patricia, Fede, Sonia, Alejandro..., que hemos conseguido ser como una familia compartiendo muchas horas de trabajo y ayudándonos entre todos.

A todos mis compañeros de carrera y amigos, por compartir conmigo este largo y difícil camino en el que nos aventuramos y, que, a pesar de las complicaciones, nunca nos rendimos y nos seguimos apoyando entre nosotros. Mención especial para Marcos por estar siempre ahí, por su ayuda siempre desinteresada y por los ratos de risas que hemos pasado durante todos estos años.

Por último, pero para nada menos importante, agradecer a mi familia, que siempre me ha apoyado en todos los aspectos de mi vida y que siempre han estado ahí. Por ayudarme a crecer como persona y por estar siempre unos al lado de otros, tanto en los momentos buenos como en los malos.

**Muchas gracias a todos.**



## RESUMEN

En este trabajo fin de grado se ha realizado el diseño y fabricación de tres tipos de redes de sensores para construir lenguas electrónicas de tipo voltamétrico, potenciométrico e impedimétrico, que nos permitirán realizar análisis rápidos, sencillos y económicos del producto de interés, que en nuestro caso es leche.

En las tres redes de sensores se ha procedido de la misma forma. Se han probado con un amplio catálogo de leches diferentes y se ha medido su repetitividad y reproducibilidad para poder asegurarnos del correcto funcionamiento de las redes de sensores. Por último, se han utilizado para medir las leches y ver si podemos discriminar entre ellas, incluyendo las mismas, pero con cierto envejecimiento. Los sensores voltamétricos y potenciométricos desarrollados tienen repetitividad y reproducibilidad óptima y han logrado discriminar las muestras. En los impedimétricos no hemos conseguido diferencias sin activación, dejando planteada la activación para futuros trabajos.

**Palabras clave:** Lenguas electrónicas, voltamétricos, potenciométricos, impedimétricos, leche.

## ABSTRACT

In this final degree project, the design and manufacture of three types of sensor networks have been carried out to build voltammetric, potentiometric and impedimetric tongues, which will allow us to carry out quick, simple and economic analyzes of the product of interest, which in our case is milk.

They have been tested with a wide catalog of different milks and repeatability and reproducibility have been measured to be able to ensure the correct functioning of the sensor networks. Finally, they have been used to measure milks and see if we can discriminate between them, including them, but with some aging. The voltammetric and potentiometric sensors developed have optimum repeatability and reproducibility and have managed to discriminate the samples. In the impedimetric tongue we have not achieved differences without activation, leaving activation for future work.

**Keywords:** e-tongue, voltammetric, potentiometric, impedimetric, milk.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. ENUNCIADO DEL PROYECTO.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	1
1.3. OBJETIVOS .....	1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	5
2.1. LECHE.....	5
2.1.1. Definición.....	5
2.1.2. Composición .....	5
2.1.3. Propiedades físico-químicas.....	7
2.1.4. Clasificación.....	8
2.2. LENGUAS ELECTRÓNICAS.....	10
2.2.1. Sensores potenciométricos .....	11
2.2.2. Sensores voltamétricos .....	12
2.2.3. Sensores impedimétricos .....	14
2.3. SENSORES POTENCIOMÉTRICOS .....	17
2.3.1. Membranas.....	17
2.4. SENSORES VOLTAMÉTRICOS .....	19
2.4.1. Tipos de sensores .....	19
2.5. SENSORES IMPEDIMÉTRICOS INTERDIGITADOS .....	21
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS MULTIVARIANTE.....	22
2.6.1. Análisis de componentes principales (PCA) .....	23
2.6.2. Mínimos cuadrados parciales (PLS).....	23
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
3.1. EQUIPOS UTILIZADOS.....	27
3.1.1. Sensor voltamétrico .....	27
3.1.2. Sensor potenciométrico.....	27
3.1.3. Sensor impedimétrico.....	30
3.2. LECHE UTILIZADAS.....	31
3.2.1. Leches clásicas .....	31
3.2.2. Leches sin lactosa.....	31
3.2.3. Leches con calcio.....	32
3.2.4. Leches con ácido fólico.....	32
3.2.5. Leche pro-activa .....	33
3.3. SENSORES VOLTAMÉTRICOS .....	34

---

3.3.1. Sensor voltamétrico .....	34
3.3.2. Toma de medidas.....	34
3.4.  SENSORES POTENCIOMÉTRICOS.....	36
3.4.1. Lengua potenciométrica .....	36
3.4.2. Toma de medidas.....	38
3.5.  SENSORES IMPEDIMÉTRICOS.....	40
4.  RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	45
4.1.  SENSORES POTENCIOMÉTRICOS.....	45
4.1.1. Reproducibilidad .....	45
4.1.2. Comparativa entre leches de la misma clase .....	46
4.1.3. Comparativa entre leches del mismo tipo.....	48
4.1.4. Envejecimiento .....	51
4.1.5. Tratamiento estadístico de datos. Variedades de leches.....	53
4.1.6. Tratamiento estadístico de los datos. Envejecimiento .....	66
4.2. SENSORES VOLTAMÉTRICOS.....	70
4.2.1. Reproducibilidad .....	70
4.2.2. Parámetros de las muestras .....	71
4.2.3. Comparativa entre leches de la misma clase .....	72
4.2.4. Comparativa entre leches del mismo tipo.....	77
4.2.5. Envejecimiento .....	84
4.2.6. Tratamiento estadístico de datos.....	86
5.- CONCLUSIÓN FINAL Y POSIBILIDADES FUTURAS.....	101
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	103



# CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ENUNCIADO DEL PROYECTO

En el presente trabajo de fin de grado diseñaremos y aplicaremos distintos tipos de sensores electroquímicos para la caracterización y determinación de parámetros químicos de interés en productos lácteos.

### 1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El grupo de investigación UVaSens, dirigido por la prof. María Luz Rodríguez Mendéz, del Departamento de Química Física y Química Inorgánica de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid (UVa), en colaboración con la prof. Ana Cristina García Cabezón del Departamento de Ciencias Materiales e Ingeniería de Materiales, está desarrollando lenguas electrónicas y bioelectrónicas para el análisis de diferentes alimentos, como por ejemplo leches, vinos y zumos, con el objetivo de diseñar y construir redes de sensores capaces de detectar los componentes químicos y discriminarlos de una manera rápida, sencilla y eficaz. Para ello se están desarrollando lenguas electrónicas y bioelectrónicas.

El sector lácteo es uno de los pilares más importantes dentro de la industria agroalimentaria, concentrándose en Galicia, Asturias, Cantabria y Castilla y León dentro del panorama nacional. Este sector es uno de los más estrictos en materia de legislación para así proteger al consumidor. Debido a esto se realizan muchos análisis para poder garantizar la calidad de los productos. Los métodos más utilizados (cromatografía, espectroscopía, etc) tienen el inconveniente de que no son inmediatos además de su coste, por lo que no se pueden realizar in situ, lo que es un inconveniente para los ganaderos, ya que con un método rápido in situ conseguirían mejorar la calidad de las leches y detectar posibles adulteraciones en las mismas antes de su posterior transporte. Por ello cobra fuerza un método basado en lenguas electrónicas que pueden permitirnos obtener resultados de una forma rápida y a bajo coste que ayudaría a los ganaderos a conseguir los objetivos marcados anteriormente.

### 1.3. OBJETIVOS

El objetivo principal que persigue la realización de este Trabajo Fin de Grado es el diseño y aplicación de diferentes redes de sensores para en primer lugar caracterizar

varios tipos de leche proporcionadas por la marca Pascual y poder comparar los datos obtenidos en los análisis químicos para así determinar la sensibilidad a las distintas sustancias químicas de los sensores utilizados. En segundo lugar, este proyecto pretende llevar a cabo la comparación entre los distintos tipos de sensores electroquímicos para seleccionar el que mejor se adapta a la medición de productos lácteos y poder seguir su desarrollo en futuros proyectos con objeto de implantar su uso industrial.

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO



## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. LECHE

#### 2.1.1. Definición

La leche es un fluido biológico de color blanquecino opaco que segregan las hembras de los mamíferos. Su función es la de aportar los nutrientes y la energía necesarios para el crecimiento y el desarrollo de las crías y proteger su tracto gastrointestinal contra patógenos y toxinas durante los primeros meses de vida hasta que son capaces de digerir otros alimentos. La más común es la leche de vaca, sobre todo en términos de consumo, pero hay una gran variedad. [1, 2]

#### 2.1.2. Composición

La leche es un alimento básico dentro de la alimentación debido a que tiene un alto contenido en nutrientes respecto a su contenido calórico, lo que hace que sea un alimento con un gran valor nutricional y una fuente de energía importante. Su principal componente es el agua que varía entre un 68 y un 91% dependiendo del tipo y de su origen. También aporta proteínas, grasas y minerales (principalmente calcio, magnesio, fósforo y zinc), hidratos de carbono (fundamentalmente en forma de lactosa). Además, aporta vitamina D, A y del complejo B (especialmente B12 y B2). Por el contrario, la leche presenta un déficit de hierro y vitamina C, importantes dentro de nuestra dieta habitual. [1, 2]

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

Tabla 1. Composición de los principales tipos de leche según su origen [2]

### *Agua*

El agua es el componente principal de la leche. Su contenido en agua varía entre un 68 y un 91% dependiendo del tipo de leche y el origen de esta. Por ejemplo, la más común de todas que es la leche de vaca tiene aproximadamente un 87% de agua.

### *Proteínas*

Dentro de las proteínas la más común es la caseína que se presenta en torno al 80% de las proteínas que contiene la leche. Esta proteína precipita y forma una masa coagulada llamada cuajada, que después de prensada, salada y madurada se convierte en el queso. Los cuatro tipos de caseína son alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), kappa ( $\kappa$ ) y gamma ( $\gamma$ ) en distintas proporciones. La más importante es la caseína  $\kappa$  por su importancia en la coagulación de la leche.

El otro 20% se presenta como proteínas séricas. Estas proteínas son las que se encuentran en disolución cuando las caseínas precipitan. Tienen un contenido en aminoácidos equilibrado. Las principales son  $\alpha$ -lactoalbúminas,  $\beta$ -lactoglobulinas, seroalbúminas e inmunoglobulinas. [1-4]

### *Hidratos de carbono*

Respecto a los hidratos de carbono, el principal es la lactosa que suele presentarse en torno al 5%. La lactosa es un disacárido formado por glucosa y galactosa. Tiene un sabor dulce que queda enmascarado por la caseína en el caso de la leche. Uno de los problemas de la lactosa es la existencia de personas intolerantes a la misma, la cual les produce problemas gástricos. [1-4]

### *Materia grasa*

La materia grasa de la leche tiene una gran importancia económica, nutritiva y por sus características físicas y organolépticas. Se presenta en la leche en forma de glóbulos de pequeño tamaño (unas 3 o 4 micras de diámetro de media) en suspensión. Un centímetro cúbico de leche puede tener entre tres y cuatro mil millones de glóbulos de grasa. Cuando la leche está en reposo estas pequeñas partículas se presentan como una capa de nata en la superficie.

Está compuesta por triglicéridos, fosfolípidos y sustancias insaponificables. La materia grasa que se presenta en mayor cantidad es triglicéridos, un 98%



aproximadamente. Los fosfolípidos y las sustancias insaponificables se presentan en menor medida, con un 0,8% y un 1% respectivamente. [1-4]

### *Minerales*

Se presentan en una proporción muy pequeña en la leche, en torno al 1%, pero juegan un papel importante en nuestra salud. Se suelen diferenciar en macroelementos y oligoelementos. Los macroelementos son los que se presentan en mayor proporción y son: calcio, sodio, magnesio, cloruros, fosfatos y citratos de potasio. Los oligoelementos se presentan en cantidades muy bajas y suelen ser: aluminio, zinc, manganeso, hierro y cobre. [1-4]

### *Vitaminas*

Se presentan en pequeña cantidad, pero son importantes en nuestra nutrición al ser muy importante en nuestros procesos vitales. Además, al no ser producidas por nuestro organismo tenemos que conseguirlas mediante los alimentos.

Se dividen en vitaminas liposolubles e hidrosolubles. Las vitaminas liposolubles que encontramos en la leche son vitamina A, D, E y K y las hidrosolubles son vitamina B1, B2, B6, B12 y C). [1-4]

#### 2.1.3. Propiedades físico-químicas

A continuación, vamos a explicar cuáles son los principales parámetros físico-químicos de la leche de vaca son los siguientes: [2]

- Punto de congelación: entre  $-0,53$  y  $-0,57$  °C (leche de vaca). Cuanto más aguada esté la leche más se acercará a cero por lo que este dato nos puede ayudar a determinar el agua que contiene.
- Punto de ebullición:  $100,17$  °C (nivel del mar).
- Densidad: entre  $1,0231$  y  $1,0398$  (leche de vaca).
- Viscosidad: entre  $1.7$  y  $2.2$  centipoises (leche entera). Depende sobre todo de la materia grasa por lo que una leche desnatada tendrá una viscosidad menor ( $1,2$ cp)
- pH: entre  $6,65$  y  $6,71$  (Leche de vaca). Puede variar fácilmente.
- Acidez:  $14-18$  °D

#### 2.1.4. Clasificación

La leche se puede clasificar de muchas formas atendiendo a distintos criterios: [5]

##### *Según su forma física*

- Leche líquida: el tipo de leche más común. Como su propio nombre indica esta leche se encuentra en estado líquido.
- Leche evaporada: es una leche en la cual se ha eliminado aproximadamente un 60% de su agua mediante un proceso de pasteurización-homogenización-evaporación a vacío. A continuación, es envasada, cerrada y esterilizada.
- Leche condensada: es una leche concentrada con azúcar y con una menor concentración de agua. Se calienta a 125°C, se le añade sacarosa y se disuelve, se evapora al vacío y se enfría rápidamente. Se siembra de micro cristales de lactosa y se envasa.
- Leche en polvo: es una leche deshidratada (contiene menos de 5% de agua). Tiene bajo contenido en vitaminas y aminoácidos. Para su obtención se evapora la leche hasta que alcance una concentración del 50% de sólidos. Una vez hecho esto se deshidrata y granula.

##### *Según su contenido nutricional*

- Leche entera: tiene intacto su contenido nutricional.
- Leche semidesnatada: tiene menos cantidad de grasa que la leche entera y mayor déficit de vitaminas liposolubles A, D y E.
- Leche desnatada: no contiene grasa ni vitaminas liposolubles.
- Leche modificada: leche a la que se le elimina la grasa, la cual se sustituye por aceites vegetales para mejorar la calidad típica de la leche.

- Leche enriquecida: leche desnatada a la que se le añaden nutrientes, como calcio y vitaminas A y D.

#### *Según su tratamiento térmico*

- Leche cruda: leche sin ningún tratamiento térmico.
- Leche pasteurizada: leche a la que se la eliminan microorganismos patógenos, pero no los banales y puede cortarse. Para ello se calienta a 71-72 °C durante 15 segundos o a 84-85 °C durante 2 segundos. Tiene una vida más de pocos días y debe conservarse refrigerada. Tiene más vitaminas que la leche esterilizada y no tiene aditivos.
- Leche esterilizada: leche a la que se la aplica una cocción de 20 minutos a 115-120°C con el objetivo de destruir todo tipo de gérmenes.
- Leche UHT: leche a la que se la somete a una cocción de 25 segundos a 130-140 °C y después es enfriada rápidamente a 32 °C.  
Es la más común de encontrar en el mercado, ya que puede conservarse a temperatura ambiente en el tetrabrik durante 3-6 meses.

## 2.2. LENGUAS ELECTRÓNICAS

El continuo aumento de la demanda de productos alimenticios y la mejora continua tecnológica dentro de la industria de alimentos requiere de métodos cada vez más avanzados para el control de calidad de dichos productos. Hasta hace unos años la técnica principal para evaluar el gusto de las bebidas era mediante una cata, compuesta por un conjunto de personas preparadas para dicha función al haber sido entrenadas para poder evaluar una bebida de forma precisa y eficaz. Dicha técnica tiene sus inconvenientes como sus altos costes y el tiempo necesario ya que requiere de entrenamiento de expertos y una limitación de número de catas al día. Debido a estas limitaciones y a la mejora tecnológica surgieron las técnicas de medición electrónicas como son las lenguas electrónicas (sabores) y las narices electrónicas (olores). Estas técnicas solucionan gran parte de los problemas de los métodos descritos anteriormente. Son técnicas más baratas y rápidas para obtener los datos con mayor rapidez y así poder corregir posibles problemas lo más rápido posible, así como poder incorporarlos en una línea de producción para tener un proceso continuo debido a la posibilidad de hacerlo portátil y así conseguir su implementación total en la industria que aportaría grandes beneficios en costes y control de calidad. [6]

Según la naturaleza de la información los sensores se pueden clasificar en dos tipos: físicos (la información recibida es de tipo físico, como temperatura o presión) y químicos (la información recibida es de tipo químico, como pH o concentración). [7]

Las lenguas electrónicas, por lo general, están compuestas por una red de sensores químicos que transmiten la información a un aparato electrónico que interpreta las señales obtenidas por los sensores para su posterior discriminación con métodos de análisis (PCA, PLS...). Para que la información obtenida sea adecuada es importante que la red de sensores tenga reproducibilidad, estabilidad y selectividad cruzada en la señal medida que mandan para su posterior análisis.

En nuestro caso, los sensores serán de tipo químico o bioquímico. Un sensor químico coge la información de carácter químico y la transforma en una señal analítica que nos resulte válida en la siguiente etapa de la lengua electrónica. Un sensor químico suele componerse de dos partes en serie: un receptor y un transductor. El receptor es capaz de reconocer de manera selectiva un analito y produce una señal de tipo eléctrico, óptico, térmico o másico y el transductor transforma estas señales en una de tipo eléctrico más fácil de cuantificar o calificar. En un sensor bioquímico se mide la reacción de los organismos, en nuestro caso mediante enzimas insertadas en alguno de los sensores utilizados. Se compone, al igual que los químicos, de un componente químico, al cual se añade otro compuesto biológico como pueden ser enzimas para que pueda haber una interacción entre ambas. [8, 9] mejorando la especificidad del sensor.

Los tipos de sensores químicos más importantes son los siguientes:

- Sensores potenciométricos: adquieren la información a través de cambios en el potencial eléctrico. Necesita un electrodo de trabajo y uno de referencia.
- Sensores voltamétricos: adquieren la información a través de cambios en la corriente al variar el potencial eléctrico. Precisa de un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo.
- Sensores amperométricos: adquieren la información a través de la medida de intensidad de corriente en una reacción de reducción u oxidación a potencial constante.

### 2.2.1. Sensores potenciométricos

Los sensores potenciométricos consiguen información a través de cambios en el potencial eléctrico entre una solución y la superficie del sensor. La solución contiene iones que son los que crean la diferencia de potencial con el sensor. Las medidas obtenidas se realizan a circuito abierto ( $I=0A$ ) y se obtiene la diferencia de potencial entre un electrodo de referencia y el electrodo de trabajo. Gracias a la ecuación de Nerst podemos relacionar la concentración de analito en la solución con la diferencia de potencial. [9]

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \cdot \ln(Q)$$

$E$  = potencial corregido del electrodo

$E^0$  = potencial en condiciones estándar

$R$  = cte de los gases

$T$  = temperatura

$n$  = numero de moles

$F$  = cte de Faraday

$Q$  = cociente reacción correspondiente

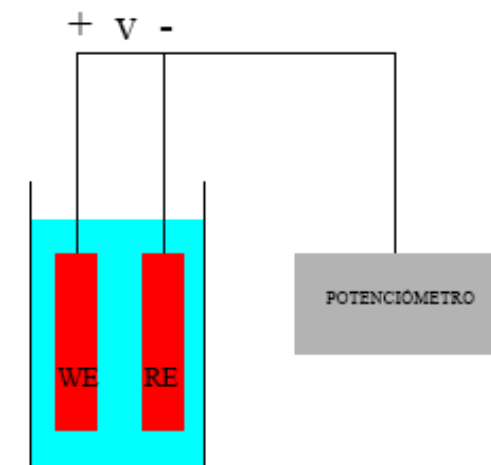


Figura 1. Esquema funcionamiento sensores potenciométricos

Los tres componentes de este sistema de medición son el electrodo de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) y el aparato de medición. [9]

En nuestro caso el aparato de medición se llamado Datalogger, que es un dispositivo electrónico conectado a un ordenador y al que se conectan los sensores, dándonos los valores de diferencia de potencial que se registran durante un periodo de tiempo.

El electrodo de trabajo (WE) en nuestro caso será un electrodo selectivo a iones, compuesto por membranas a base de policloruro de vinilo (PVC) y un plastificante y aditivos orgánicos, del cual hablaremos en apartados posteriores.

Como electrodo de referencia (RE) usaremos uno de Ag/AgCl comercial. Este electrodo debe tener potencial conocido, para que no varíe según la disolución medida. Nuestro electrodo está compuesto por un hilo de plata en una disolución de cloruro de plata (AgCl), alojado en una disolución de KCl 0.1M.

### 2.2.2. Sensores voltamétricos

Los sensores voltamétricos consiguen la información a través de la intensidad de corriente obtenido al variar el potencial eléctrico suministrado sobre el electrodo de trabajo (WE).

Están compuestos por un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) o contraelectrodo. El electrodo de trabajo (WE) es un electrodo sobre el que se aplica un potencial que va variando con el tiempo. El electrodo de referencia (RE) tiene un potencial conocido que es tomado como

referencia para calcular la diferencia de potencial que iremos variando. El electrodo auxiliar (AE) se utiliza para cerrar el circuito. [10]

En nuestro caso usaremos unos electrodos voltamétricos comerciales en los cuales el electrodo de referencia será de carbono, el auxiliar será de plata y el de trabajo variará en función del tipo de electrodo que usaremos para medir. Esta información será especificada más adelante para cada uno de ellos.

La técnica usada principalmente con estos sensores es la voltametría cíclica (CV). Esta técnica electroquímica se basa en la variación de la intensidad de corriente en un barrido de potencial. En nuestro caso el potencial varía según una función triangular, con una primera zona en la que el potencial aumenta de forma lineal desde un potencial mínimo hasta un potencial máximo, llamada barrido directo y una segunda zona en la que el potencial disminuye de forma lineal desde el potencial máximo al mínimo, llamada barrido inverso. [10, 11]

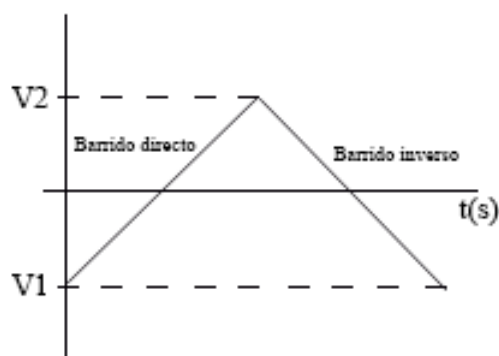


Figura 2. Variación potencial triangular CV

La respuesta que obtenemos al aplicar esta variación del potencial en el tiempo en una gráfica  $I=f(E)$  que nos dará la información que necesitamos, ya sea con valores numéricos o con la forma obtenida (subidas, bajadas, picos, etc). Este gráfico se denomina voltamograma. En la forma de la respuesta se pueden ver dos ramas, una debida al barrido directo que llamaremos rama de oxidación y la debida al barrido inverso que llamaremos rama de reducción.

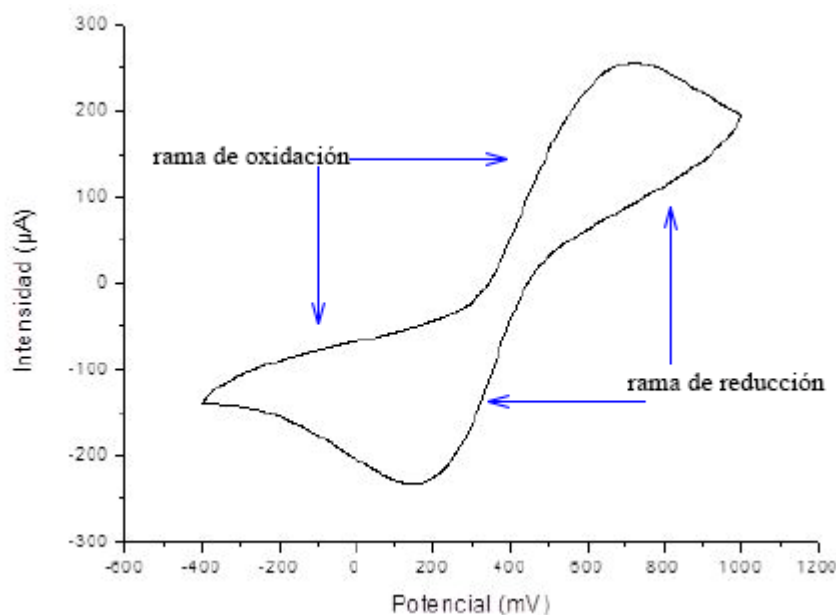


Figura 3. Ramas de oxidación y reducción

### 2.2.3. Sensores impedimétricos

Los sensores impedimétricos son un tipo de sensor electroquímico cuya respuesta se basa en la espectroscopía de impedancias. La espectroscopía de impedancia es una técnica que se empezó a utilizar en los años setenta y sirve para caracterizar las propiedades eléctricas de los materiales y en nuestro caso de las superficies modificadas de los electrodos, así como para la investigación electroquímica de sistemas y procesos. Su existencia se debe a la aparición de circuitos electrónicos suficientemente rápidos y sensibles para generar y analizar una señal de frecuencia y fase variable. Requiere la aplicación de una pequeña perturbación, por lo general, sinusoidal, de potencial eléctrico de frecuencia variable (normalmente de 100kHz a 0,1 Hz) al material estudiado y a la respuesta en corriente dentro de una celda electroquímica. [26, 27]

La impedancia es el cociente entre el potencial aplicado y la intensidad de corriente a la salida. En muchos materiales las impedancias varían con la frecuencia del potencial aplicada en relación con las propiedades del material, lo que nos permite su caracterización. En base a esto, si se consigue una medición adecuada de impedancias a través de un rango de frecuencias apropiado, se obtienen unos datos que, representados en unos ejes acorde a esos datos, permiten relacionar estos resultados con las propiedades físicas y químicas del material. A partir de las mediciones de desfase y de amplitud de la respuesta, es posible obtener la impedancia de transferencia electroquímica del material estudiado ( $Z^*$ ).



$$Z^* = \frac{E_0}{I_0} = \frac{E_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t)}{I_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \varphi)} = Z_0 \cdot \frac{\text{sen}(\omega \cdot t)}{\text{sen}(\omega \cdot t + \varphi)}$$

$E_0$  = potencial

$I_0$  = intensidad

$\omega$  = frecuencia

$\varphi$  = desfase

Para la representación de estos resultados se usan: [26]

- Diagrama de Nyquist: se representa la parte imaginaria cambiada de signo ( $-Z''$ ), respecto a la parte real ( $Z'$ ). De este diagrama se obtiene la forma del espectro del material.
- Diagramas de Bode: se representa el logaritmo del módulo de la impedancia ( $\log|Z|$ ) y el desfase ( $\varphi$ ), respecto al logaritmo de la frecuencia ( $\log \omega$ ). De estos diagramas se obtiene el comportamiento del material en función de la frecuencia.

La instrumentación electrónica necesaria para obtener resultados se compone de un generador/analizador de funciones (conocido como FRA por sus siglas en inglés "Frequency Response Analyser" o "lock-in amplifier"), el cual nos permite analizar o aplicar señales sinusoidales en un amplio rango de frecuencias a un potencióstato, un potencióstato, el cual aplica la señal sinusoidal correspondiente al electrodo de trabajo en una celda electroquímica, un analizador de funciones digital, el cual recoge la respuesta medida por el potencióstato y determina la respuesta de impedancia y ángulo de fase correspondientes a cada frecuencia analizada. Y finalmente, un ordenador, que se encarga de almacenar la información obtenida.

En cuanto a las ventajas de esta técnica cabe destacar que las mediciones pueden llevarse a cabo en estado estacionario u otra condición específica, se pueden determinar todos los parámetros con un solo experimento, el sistema puede ser tratado como lineal, su sencillez para conseguir su automatización, su elevada precisión, que es una técnica no destructiva al aplicarla en condiciones de equilibrio, permite realizar medidas con electrolitos de baja conductividad, es posible verificar los modelos de reacción y se pueden caracterizar las propiedades del medio y de la interfase en todo tipo de materiales. Por el contrario, esta técnica tiene sus limitaciones. La más importante es el tiempo necesario para realizar el experimento, sobre todo a bajas frecuencias. Esto es debido a que el barrido de frecuencias requiere de la estabilidad del sistema antes de tomar la medida, lo que hace que, a

frecuencias bajas, las mediciones sean mucho más lentas y aumenten la duración del ensayo. [26, 27 ,28]

## 2.3. SENSORES POTENCIOMÉTRICOS

### 2.3.1. Membranas

Las membranas usadas están compuestas por un plastificante, un aditivo y una base de PVC de alto peso molecular.

Los plastificantes utilizados son los siguientes: [12]

Nombre	Compuesto	Fórmula química
B	BIS(1-BUTYLPENTYL)ADIPATE	$C_{24}H_{46}O_4$
C	TRIS(2-ETHYLHEXYL)PHOSPHATE	$C_{24}H_{51}O_4P$
D	DIBUTYL SEBACATE	$C_{18}H_{34}O_4$
E	2-NITROPHENYL-OCTYLETHER	$C_{14}H_{21}NO_3$
F	DIOCTYL PHENYLPHOSPHONATE	$C_{22}H_{39}O_3P$

Tabla 2. Compuestos plastificantes

Y los aditivos utilizados son los siguientes: [12]

Nombre	Compuesto	Fórmula química
1	OCTADECYLAMINE	$C_{18}H_{39}N$
3	OLEYL ALCOHOL	$C_{18}H_{36}O$
5	TRIDODECYLMETHYLAMMONIUM CHLORIDE	$C_{37}H_{78}ClN$
6	OLEIC ACID	$C_{18}H_{34}O_2$

Tabla 3. Compuestos aditivos

A continuación, se muestra la composición de cada una de las 20 membranas con los valores pesados de cada uno de los compuestos:

Nº	MEMBRANA	PVC (g)	ADITIVO (g)	PLASTIFICANTE(g)	%PVC	%ADITIVO	%PLASTIFICANTE
1	1B	0,0117	0,2522	0,1278	2,98698	64,38601	32,62701
2	1C	0,0115	0,2836	0,1283	2,71611	66,98158	30,30231
3	1D	0,0130	0,2630	0,1278	3,21942	65,13125	31,64933
4	1E	0,0121	0,2573	0,1270	3,05247	64,90918	32,03835
5	1F	0,0119	0,2610	0,1274	2,97277	65,20110	31,82613
6	3B	0,0170	0,2620	0,1283	4,17383	64,32605	31,50012
7	3C	0,0122	0,2670	0,1282	2,99460	65,53756	31,46784
8	3D	0,0150	0,2583	0,1284	3,73413	64,30172	31,96415
9	3E	0,0140	0,2620	0,1291	3,45594	64,67539	31,86867
10	3F	0,0142	0,2581	0,1275	3,55178	64,55728	31,89095
11	5B	0,0118	0,2630	0,1278	2,93095	65,32538	31,74367
12	5C	0,0112	0,2750	0,1281	2,70336	66,37702	30,91962
13	5D	0,0116	0,2607	0,1276	2,90073	65,19130	31,90798
14	5E	0,0118	0,2527	0,1281	3,00560	64,36577	32,62863
15	5F	0,0120	0,2517	0,1277	3,06592	64,30761	32,62647
16	6B	0,0150	0,2633	0,1280	3,69185	64,80433	31,50381
17	6C	0,0128	0,2618	0,1286	3,17460	64,93056	31,89484
18	6D	0,0135	0,2630	0,1278	3,33193	65,05553	31,61254
19	6E	0,0135	0,2516	0,1278	3,42862	64,04154	32,52984
20	6F	0,0150	0,2544	0,1279	3,77548	64,03222	32,19230

Tabla 4. Composición (en masa y porcentaje total) de cada una de las membranas

## 2.4. SENSORES VOLTAMÉTRICOS

### 2.4.1. Tipos de sensores

Como sensores voltamétricos se han usado varios tipos de sensores comerciales de la marca Dropsens todos ellos de base carbono alguno sin modificar y modificados con diversas sustancias electrocatalíticas. Los electrodos que se han usado para realizar los experimentos son los siguientes: [18]

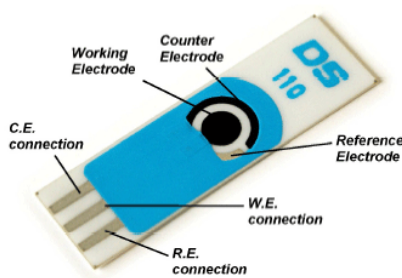


Figura 4. SPE (Screen printed electrode) de Dropsens

- **110:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono sin modificar.
- **710:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono modificado con azul de Prusia.
- **110Ni:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono modificado con óxido de níquel (NiO).
- **110PANI:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono modificado con polianilina (PANI).

- **110GNP:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono modificado con nanopartículas de oro (AuNPs).
- **110SWCNT:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono modificado con nanotubos de carbono.
- **LACT10:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono modificado con ferrocianuro y lactato oxidasa.
- **GLU10:** se trata de un sensor compuesto por un electrodo de referencia de plata, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo de carbono modificado con ferrocianuro y glucosa oxidasa.

## 2.5. SENSORES IMPEDIMÉTRICOS INTERDIGITADOS

Los sensores impedimétricos interdigitados usados para las medidas de este trabajo son comerciales de la marca MICRUX TECHNOLOGIES. Los electrodos utilizados los podemos clasificar atendiendo a varios criterios. En primer lugar, según el material del que están hechos, que los podemos dividir entre los hechos de Pt (platino) y los de Au (oro), lo que nos dará la diferencia entre los electrodos de ambos materiales en dichos electrodos. En segundo lugar, según su configuración los podemos dividir entre electrodos interdigitados simples (IDE), que consisten en dos arrays de electrodos independientes (WE1 y WE2) y en arrays de electrodos (IDA), que están compuestos por cuatro electrodos, dos de trabajo (WE1 y WE2), uno de referencia (RE) y otro auxiliar (AE) integrados. A continuación, se muestra la configuración de ambos tipos (IDE e IDA) en donde se muestra la zona donde colocar la gota del analito y las zonas en las que hacer el contacto con los pines de la celda para así poder conectar los electrodos a un potenciostato.



Figura 5. IDE (identificación de cada electrodo (izda) y ampliación de la zona de la gota (dcha))

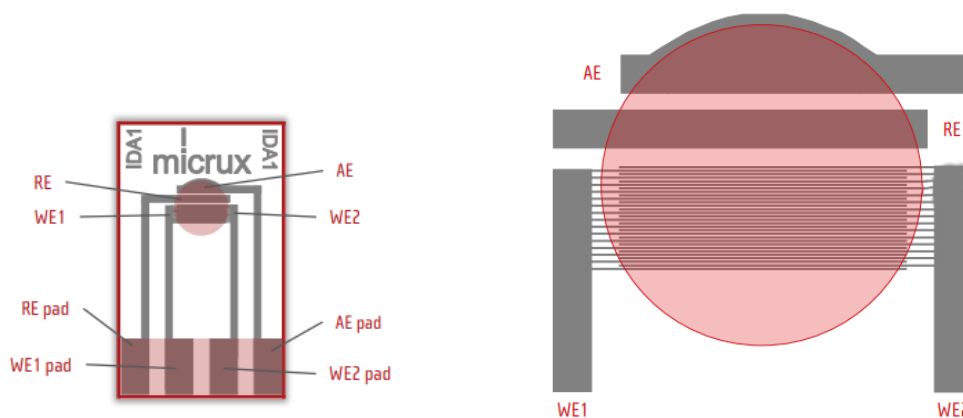


Figura 6. IDE (identificación de cada electrodo (izda) y ampliación de la zona de la gota (dcha))



Figura 7. Celda para la conexión de los electrodos a cualquier potenciostato comercial

Por último, dentro de todos los tipos de sensores que tenemos podemos hacer otra subdivisión debida al ancho de los electrodos y a la separación entre ellos para así ver la influencia de esta característica en las medidas obtenidas. Dentro de los electrodos IDE tenemos los IDE 1 ( $10\ \mu\text{m}$  ancho electrodos /  $10\ \mu\text{m}$  distancia entre electrodos), IDE2 ( $10\ \mu\text{m}$  /  $5\ \mu\text{m}$ ) e IDE3 ( $5\ \mu\text{m}$  /  $5\ \mu\text{m}$ ). Dentro de los electrodos IDA tenemos los IDA1 ( $10\ \mu\text{m}$  /  $10\ \mu\text{m}$ ), IDA5 ( $10\ \mu\text{m}$  /  $5\ \mu\text{m}$ ) e IDA6 ( $5\ \mu\text{m}$  /  $5\ \mu\text{m}$ ). Todos estos tipos los tenemos tanto en su versión en platino (Pt) como en oro (Au).

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS MULTIVARIANTE

Los resultados obtenidos con los sensores potenciométricos y voltamétricos en las lenguas electrónicas comprenden un conjunto de datos muy extenso. Por ellos, tenemos que tratar estos datos de forma estadística con técnicas multivariantes para disminuir el número de datos obtenidos, combinarlos para conseguir variables con la mayor cantidad posible de información y poder sacar conclusiones adecuadas.

Los análisis estadísticos multivariantes más comunes son los que discriminan entre las muestras analizadas, como el análisis de componentes principales (PCA), y los que realizan modelos de predicción que para correlacionar los datos obtenidos con los análisis químicos obtenidos, en nuestro caso, de las leches, como es el análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS), con el primero seremos capaces de discriminar entre las diferentes muestras y con el segundo pretendemos conseguir extraer los datos químicos una vez que tengamos un modelo suficientemente entrenado.



### 2.6.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales reduce el número de variables originales que están interrelacionadas a un conjunto menor de nuevas variables, llamadas componentes principales, de tal modo que no se pierda cantidad de información al reducir el número de variables en el proceso. Las componentes principales son independientes entre sí y se obtienen de la combinación lineal de las variables originales. El objetivo es disminuir el número de variables y no perder información de los datos iniciales para lo que hay que conseguir unas correlaciones óptimas. Las componentes principales se ordenan entre sí por la cantidad de varianza que representan (PC1, PC2, PC3, etc), siendo la componente PC1, la que mayor información aporta seguida por la PC2 y así, sucesivamente. [15]

### 2.6.2. Mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión por mínimos cuadrados establece modelos de predicción a partir de las respuestas obtenidas del análisis instrumental y los parámetros químicos obtenidos de los análisis químicos correspondientes (variables X e Y respectivamente). El análisis PLS modela las variables X e Y para encontrar las variables latentes en X que mejor predicen las variables latentes en Y. Los resultados obtenidos se deben al ajuste de todos los datos, mientras que en la validación se comprueba el nivel de ajuste para nuevos datos. [15]



# CAPITULO 3: DESARROLLO EXPERIMENTAL



### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1. EQUIPOS UTILIZADOS

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado los siguientes equipos:

##### 3.1.1. Sensor voltamétrico

Para la toma de datos dentro de los sensores voltamétricos se ha usado el siguiente equipo:

- DROPSENS PORTABLE BIPOTENCIOSTAT / GALVANOSTAT  $\mu$ STAT 400



Figura 8. Bipotenciostato/galvanostato portátil de Dropsens

Dicho equipo se ha usado para la toma de datos de nuestros SPCE y su posterior visualización en un ordenador mediante una toma USB

##### 3.1.2. Sensor potenciométrico

Para la preparación de las membranas y la toma de datos dentro de los sensores potenciométricos se han usado los siguientes equipos:

- MICROBALANZA PRECISA 125A



Figura 9. Microbalanza precisa 125A

Se ha usado para el pesado de los componentes de los que están elaboradas las membranas usadas en el sensor potenciométrico.

- IKA VORTEX GENIUS 3



Figura 10. IKA vortex Genius 3

Agitador vortex usado para la homogeneización de las membranas durante su elaboración.

- AGITADOR IKA COLOR SQUID

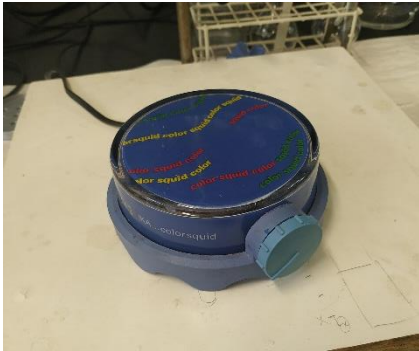


Figura 11. Agitador IKA color squid

Agitador magnético usado para la agitación de las leches para su homogeneización como paso previo a la toma de datos de las membranas del sensor.

- DATALOGGER 34972A LXI DATA ACQUISITION



Figura 12. Datalogger 34972A LXI data acquisition

Datalogger usado para la toma de medidas de los sensores potenciométricos.

### 3.1.3. Sensor impedimétrico

- CELDA ELECTROQUÍMICA DROP-CELL MICRUX

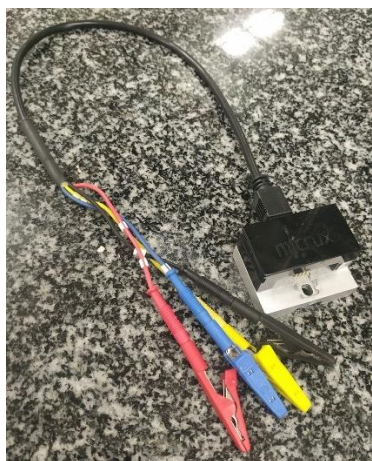


Figura 13. Celda electroquímica

Celda para electrodos thin-film compatible con cualquier potenciostato comercial. Recomendada para estudios electroquímicos en estado estacionario. Se ha usado para medir los electrodos del sensor impedimétrico.

- POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO MODEL 273A

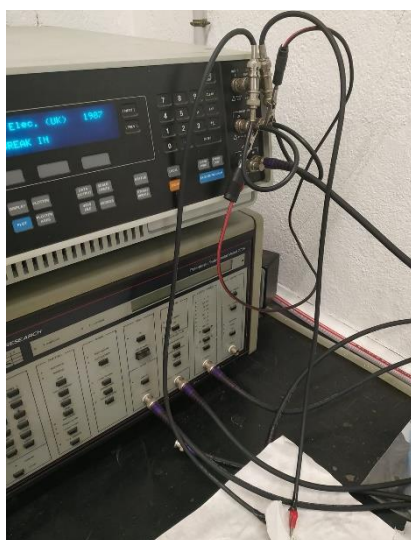


Figura 14. Potenciostato/galvanostato 273A

Potenciostato/galvanostato asociado a Analizador de Impedancias que se ha usado para la toma de medidas impedimétricas de los sensores. Se conecta mediante cables a la celda electroquímica de la figura 13.



### 3.2. LECHES UTILIZADAS

Para la realización de los experimentos realizados en este TFG hemos contado con un amplio catálogo de leches proporcionadas por leche Pascual con sus respectivos análisis químicos para poder discriminar datos mediante el tratamiento estadístico de los datos. A continuación, se muestra el catálogo de leche Pascual usado: [17]

#### 3.2.1. Leches clásicas



Figura 15. Leches clásicas Pascual

Leche desnatada, semidesnatada y entera de leche Pascual de su catálogo de leches clásicas

#### 3.2.2. Leches sin lactosa



Figura 16. Leches sin lactosa Pascual

Leche desnatada, semidesnatada y entera de leche Pascual de su catálogo de leches sin lactosa ideal para las personas intolerantes a la lactosa

### 3.2.3. Leches con calcio



Figura 17. Leches con calcio Pascual

Leche desnatada, semidesnatada y entera de leche Pascual de su catálogo de leches con calcio que aporta un extra en calcio y vitamina D

### 3.2.4. Leches con ácido fólico



Figura 18. Leches con ácido fólico Pascual

Leche desnatada, semidesnatada y entera de leche Pascual de su catálogo de leches flora con aceites vegetales ricos en insaturados

### 3.2.5. Leche pro-activa



Figura 19. Leche pro-activa Pascual

Leche semidesnatada de leche Pascual de su catálogo de leches flora específica para reducir el colesterol gracias a su contenido en esteroles vegetales.

### 3.3. SENSORES VOLTAMÉTRICOS

#### 3.3.1. Sensor voltamétrico

Como mencionamos anteriormente los electrodos voltamétricos usados son comerciales de la marca Dropsens. En concreto, dentro de su catálogo se incluyen entre los SPEs (Screen-printed electrodes) y más concretamente SPEs de carbono, tanto sin modificar (110) como modificados (710, 110Ni, 110PANI, 110GNP, 110SWCNT, LACT10, GLU10).

Para poder hacer la toma de medidas disponemos de un conector de SPEs (DRP-DSC-70211) y un bipotenciostato-galvanostato portátil ( $\mu$ Stat400) que va conectado a un ordenador, ambos de la marca Dropsens.

#### 3.3.2. Toma de medidas

Para realizar la toma de medidas voltamétricas de los electrodos lo primero que realizamos fueron las conexiones tanto del bipotenciostato-galvanostato portátil como del conector de SPEs. Para ello se conectan ambos equipos mediante cableado desde las correspondientes tomas del conector de SPEs (Referencia, Contra-electrodo y de Trabajo) al bipotenciostato-galvanostato y de este último a un ordenador mediante cable USB.

Una vez conectado todo pasamos a colocar el electrodo en la ranura del conector y nos aseguramos de que el contacto era correcto. A continuación, pasamos a la deposición de la muestra sobre el electrodo. Las muestras de leche utilizadas se dividieron según su contenido en dos tipos, leche pura y leche diluida al 50% en agua Mili-Q, quedándonos con el primer tipo debido a que era el que nos proporcionó mejores resultados en la toma de datos. Mediante una micropipeta depositamos una gota de unos 60 $\mu$ L en el electrodo, asegurándonos de cubrir todo correctamente.

El último paso fue configurar los parámetros del programa para la toma de medidas como se muestra a continuación.

Method Curves Measurements

### Cyclic Voltammetry

Leave cell on       Bipotentiostat

Pretreatment

Econd (V):	<input type="text" value="0.0"/>	tcond (s):	<input type="text" value="5.0"/>
Edep (V):	<input type="text" value="0.0"/>	tdep (s):	<input type="text" value="0.0"/>
		tequil (s):	<input type="text" value="0.0"/>

Measurement

Ebegin (V):	<input type="text" value="0.0"/>	Srate (V/s):	<input type="text" value="0.1"/>
Evtx1 (V):	<input type="text" value="1.0"/>	nscans:	<input type="text" value="10"/>
Evtx2 (V):	<input type="text" value="-1.0"/>		
Estep (V):	<input type="text" value="0.01"/>		

Current range

Ch1:	<input type="text" value="Auto"/>	Ch2:	<input type="text" value="Auto"/>
------	-----------------------------------	------	-----------------------------------

Figura 20. Parámetros VC del programa

Se trata de hacer una voltametría cíclica entre -1V y 1V a una velocidad de 100mV/s para un total de 10 ciclos.

### 3.4. SENSORES POTENCIOMÉTRICOS

#### 3.4.1. Lengua potenciométrica

La lengua potenciométrica utilizada para la toma de medidas ha sido desarrollada y construida dentro del grupo de investigación El proceso de preparación de la lengua potenciométrica es el siguiente:

En primer lugar, se construyó el soporte sobre el que más adelante se depositarán las membranas. Dicho soporte se realizó a partir de un tubo cilíndrico de metacrilato de 108mm de alto y 20mm de diámetro. Sobre dicho tubo se realizaron 4 filas con 5 taladros de 5mm de diámetro no pasantes con una pequeña perforación pasante con el objetivo de insertar un cable en dicha perforación. Este cable será el encargado de transmitir las señales al aparato de medida. Una vez hecho esto, se pasó a numerar cada uno de los cables, en total 20, y se soldaron a un conector hembra/macho de 25 pines. La numeración se realizó para así poder ordenar correctamente todos los cables y soldarlos al pin correcto de tal forma que las medidas aparezcan con el mismo orden que las membranas a las que están asociados. Seguidamente se introdujeron por el interior del tubo de metacrilato hasta su correspondiente perforación y se pegaron con Loctite. Una vez nos cercioramos de que están bien fijados, se cerró el tubo de metacrilato por su parte inferior mediante una tapa y se humedeció con cloroformo para que se adhiriera. El siguiente paso fue colocar resina epoxi de plata E4110 10Z para rellenar los taladros realizados en el tubo y así mejorar todavía más la fijación del cable a la vez que se le aporta conductividad. La resina de plata E4110 10Z se obtuvo de la mezcla de dos compuestos (parte A y parte B) en una proporción 1/10 sobre una lámina de metacrilato fino. Posteriormente se introdujo el tubo en el horno para el curado de la resina epoxi. Tras el curado en el horno se procedió a limar la resina epoxi sobrante en los taladros y se dejó la resina con una forma cóncava para facilitar la colocación de las membranas. Una vez acabado el soporte pasamos al siguiente paso, la deposición de las membranas. Para ello, se han utilizado 20 membranas con diferentes combinaciones de plastificante y aditivos orgánicos (Tabla 6), con base de PVC de alto peso molecular. Para la preparación de dichas membranas se pesan las cantidades indicadas de cada uno de los componentes (variables según la membrana). Una vez pesados se homogenizan en un tubo eppendorf. Como entre los distintos componentes hay algunos líquidos y otros sólidos, se disolvieron en pequeñas cantidades de tetrahidrofurano has que actúa como disolvente para obtener una textura adecuada en cada una de las membranas. Una vez hecho esto se guardan en un lugar refrigerado a una temperatura adecuada para su conservación para una posterior utilización.

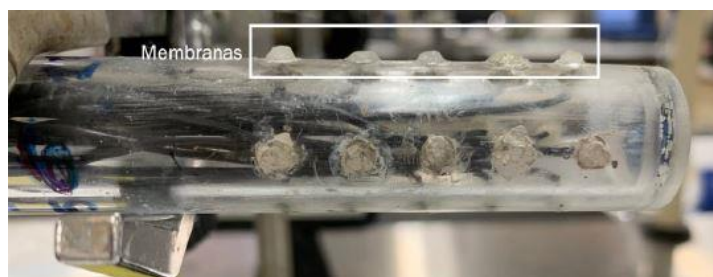


Figura 21. Soporte y membranas lengua potenciométrica

Para el proceso de deposición de las membranas sobre él se siguieron los siguientes pasos:

- Se limpiaron los soportes con alcohol, prestando especial atención en las zonas con resina epoxi que es donde se depositarán las membranas y se pasó el sensor por agua desionizada.

- Se depositó una pequeña capa de laca de plata para cubrir los orificios donde van las membranas para así mejorar la superficie conductora entre la membrana y el cable, y se dejó secar durante unos 30 minutos.

- Se prepararon las membranas, añadiendo alguna gota de tetrahidrofurano en caso de necesitarlo hasta conseguir una textura óptima para depositar en forma de gotas. Para ello se utilizaron pipetas Pasteur (una por membrana para evitar contaminación).

- Se colocó el sensor en una posición óptima para depositar las membranas en la primera fila y se depositó una gota de cada tipo de membrana sobre la laca de plata y se esperó 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo para dejar que se sequen se depositó una segunda gota de cada tipo y se volvió a esperar otros 10 minutos aproximadamente. A continuación, se colocó una tercera gota de cada tipo y se dejaron secar durante aproximadamente 30 minutos. Pasado este tiempo de secado se giró el tubo hasta conseguir una posición óptima para depositar las membranas en la siguiente fila, siguiendo otra vez las instrucciones mencionadas para la primera fila y así con las 4 filas hasta depositar las 20 membranas sobre el sensor.

- Una vez se han colocado todas las membranas, se dejaron una noche secando y después se introdujeron durante 3 o 4 días en una disolución de KCl 0,1M para hidratarlas antes de proceder a la medida de las leches.

### 3.4.2. Toma de medidas

Para la toma de medidas potenciométricas se han usado dos lenguas potenciométricas iguales a la misma altura para conseguir dos medidas similares y doblar datos para corroborar la repetitividad de las medidas, así como conseguir una muestra válida en caso de que, por cualquier circunstancia, alguna de las membranas deje de funcionar o funcione de forma incorrecta.

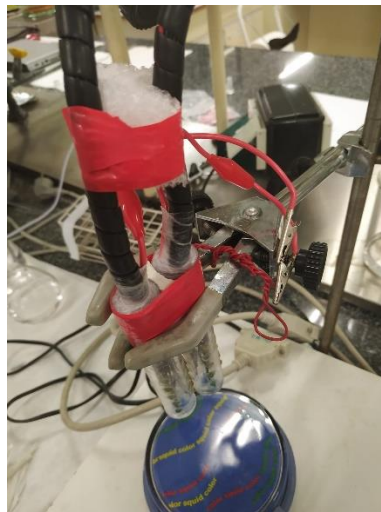


Figura 22. Soporte de medición con dos lenguas potenciométricas

El proceso por el cual se han tomado las medidas ha sido el siguiente:

-Depositamos la muestra de leche en un vaso de precipitados de 250ml hasta una altura que permita cubrir en su totalidad las membranas del sensor potenciométrico. Dicha muestra de leche se ha realizado con cada tipo de leche proporcionada de forma pura y diluida en agua Mili-Q en una proporción de 50%, quedándonos para los resultados posteriores con las muestras que mejores resultados nos han dado, en este caso las de leche diluida al 50% en agua Mili-Q, la grasa de las muestras puras se adhiere al sensor e interfiere en la señal.

-Colocamos el vaso de precipitados encima de un agitador.

-Introducimos el sensor compuesto por dos lenguas potenciométricas en el vaso de precipitados con la muestra de leche y lo sujetamos mediante unas pinzas.

-Conectamos el sensor potenciométrico al aparato de toma de medidas, en este caso el Datalogger mediante dos conectores (hembra y macho respectivamente) de 25 pines



-Introducimos el electrodo de referencia en la muestra de leche para darnos un valor referencia de potencial con el que comparar las medidas de las membranas. Seguidamente lo conectamos al Datalogger mediante unas pinzas conectadas a la carcasa de los conectores del sensor potenciométrico.

-La muestra de leche se agita durante aproximadamente 1 minuto mediante el agitador colocado para tal efecto antes de proceder a la toma de medidas.

-Una vez comprobado que todo está debidamente conectado encendemos el Datalogger y empezamos a tomar las medidas. Las medidas se realizaron en intervalos de 3 segundos durante un total de 5 minutos. Se ha determinado que la toma de datos será de 5 minutos para que se puedan estabilizar las medidas y nos den unos valores de diferencia de potencial más exactos, quedándonos con los últimos datos medidos para su posterior análisis.

### 3.5. SENSORES IMPEDIMÉTRICOS

Los sensores impedimétricos interdigitados usados, como comentamos en apartados anteriores son de la marca Micrux Technologies. Para estos sensores vamos a utilizar la espectroscopía de impedancias para conseguir discriminar entre las distintas leches que vamos a medir. Los electrodos utilizados los dividiremos según el material del que están hechos, Pt (platino) y Au (oro), según su configuración que los dividiremos entre electrodos interdigitados simples (IDE) y en arrays de electrodos (IDA), según el ancho de electrodo, entre 5 y 10  $\mu\text{m}$  y según la distancia entre electrodos, entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ .

Para llevar a cabo el ensayo de impedancias utilizaremos un analizador de impedancias marca Solartron, conectado a la celda de medida mediante pinzas de cocodrilo. En dicha celda, de la marca Micrux Technologies, colocaremos los citados sensores. Para la visualización de los datos obtenidos usaremos el programa ZView, un programa de adquisición de datos electroquímicos y análisis de espectroscopía de impedancias.

Para la toma de datos, hemos colocado una gota sobre los sensores, dejando unos 2min para que se estabilizara la muestra antes de tomar las medidas. Una vez pasado este tiempo hemos pasado a la realización del barrido de frecuencias para la obtención de los datos.

Después de hacer múltiples pruebas sin activar los sensores y activándoles para mejorar su respuesta observamos que no se notaban diferencias entre las muestras, no pudiendo distinguir si las pequeñas diferencias eran debidas a las distintas leches o a errores de reproducibilidad o repetibilidad. En la figura 14 se muestra un ejemplo de los diagramas de Bode obtenidos en una de estas pruebas. En este caso las medidas están tomadas con muestras de leche clásica desnatada, semidesnatada y entera sin diluir y sensores IDE1 de Pt. Se han realizado pruebas con otros sensores impedimétricos, cambiando la concentración de leche diluyéndola en agua mili-Q, diluyendo en ferro-ferri para potenciar la medida de las impedancias y hemos obtenido las mismas respuestas.

Después de todas estas medidas se ha llegado a la conclusión que estos sensores con los procedimientos que hemos usado no consiguen discriminar entre las diferentes leches y requieren de un estudio en mayor profundidad. Hemos concluido que una de las causas más probables del mal funcionamiento de los sensores con la leche puede ser la grasa. Estos sensores son de un tamaño muy pequeño y muy delicados y al usar muestras de leche, estos quedan manchados muy fácilmente con la grasa contenida en la leche, siendo muy complicado quitar las manchas de grasa, por lo que cabe la posibilidad que esta grasa altere la capacidad del sensor para discriminar. No obstante, y como desarrollaremos en el apartado de posibilidades

futuras más adelante, esta opción la dejaremos planteada para realizar más adelante en otro trabajo.

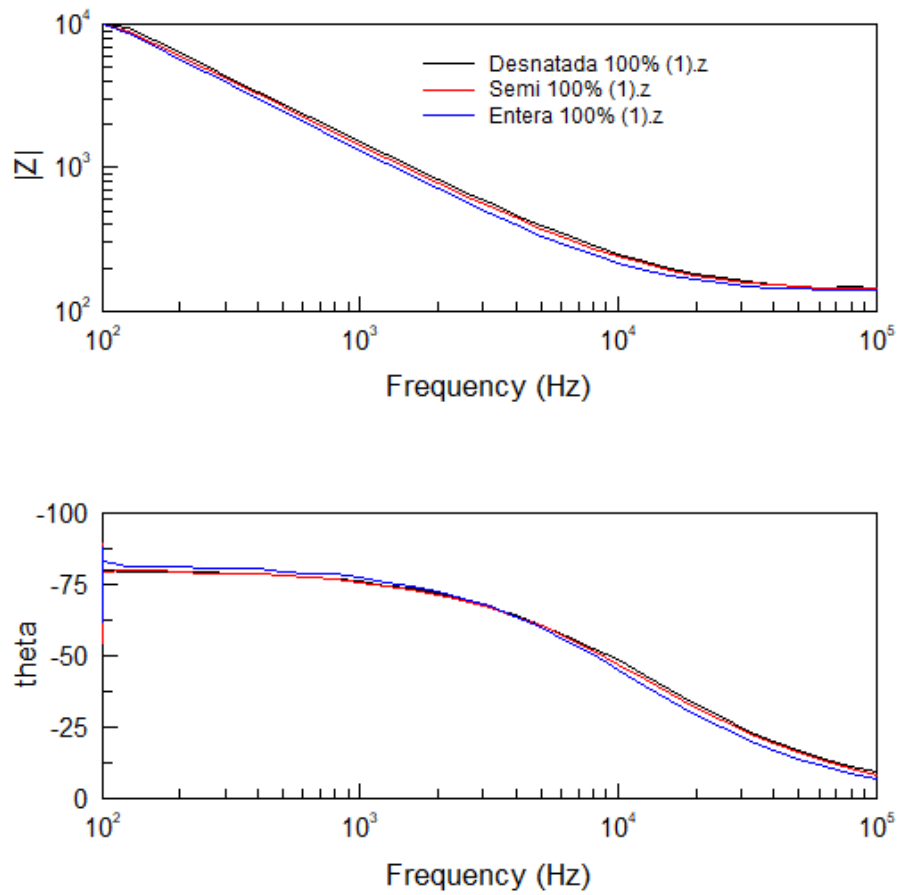


Figura 23. Diagramas de Bode de leche clásica con sensores impedimétricos interdigitados



# CAPITULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES



## 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 4.1. SENSORES POTENCIOMÉTRICOS

#### 4.1.1. Reproducibilidad

En primer lugar, se hicieron pruebas de reproducibilidad y repetibilidad de los sensores potenciométricos para determinar la viabilidad de la lengua potenciométrica y comprobar que los resultados de dicho experimento podrían ser representativos del analito. A continuación, se muestran las pruebas de repetibilidad de dos tipos de leche medidas como muestras representativas.

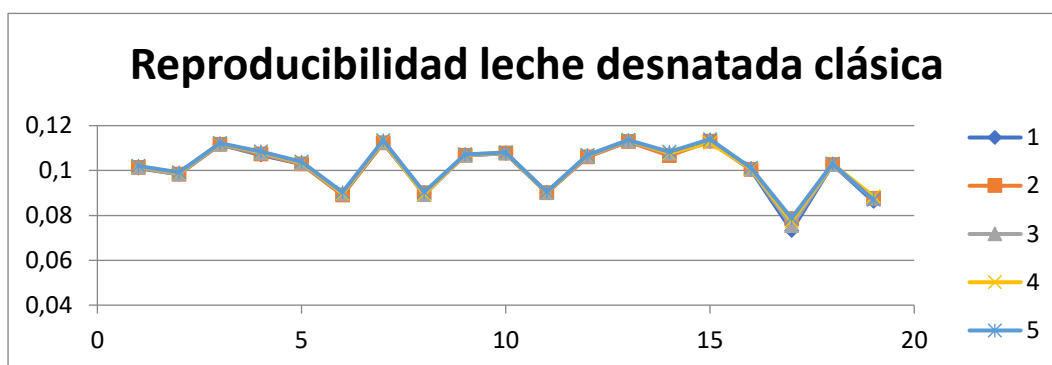


Figura 24. Gráfica reproducibilidad de la leche desnatada clásica

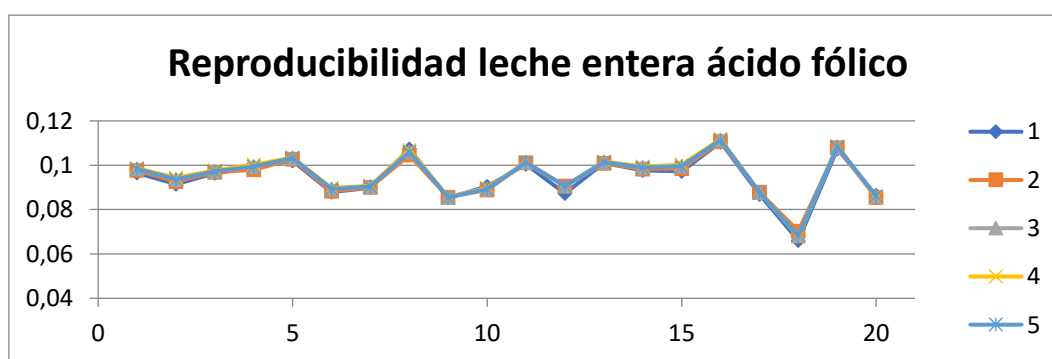


Figura 25. Gráfica reproducibilidad de la leche entera con ácido fólico

Como podemos observar se han hecho cinco experimentos bajo las mismas condiciones (para cada tipo de leche). Como podemos comprobar la reproducibilidad es buena y vemos como hay diferencias mínimas entre cada una de las 5 medidas.

Una vez comprobado y dado por bueno este aspecto pasamos a la toma de datos definitiva de todas las leches.

#### 4.1.2. Comparativa entre leches de la misma clase

La primera comparativa que vamos a hacer será entre leches de la misma clase (entendemos por clase las agrupaciones que hace leche Pascual dentro de su catálogo de leches). Por lo tanto, veremos la diferencia en las medidas de nuestro sensor potenciométrico de la leche desnatada, semidesnatada y entera de cada clase, eliminando la de la leche pro-activa colesterol por tener solo la versión semidesnatada.

Los resultados fueron los siguientes:

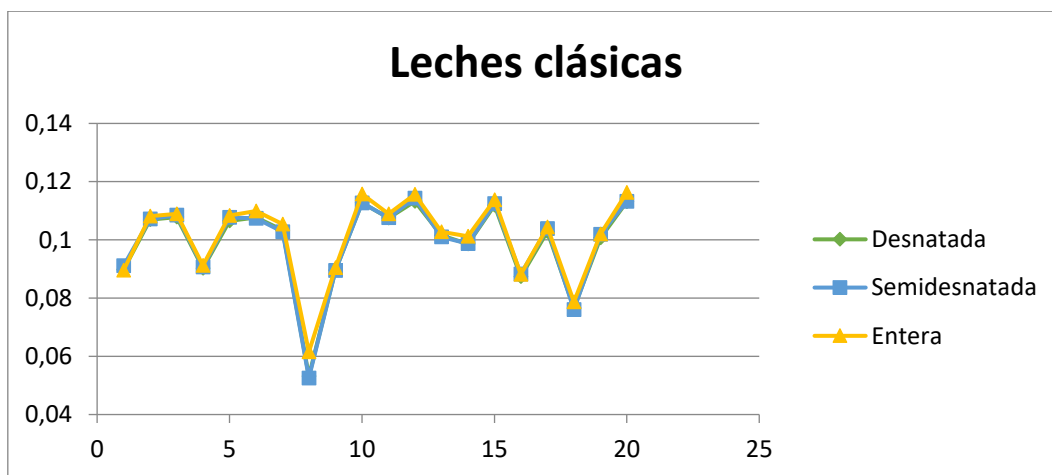


Figura 26. Comparativa leches clásicas con el sensor potenciométrico



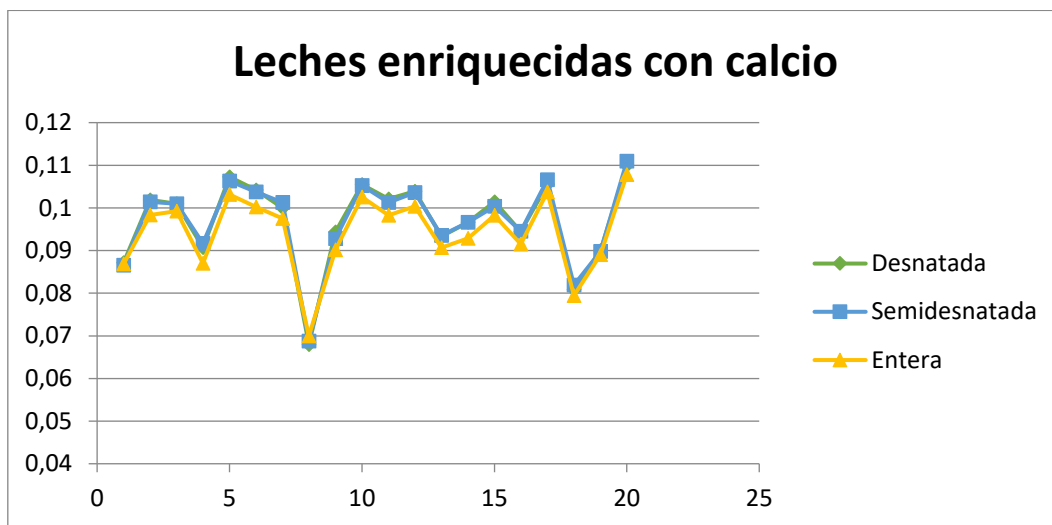


Figura 27. Comparativa leches con calcio con el sensor potenciométrico

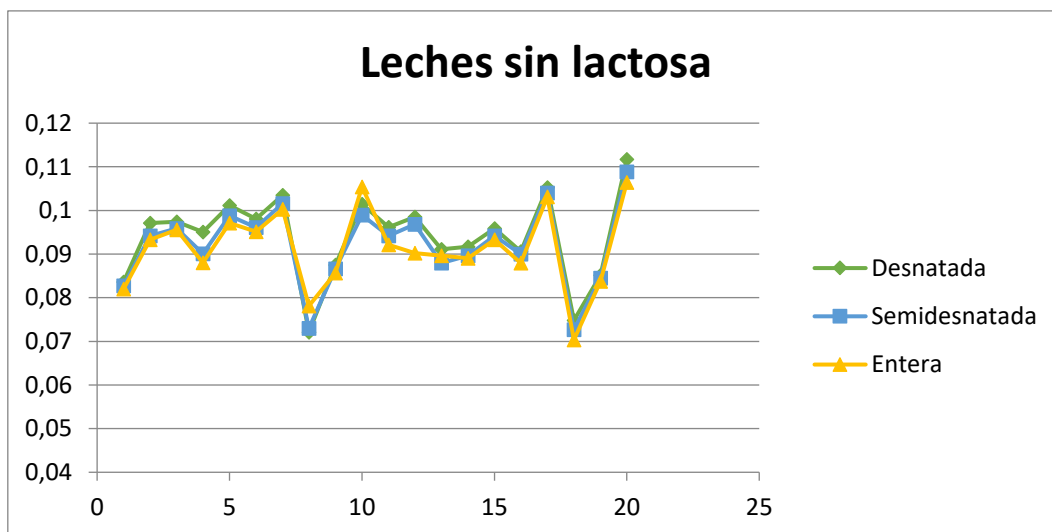


Figura 28. Comparativa sin lactosa con el sensor potenciométrico

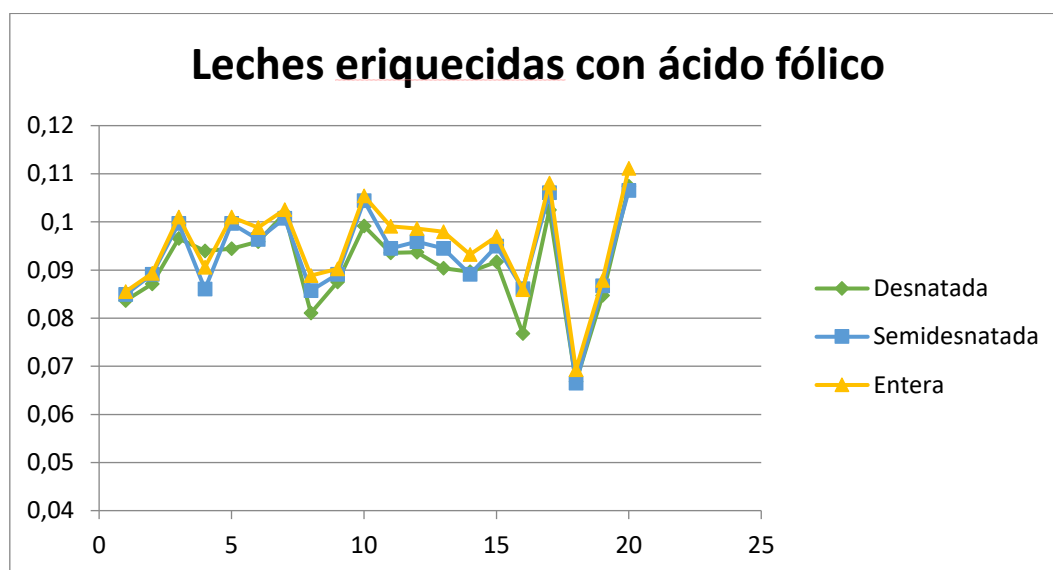


Figura 29. Comparativa leches con ácido fólico con el sensor potenciométrico

Los resultados muestran que las membranas son capaces de distinguir entre las diferentes variedades en función de su contenido graso si bien es en el caso de las leches modificadas donde las diferencias entre los tres contenidos grasos son más significativas,

#### 4.1.3. Comparativa entre leches del mismo tipo

La siguiente comparativa será entre leches del mismo tipo (entendemos por tipo todas las desnatadas, semidesnatadas o enteras). Por lo tanto, veremos la influencia de las alteraciones que se han hecho a la leche con respecto a la leche clásica en cada uno de sus formatos (desnatada, semidesnatada y entera). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

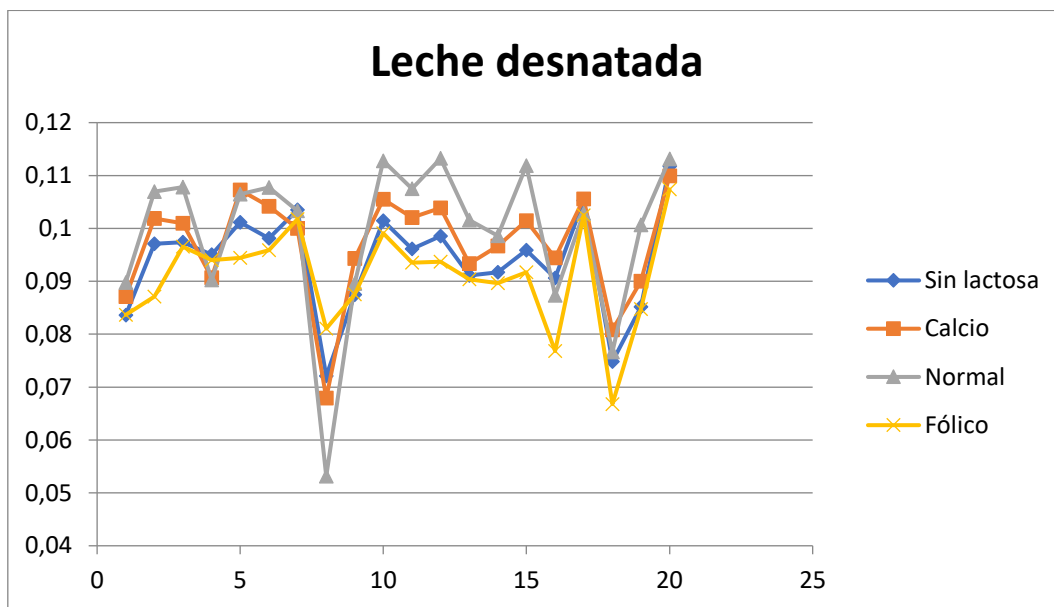


Figura 30. Comparativa leches desnatadas con el sensor potenciométrico

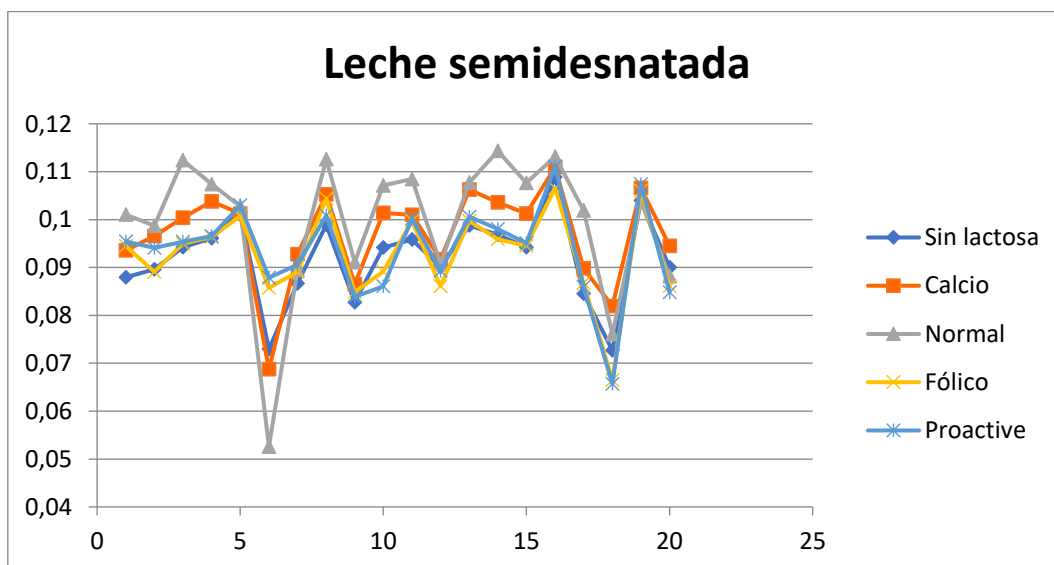


Figura 31. Comparativa leches semidesnatadas con el sensor potenciométrico

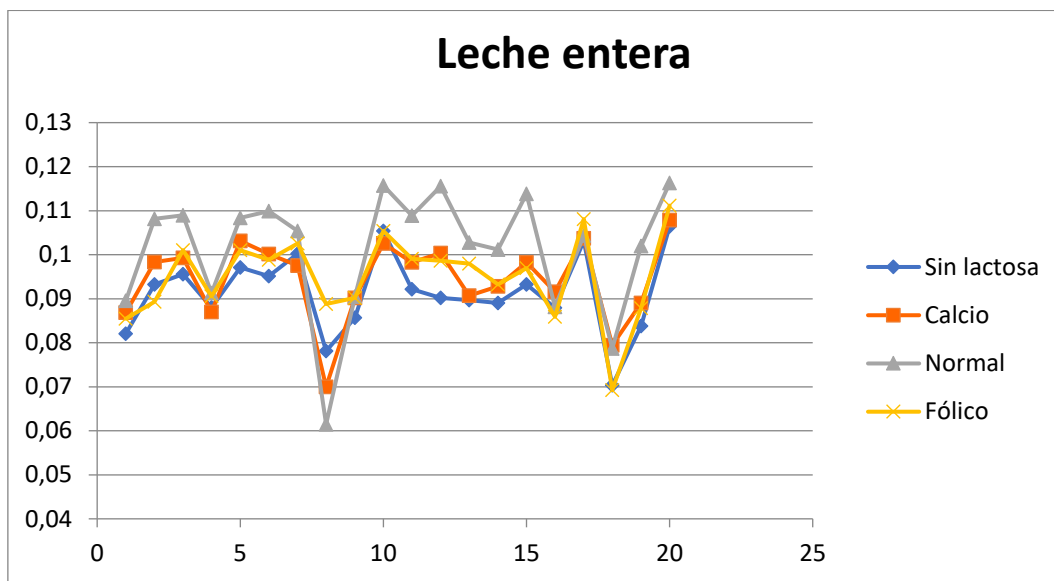


Figura 32. Comparativa leches enteras con el sensor potenciométrico

Los resultados indican, tal y como era previsible, que las diferencias son mucho más notables que las detectadas en función de los contenidos grasos. La mayoría de las membranas dan señales diferentes en función de los diferentes aditivos añadidos a la leche siguiendo una la misma tendencia en los tres tipos de leche entera, semidesnatada y desnatada.

#### 4.1.4. Envejecimiento

Por último, hemos querido medir la influencia del paso del tiempo en una leche abierta para ver cómo afecta el tiempo a la degradación de la leche y su consecuente pérdida de propiedades y constatar que nuestros sensores son capaces de detectar estos cambios. Para ello hemos cogido las medidas obtenidas en el día 0 (día de apertura del cartón de leche) que hemos mostrado en los anteriores apartados y las hemos comparado con las medidas obtenidas de esas mismas leches una semana después de su apertura (día 7).

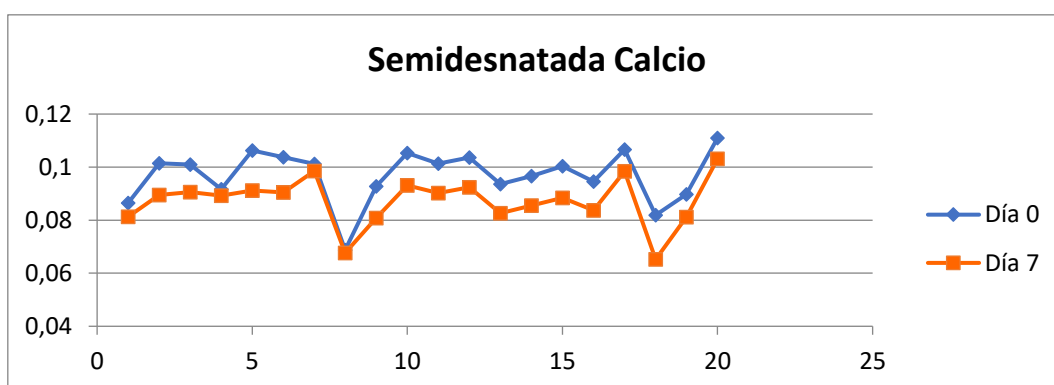


Figura 33. Envejecimiento leche semidesnatada con calcio con el sensor potenciométrico

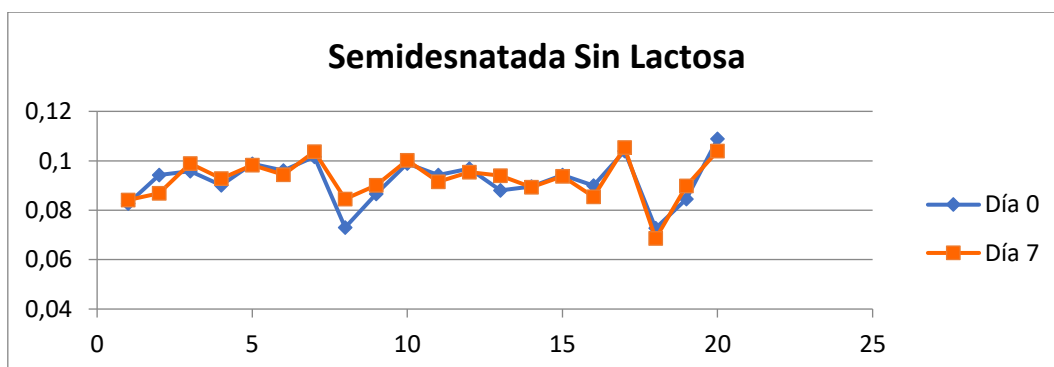


Figura 34. Envejecimiento leche semidesnatada sin lactosa con el sensor potenciométrico

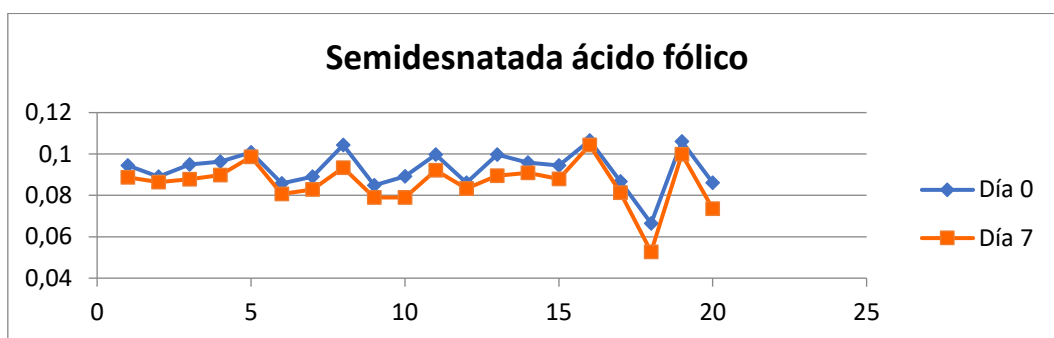


Figura 35. Envejecimiento leche semidesnatada con ácido fólico con el sensor potenciométrico

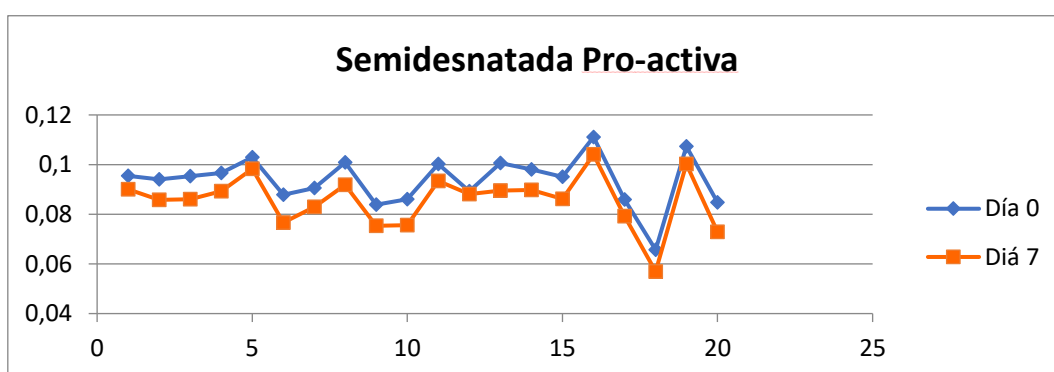


Figura 36. Envejecimiento leche semidesnatada pro-activa con el sensor potenciométrico

Se puede observar una diferencia visible entre las muestras de 0 y 7 días, por lo que podemos concluir que la mayoría de los sensores potenciométricos son capaces de observar la existencia de degradación, visible en la toma de datos, de nuestras leches.

#### 4.1.5. Tratamiento estadístico de datos. Variedades de leches

##### *Análisis de componentes principales*

Una vez vista la diferencia entre todos los tipos y clases de leche y la influencia del envejecimiento en los mismos, de forma cualitativa, hemos pasado a comprobar de mejor forma estas influencias mediante un tratamiento estadístico de datos para ver si entre las diferencias en las medidas y los análisis químicos de las leches proporcionados por leche Pascual se puede ver la influencia de distintos factores dentro de las leches.

Para el tratamiento estadístico se ha usado el Análisis de Componentes Principales (PCA) que permite hacer un análisis de discriminación.

En primer lugar, hemos querido ver si podíamos discriminar las leches desnatadas, semidesnatadas y enteras de cada una de las clases de leches que hemos medido. El resultado ha sido el siguiente:

##### LECHE CLÁSICA

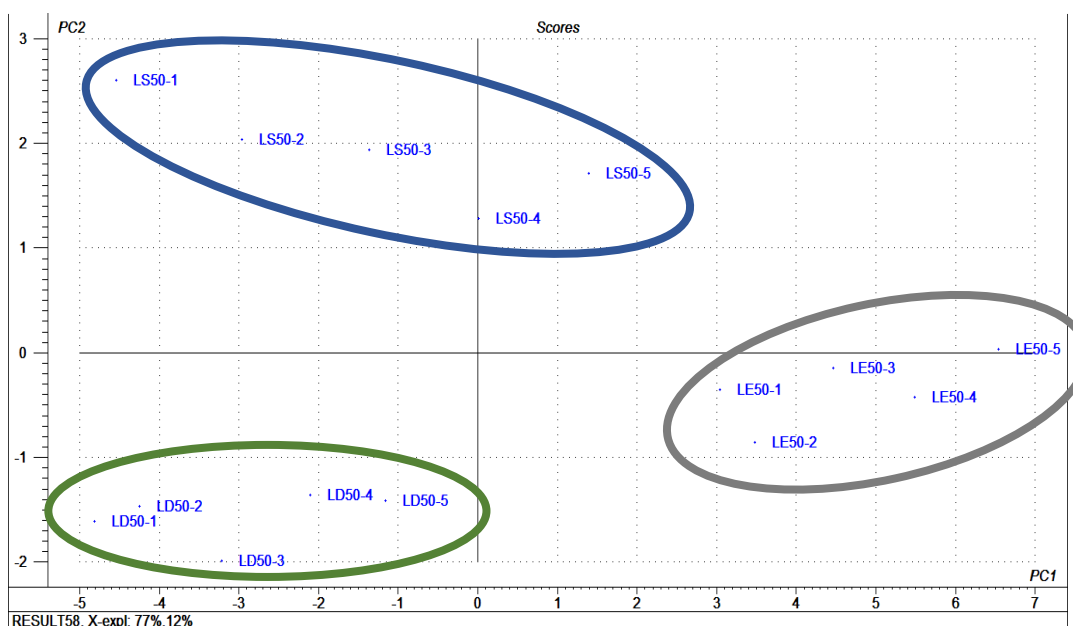


Figura 37. PCA leche clásica con el sensor potenciométrico

En la anterior imagen se muestra el score 2D de la leche clásica. Vemos como la primera componente (PC1) contiene el 77% de la variabilidad y la segunda

componente (PC2) contiene un 12%. Esto significa que el modelo de PCA nos está mostrando un 89% de la información original del muestreo.

Podemos ver como efectivamente se pueden apreciar tres agrupaciones de datos bien diferenciados. Por un lado, las leches desnatadas (verde), por otro las semidesnatadas (azul) y por último las enteras (gris). Por lo tanto, podemos confirmar que hemos obtenido una buena discriminación entre los tipos de leche clásica.

### LECHES CON CALCIO

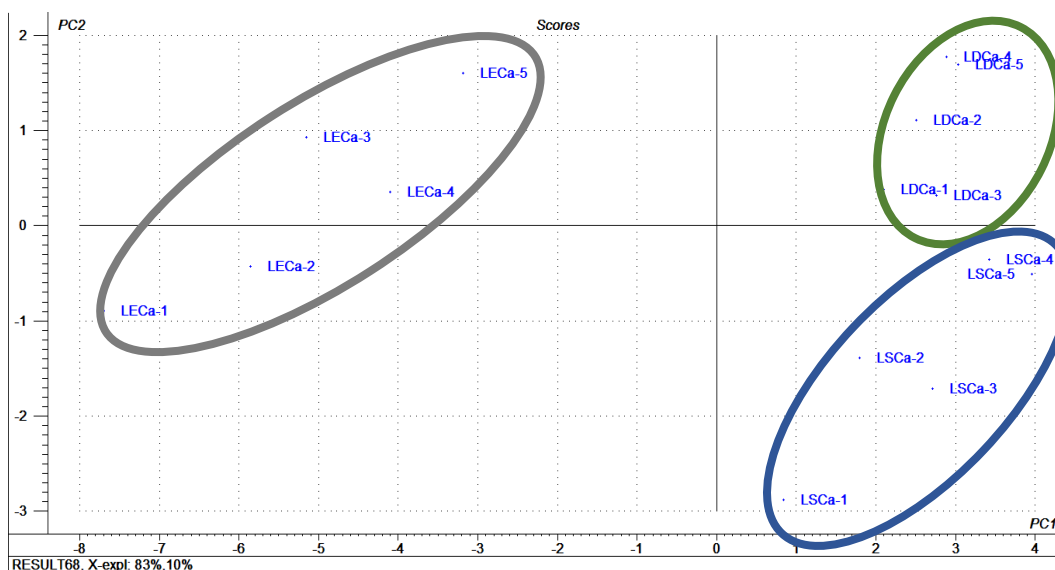


Figura 38. PCA leche con calcio con el sensor potenciométrico

En la figura 38 se muestra el score 2D de la leche con calcio. Vemos como la primera componente (PC1) contiene el 83% de la variabilidad y la segunda componente (PC2) contiene un 10%, lo que nos da un 93% de la información original del muestreo.

Al igual que con la leche clásica se pueden apreciar tres agrupaciones de datos bien diferenciados. Leches desnatadas (verde), semidesnatadas (azul) y enteras (gris). Por lo tanto, podemos confirmar que hemos obtenido una buena discriminación entre los tipos de leche con calcio.



## LECHE SIN LACTOSA

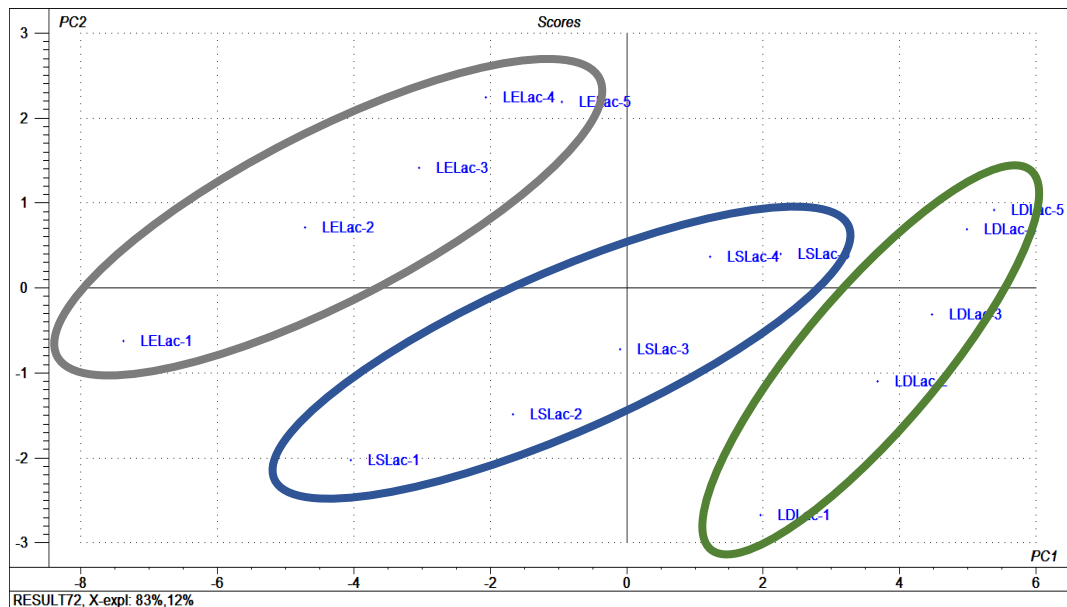


Figura 39. PCA leche sin lactosa con el sensor potenciométrico

En la figura 39 se muestra el score 2D de la leche sin lactosa. Vemos como la primera componente (PC1) contiene el 83% de la variabilidad y la segunda componente (PC2) contiene un 12%, lo que nos da un 95% de la información original del muestreo.

Al igual que las anteriores podemos apreciar tres agrupaciones de datos bien diferenciados. Leches desnatadas (verde), semidesnatadas (azul) y enteras (gris). Por lo tanto, podemos confirmar que hemos obtenido una buena discriminación entre los tipos de leche sin lactosa.

LECHE CON ÁCIDO FOLICO

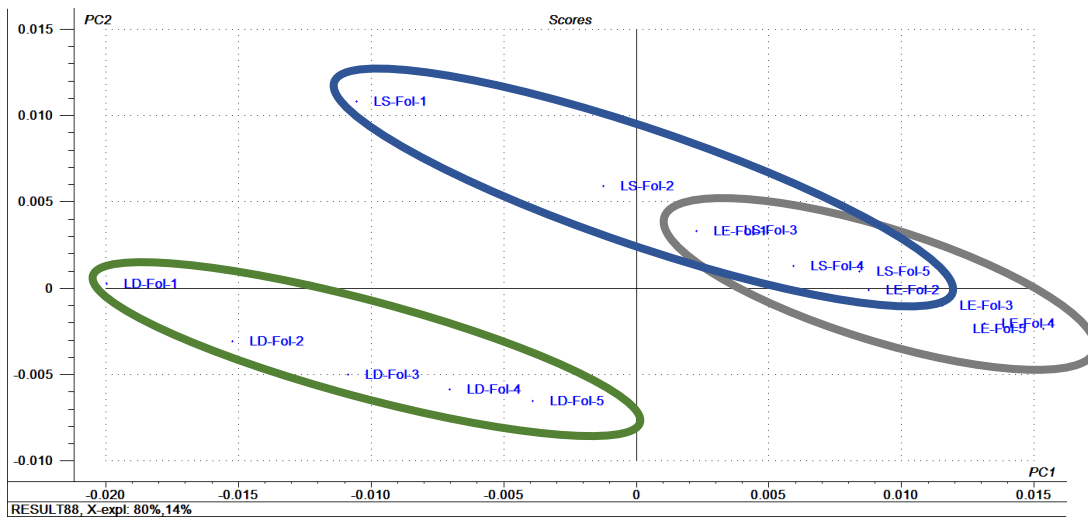


Figura 40. PCA (2D) leche con ácido fólico con el sensor potenciométrico

En Figura 40 se muestra el score 2D de la leche con ácido fólico. Tenemos una PC1 que contiene el 80% de la variabilidad y una PC2 que contiene un 12%, lo que nos da un 92% de la información original del muestreo.

En este caso vemos una agrupación claramente diferenciada que es la de leches desnatadas (verde) y dos agrupaciones que se solapan que son la de leches semidesnatadas (azul) y enteras (gris). Como es un score 2D no sabemos la profundidad por lo que no podemos asegurar si ambas agrupaciones se solapan o es solo una apreciación visual del 2D. Por esta razón recurrimos al 3D (Figura 41)

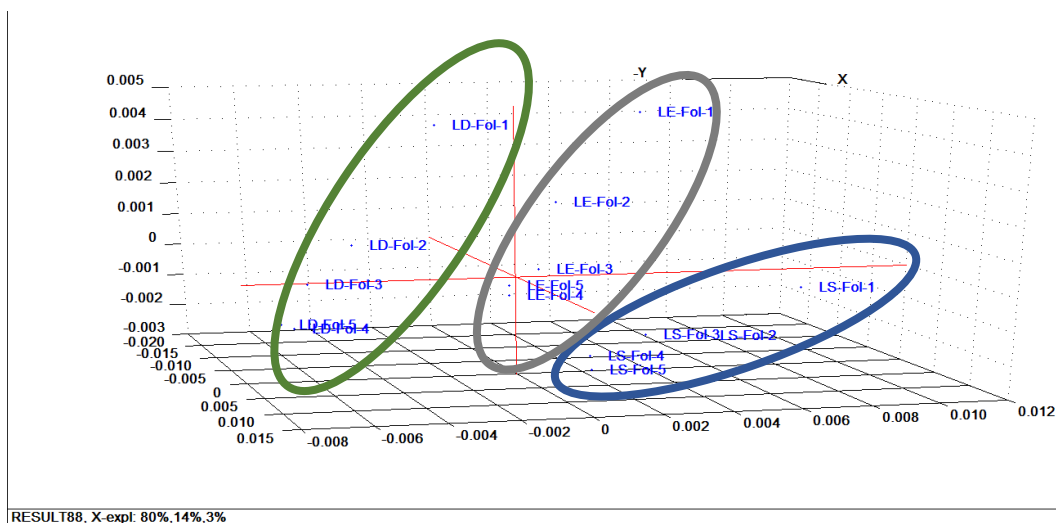


Figura 41. PCA (3D) leche con ácido fólico con el sensor potenciométrico

En la vista en 3D en la cual tenemos una PC1 que comprende el 80% de información, una PC2 del 14% y una PC3 del 3%. Aquí podemos ver como se diferencian las 3 agrupaciones perfectamente, leches desnatadas (verde), semidesnatadas (azul) y enteras (gris), por lo que podemos afirmar que lo visto en 2D solo era un problema de la propia visualización en 2D, al añadir la tercera componente el modelo discrimina claramente entre los tres tipos de contenidos grasos. Por lo tanto, podemos confirmar que hemos obtenido una buena discriminación entre los tipos de leche con ácido fólico.

Al igual que en apartados anteriores, no vamos a realizar este análisis multivariante a la leche pro-activa ya que solo existe su variante semidesnatada y no tendríamos con que comparar los datos obtenidos.

En la figura 42 se muestra el score 2D obtenido con todas las leches. Podemos observar las diferencias entre las leches según su contenido nutricional.

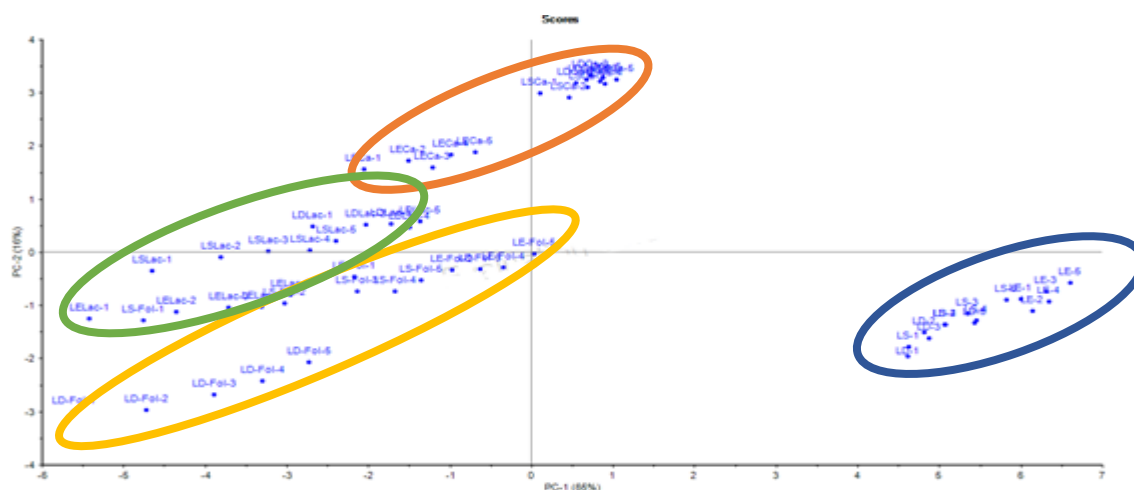


Figura 42. PCA todas las leches con el sensor potenciométrico

Podemos ver la diferencia entre las leches y por lo tanto, podemos decir que el sensor discrimina también entre leches según su contenido nutricional.

#### *Regresión por mínimos cuadrados parciales*

A continuación, realizamos el análisis PLS con los datos químicos proporcionados por leche Pascual de sus leches con objeto de determinar si el modelo matemático diseñado a partir de la lengua potenciométrica podría ser utilizado para determinar los parámetros químicos de interés una vez que haya sido entrenado

Las figuras 43, 44, 45 y 46 nos muestran los resultados de la correlación para las variedades desnatadas con los algunos de los parámetros seleccionados: densidad, porcentaje de materia grasa, porcentaje de proteína y sedimentación.

*Leche desnatada*

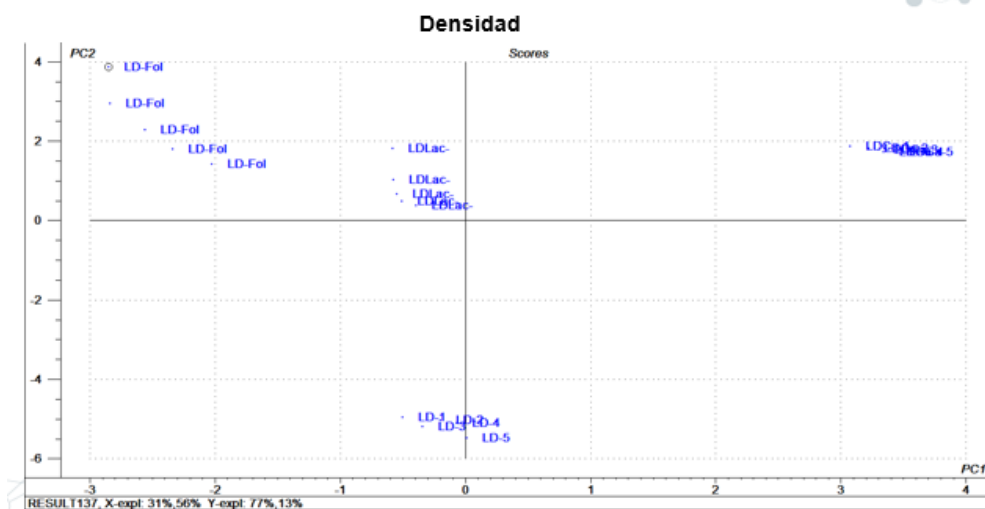


Figura 43. PLS de la densidad leche desnatada con el sensor potenciométrico

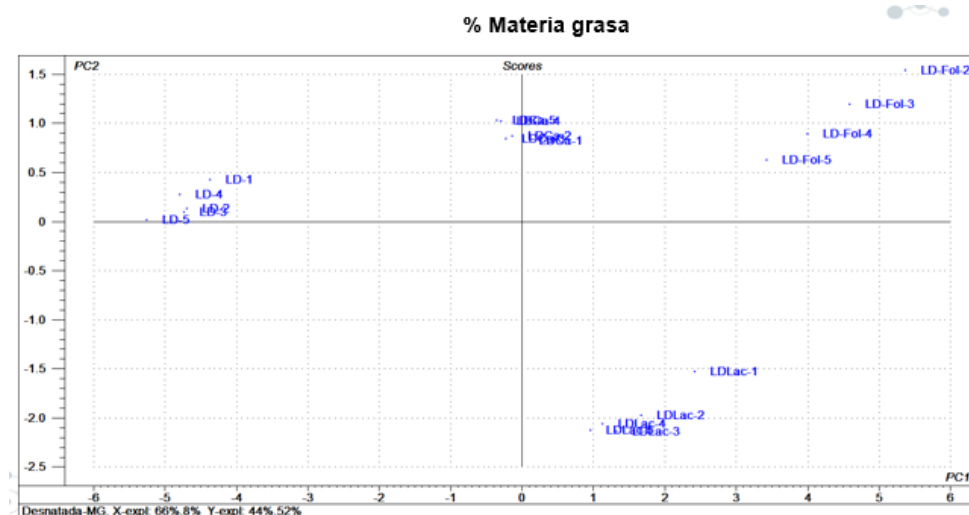


Figura 44. PLS de la materia grasa leche desnatada con el sensor potenciométrico

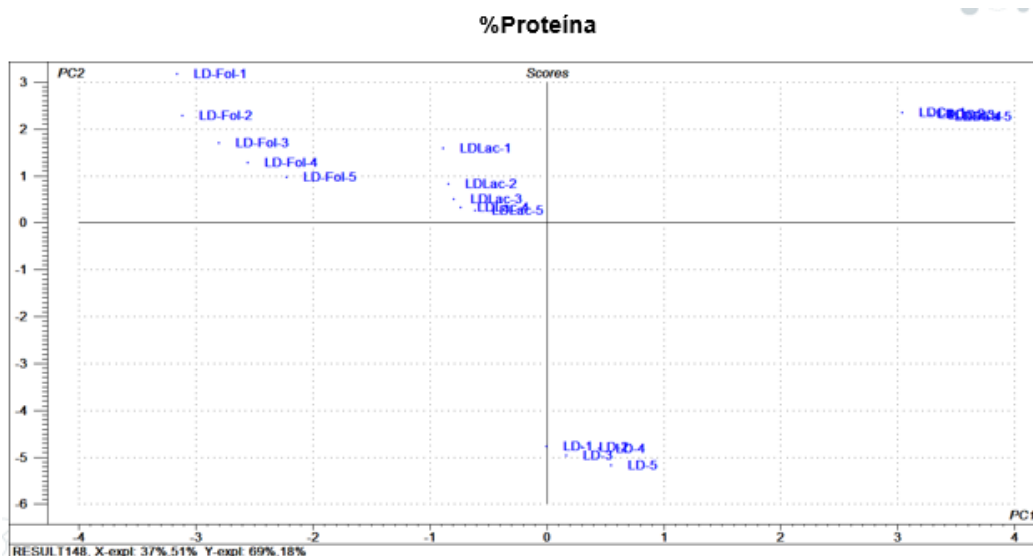


Figura 45. PLS de las proteínas de la leche desnatada con el sensor potenciométrico

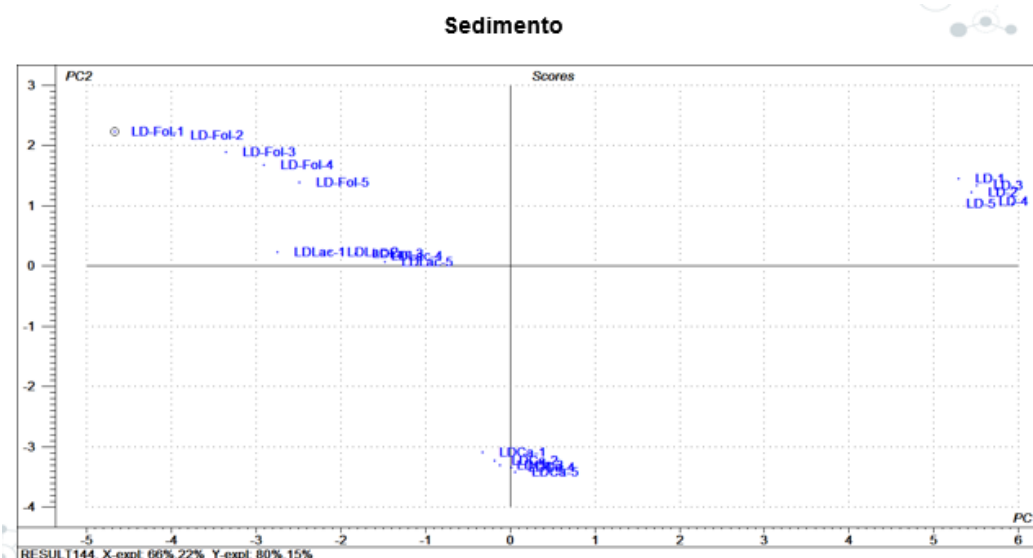


Figura 46. PLS de los sedimentos de la leche desnatada con el sensor potenciométrico

En la tabla 5 mostramos los datos obtenidos de las PLS para la leche desnatada.

Parámetro	$R^2_C$	RMSE <sub>C</sub>	$R^2_P$	RMSE <sub>P</sub>	Variables latentes
Acidez	0,9879	0,2064	0,9761	0,2741	3
Densidad	0,9968	0,1233	0,9944	0,1733	3
Sedimento	0,9978	0,0143	0,9897	0,0206	3
%Proteína	0,9966	0,0121	0,9940	0,0169	3
%MG	0,9933	0,0061	0,9878	0,0092	2

Tabla 5. Resultados PLS de la leche desnatada con el sensor potenciométrico



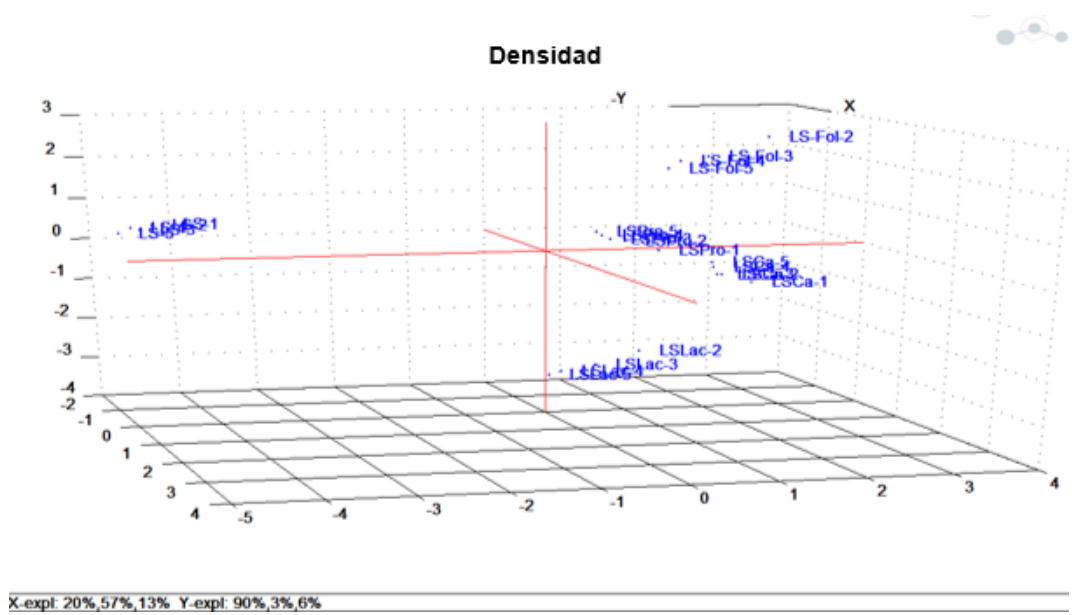


Figura 48. PLS de la densidad de la leche semidesnatada con el sensor potenciométrico

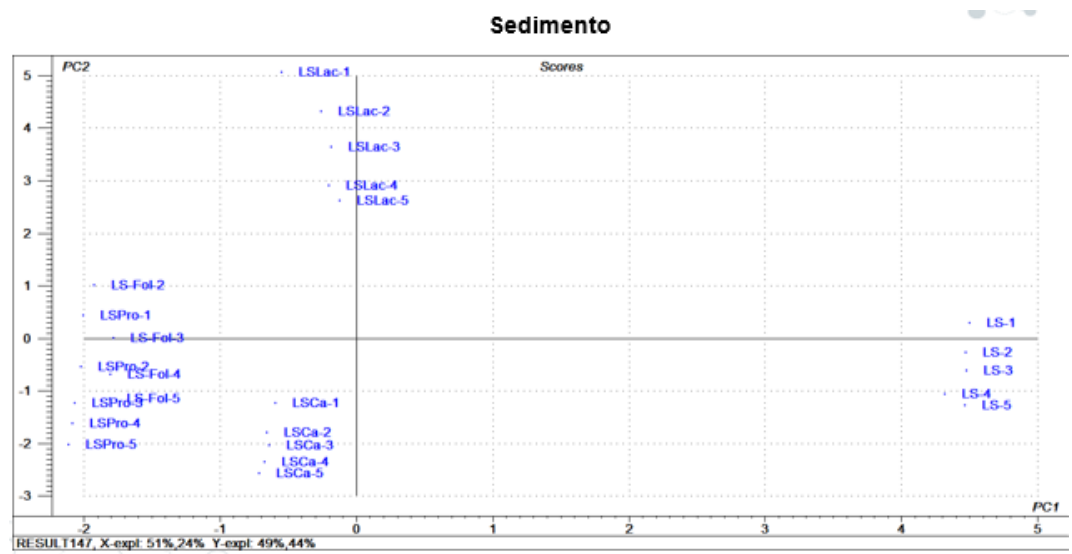


Figura 49. PLS de los sedimentos de la leche semidesnatada con el sensor potenciométrico

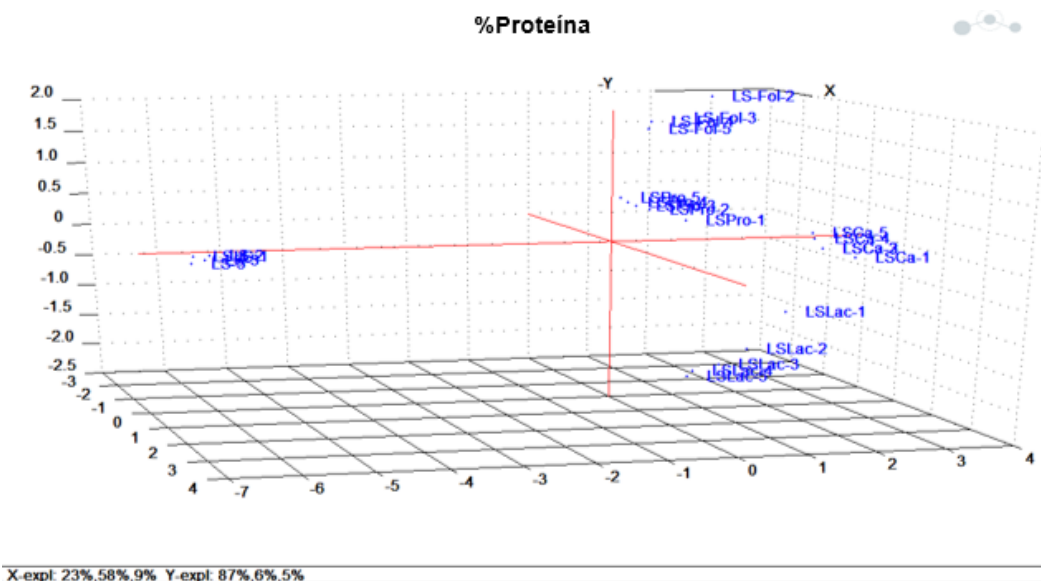


Figura 50. PLS de las proteínas de la leche semidesnatada con el sensor potenciométrico

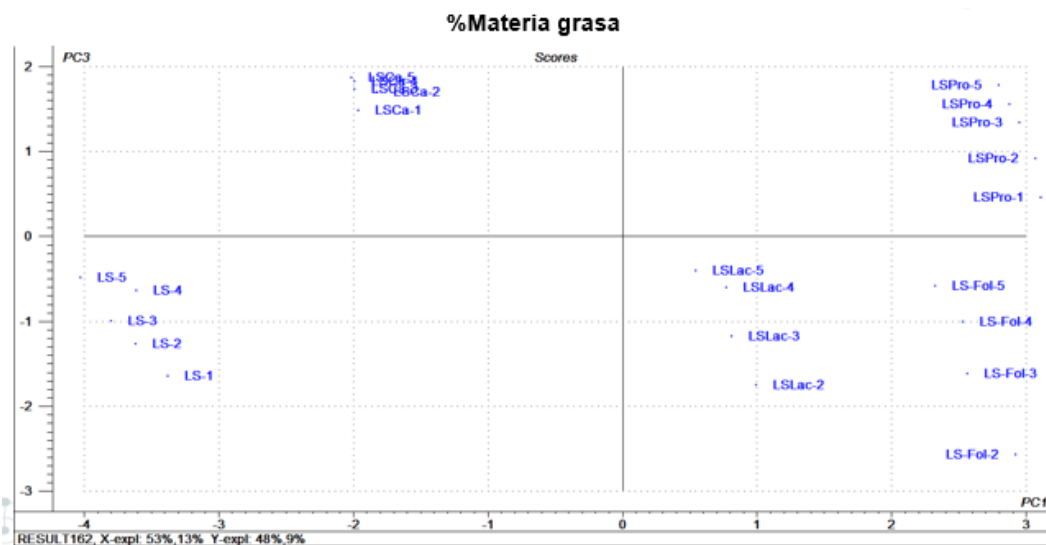


Figura 51. PLS de la materia grasa de la leche semidesnatada con el sensor potenciométrico

Parámetro	$R^2_C$	RMSE <sub>C</sub>	$R^2_P$	RMSE <sub>P</sub>	Variables latentes
Acidez	0,9789	0,1916	0,9673	0,2587	3
Densidad	0,9937	0,2116	0,9871	0,2879	3
Sedimento	0,9840	0,0065	0,9729	0,0089	4
%Proteína	0,9924	0,0267	0,9874	0,0353	3
%MG	0,9939	0,0383	0,9871	0,0471	3

Tabla 6. Resultados PLS de la leche semidesnatada con el sensor potenciométrico





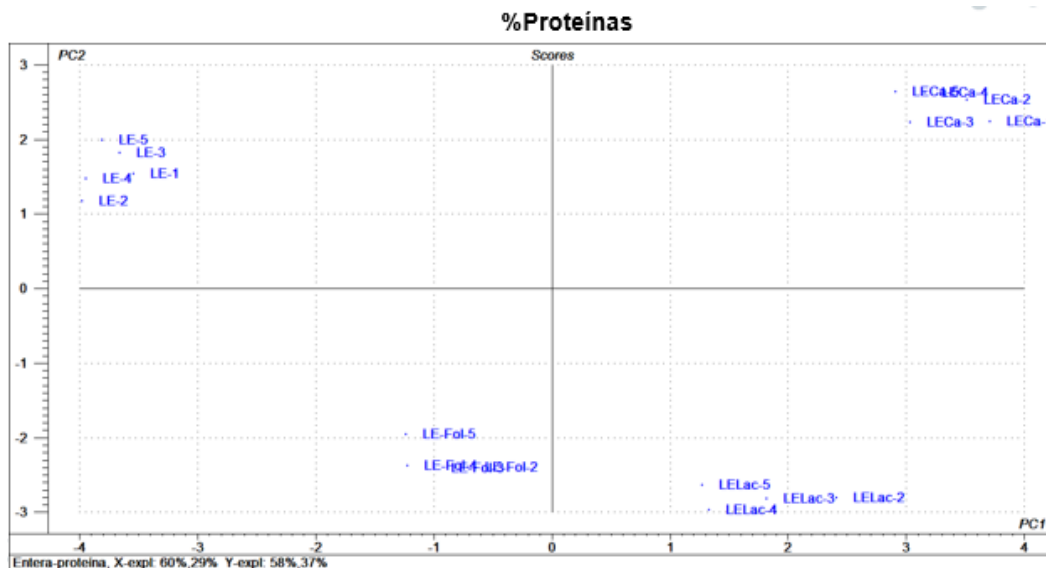


Figura 54. PLS de las proteínas de la leche entera con el sensor potenciométrico

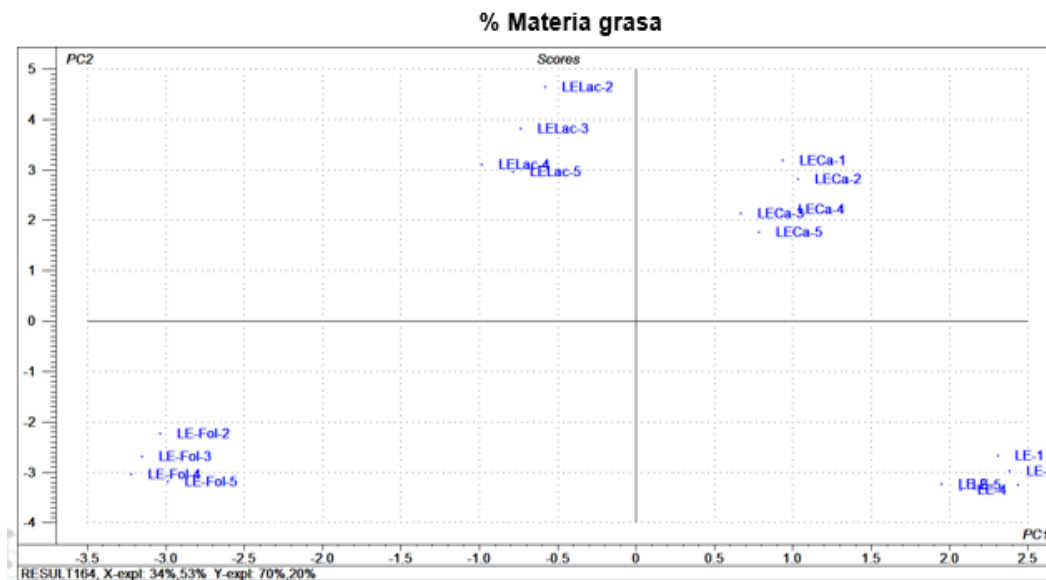


Figura 55. PLS de la materia grasa de la leche entera con el sensor potenciométrico

Parámetro	$R^2_C$	RMSE <sub>C</sub>	$R^2_P$	RMSE <sub>P</sub>	Variables latentes
<b>Acidez</b>	0,9953	0,1153	0,9927	0,1526	3
<b>Densidad</b>	0,9958	0,1445	0,9934	0,1913	3
<b>Sedimento</b>	0,9945	0,0875	0,9920	0,0956	3
<b>%Proteína</b>	0,9942	0,0211	0,9910	0,0280	3
<b>%MG</b>	0,9966	0,0106	0,9916	0,0179	3

Tabla 7. Resultados PLS de la leche entera con el sensor potenciométrico

Al igual que con la leche desnatada y con la leche semidesnatada, en la tabla 7 vemos los datos obtenidos en las PLS son buenos y podemos decir que hemos conseguido discriminar entre los distintos tipos de leche entera. En este caso los valores del ajuste son mejores que los obtenidos para la leche semidesnatada con menores datos de error e idéntico e incluso menor, en algunos casos, número de variables latentes.

Por tanto, podemos concluir que con la lengua potenciométrica diseñada no sólo podemos discriminar entre los trece tipos de leche suministrados por Leche Pascual sino que nuestro modelo puede ser utilizado con éxito para predecir parámetros químicos de interés como la densidad, el % de proteína, el % de materia grasa, acidez y sedimento.

#### 4.1.6. Tratamiento estadístico de los datos. Envejecimiento

Ahora vamos a exponer los resultados de los análisis estadísticos obtenidos sobre el envejecimiento de las leches medido con los sensores potenciométricos. Hemos realizado un análisis simple mediante PCA para ver si podemos discriminar entre leches en su estado original de leches envejecidas, en este caso, tras un periodo de 7 días abiertas. Para ello vamos a analizar las leches por separado.

##### *Leche clásica*

Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales para las leches clásicas originales y envejecidas se muestra en la figura 56.

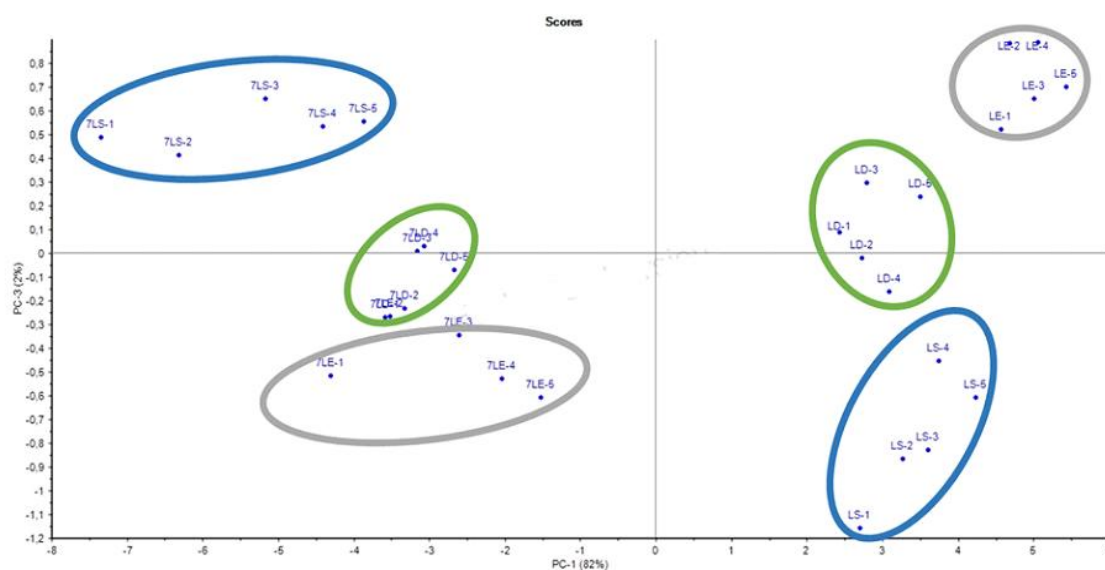


Figura 56. PCA de la leche clásica original y envejecida con el sensor potenciométrico

En la figura 56 hemos usado un score 2D de la PC1 y PC3, que es la que mejor muestra la diferencia entre las muestras. Se han acotado los resultados en color para facilitar su visualización (desnatada en verde, semidesnatada en azul y entera en gris). Se puede apreciar como las leches se diferencian claramente, pudiéndose ver las envejecidas a un lado y las originales al otro. Por lo tanto, podemos concluir que los sensores discriminan cada leche envejecida con respecto a la original y entre todas las envejecidas y las originales de forma eficaz.

### Leche enriquecida con calcio

Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales para las leches enriquecidas con calcio originales y envejecidas se muestran en la figura 57.

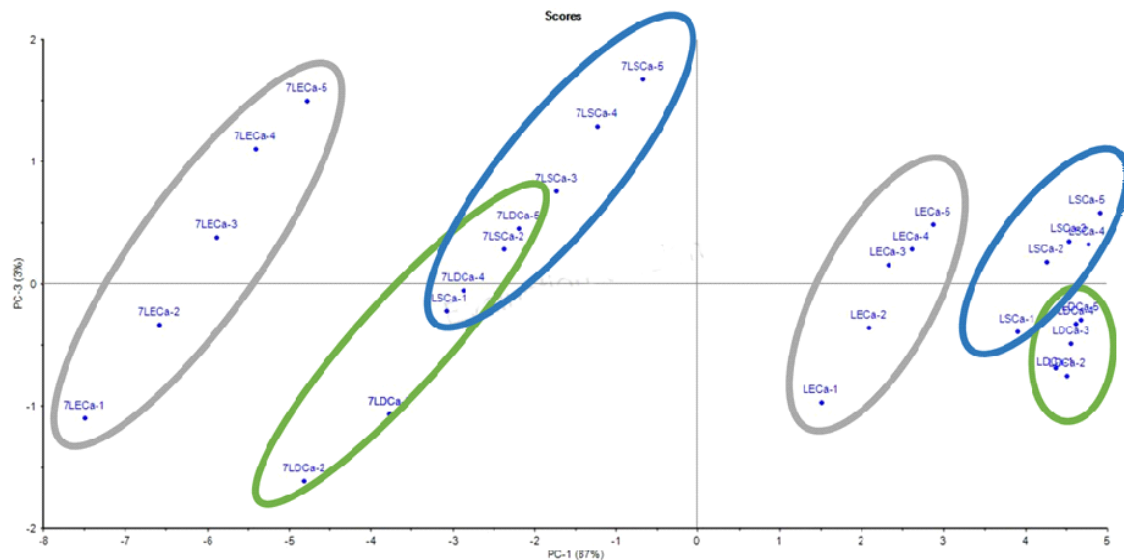


Figura 57. PCA de la leche con Ca original y envejecida con el sensor potenciométrico

En la figura 57 hemos usado un score 2D de la PC1 y PC3, por ser la que mejor muestra los resultados. Al igual que con las leches clásicas se puede apreciar como a un lado están las envejecidas y al otro las originales. Por lo tanto, podemos concluir que los sensores discriminan las leches enriquecidas con calcio tras 7 días de envejecimiento con respecto a las originales.

### Leche sin lactosa

Los resultados obtenidos de la PCA para las leches sin lactosa originales y envejecidas se muestran en la figura 58.

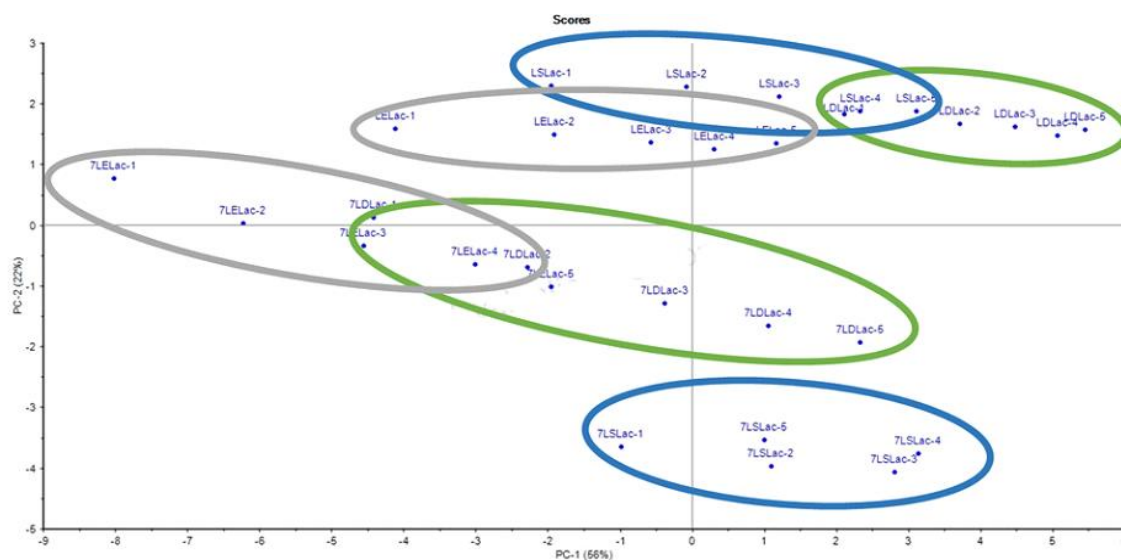


Figura 58. PCA de la leche sin lactosa original y envejecida con el sensor potenciométrico

En la figura 58 vemos el score 2D de la PC1 y PC2. Se puede apreciar como en la parte superior se agrupan las leches originales y en la parte inferior las envejecidas. Por lo tanto, al igual que las anteriores también llegamos a la conclusión de que los sensores discriminan las leches sin lactosa con calcio envejecidas con respecto a las originales.

### Leche con ácido fólico

Los resultados obtenidos de la PCA para las leches con ácido fólico se muestran en la figura 59.

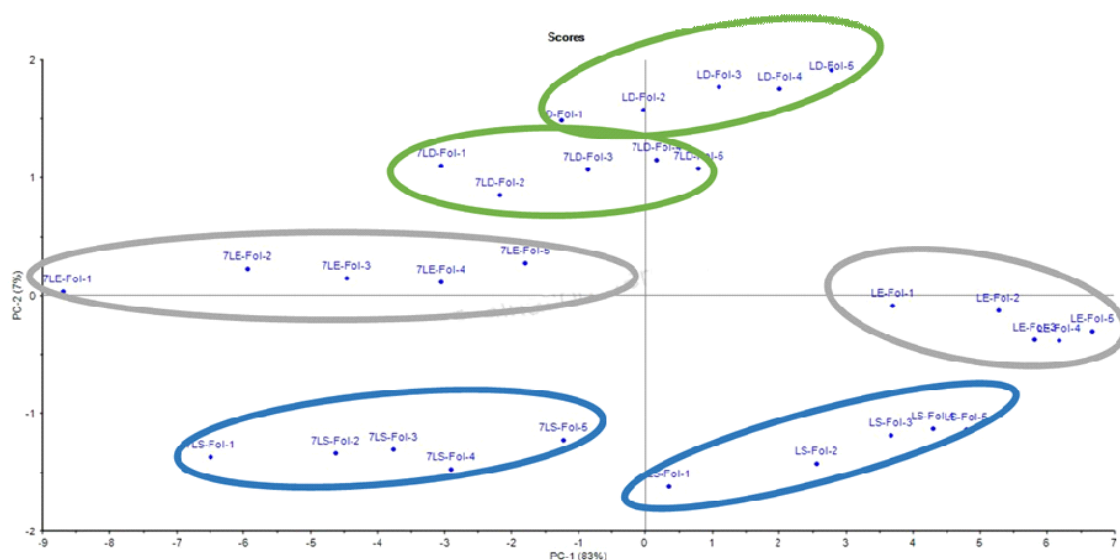


Figura 59. PCA de la leche con ácido fólico original y envejecida con el sensor potenciométrico

En la figura 59 vemos el score 2D de la PC1 y PC2. Se puede apreciar como en la parte izquierda se agrupan las leches envejecidas y en la parte derecha las originales. También vemos como esta diferencia es clara en el caso de la leche semidesnatada y entera, pero en la semidesnatada esa diferencia es menor, llegando incluso a no diferenciarse apenas algunas de estas muestras. Esto puede ser debido a algún fallo en el experimento, ya que en general parece que las diferencias son notables. Por lo tanto, y asumiendo que puede haber algún pequeño fallo en la medida o en las condiciones del experimento, llegamos a la conclusión de que los sensores discriminan las leches con ácido fólico envejecidas con respecto a las originales.

Para concluir, y viendo el resultado obtenido en todas las PCA, podemos afirmar que nuestros sensores potenciométricos pueden discriminar de forma notable las muestras de leche originales de las mismas envejecidas durante 7 días.

## 4.2. SENSORES VOLTAMÉTRICOS

### 4.2.1. Reproducibilidad

Al igual que en los sensores potenciométricos en primer lugar se hicieron pruebas de reproducibilidad y repetitibilidad del experimento para ver si los resultados de la lengua voltamétrica podrían ser representativos. En la figura 60 se muestran las pruebas de reproducibilidad de dos tipos de leche medidas como muestras representativas.

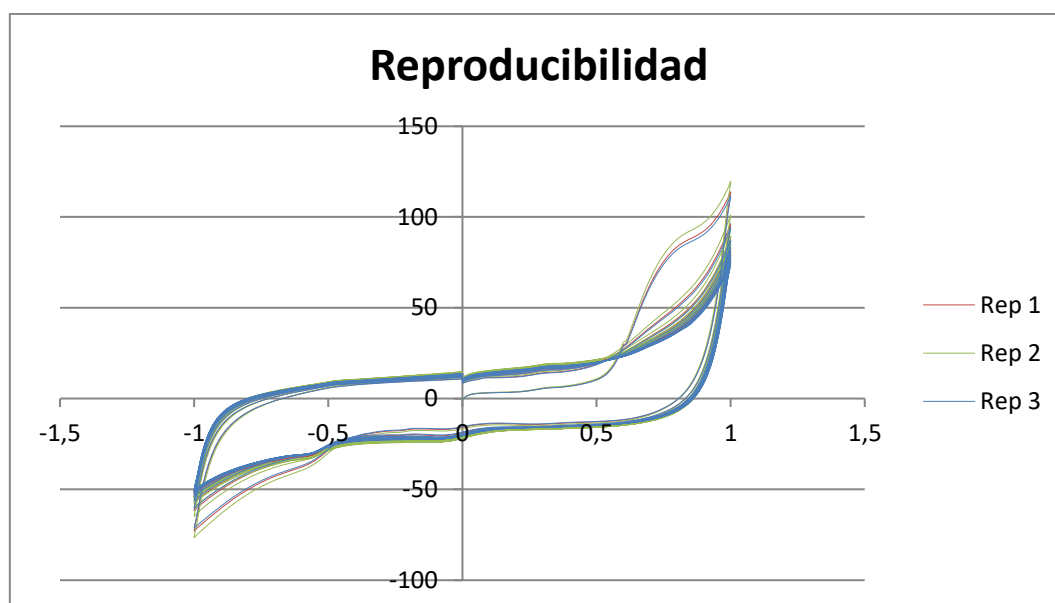


Figura 60. Reproducibilidad obtenida mediante los sensores voltamétricos

Podemos ver como la reproducibilidad es aceptable entre las distintas medidas tomadas, aunque no tanto entre cada ciclo. Esto es debido a que encontramos una degradación de los sensores entre cada uno de ellos sin llegar a la estabilización entre ciclos, pero como entre muestras, y comparando siempre el mismo ciclo, vemos que sí que tenemos una similitud entre ellas. Las diferencias más importantes son para el primer ciclo que será desechado en el estudio estadístico de los datos.

El problema de la estabilización de los ciclos se puede solventar mediante la mejora de los electrodos mediante una activación, que ha sido desarrollado en este trabajo. El problema de dicha activación es que requería una cantidad de tiempo muy alta teniendo en cuenta que el objetivo de este proyecto que consistía principalmente en medir una gran cantidad de tipos de leches y finalmente se descartó la activación de los sensores por ese motivo de tiempo y se solventó el problema eliminando el primer ciclo, siempre claramente diferente del resto. No obstante, se tratará más a fondo este tema en un apartado posterior dirigido a mejoras que se pueden realizar a estos sensores con perspectiva de futuro.



En vistas a simplificar la lectura entre muestras para poder hacer las comparaciones y sacar una conclusión, a partir de ahora se pasarán a mostrar los datos representados por un solo ciclo representativo del resto.

#### 4.2.2. Parámetros de las muestras

Antes de empezar a medir, se realizaron varias pruebas para determinar bajo qué condiciones sería más adecuado realizar las muestras de leche.

Uno de los factores a elegir era la disolución de la leche en agua. Se hicieron pruebas con muestras de leche sin diluir en agua y diluidas al 50% en agua mili-Q.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 61 y Figura 62.

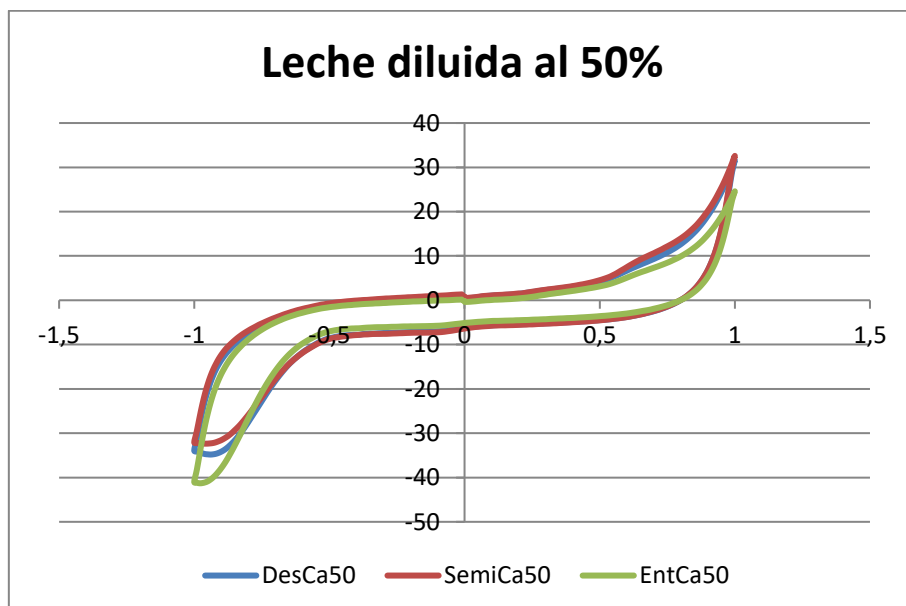


Figura 61. Voltametría cíclica con leche diluida en agua al 50%

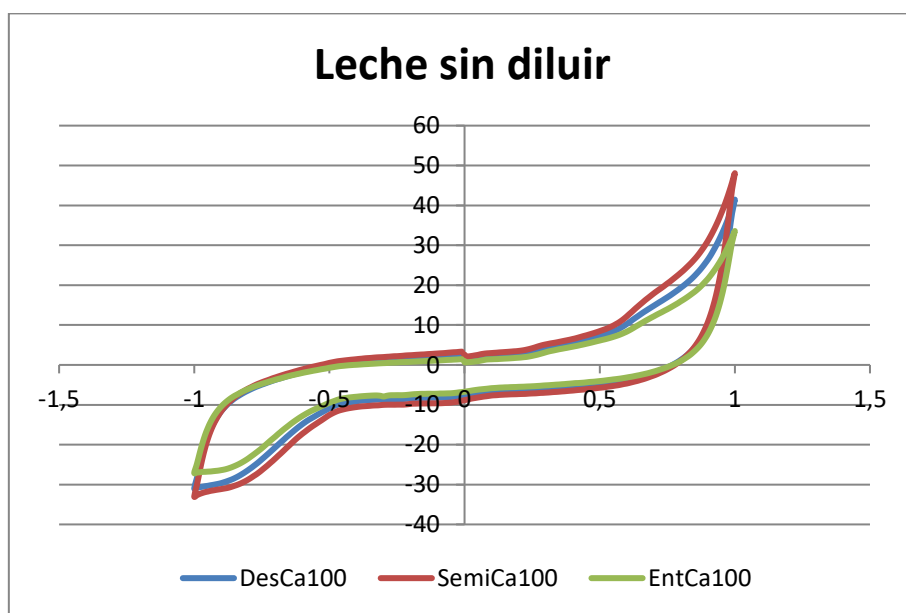


Figura 62. Voltametría cíclica con leche sin diluir

Ambas pruebas se han realizado con muestras de leche con calcio y electrodo 110 (carbono vítreo). En ambas gráficas se muestra la comparación de tres muestras de leche de la misma clase en su versión desnatada, semidesnatada y entera.

Se puede apreciar como las diferencias entre los tres tipos de leches son más apreciables en las pruebas con leche sin diluir, apreciándose mejor la diferenciación entre ellas tanto en la zona de oxidación como en la zona de reducción. Este experimento se realizó con otros tipos de leche y electrodos con idénticos resultados. Esto, unido al factor de la grasa, el cual no es tan importante en estos electrodos debido a que son de un solo uso y no requieren de una limpieza entre medidas, situación en la que la grasa dificulta aún más la correcta limpieza para obtener datos correctos, nos hizo decantarnos por no diluir la leche en agua. Por este motivo, a partir de ahora todos los datos mostrados serán con leche sin diluir.

#### 4.2.3. Comparativa entre leches de la misma clase

Comparamos las medidas en voltametría cíclica entre leches de la misma clase para ver las diferencias que obtenemos en cada uno de las distintas clases de leche. Podemos ver estas diferencias entre ellas en las Figuras 63-71.

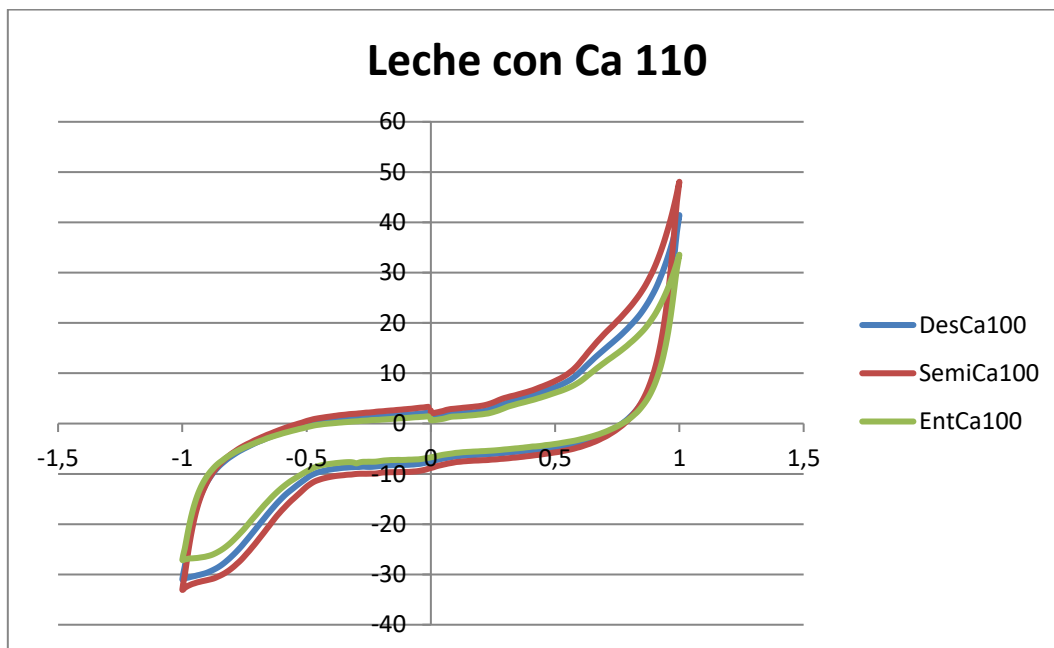


Figura 63. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo 110

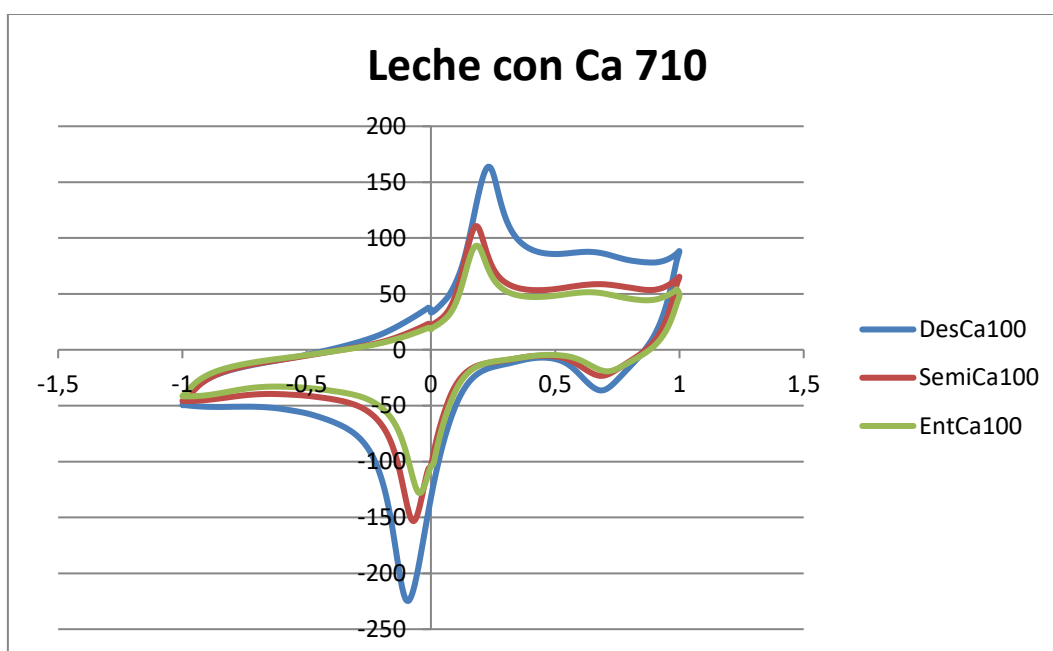


Figura 64. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo 710

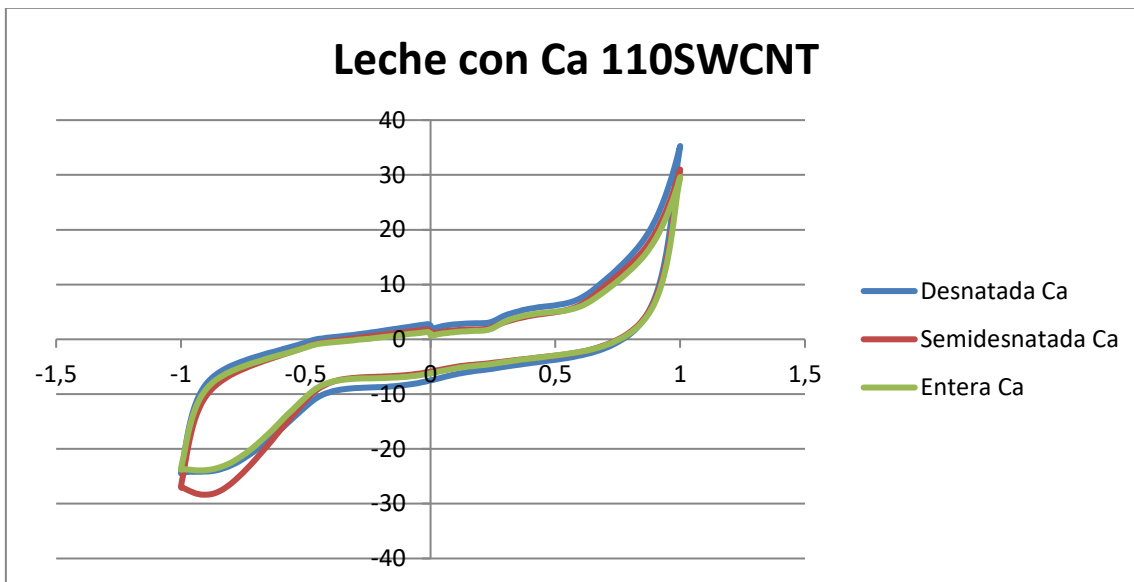


Figura 65. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo 110SWCNT

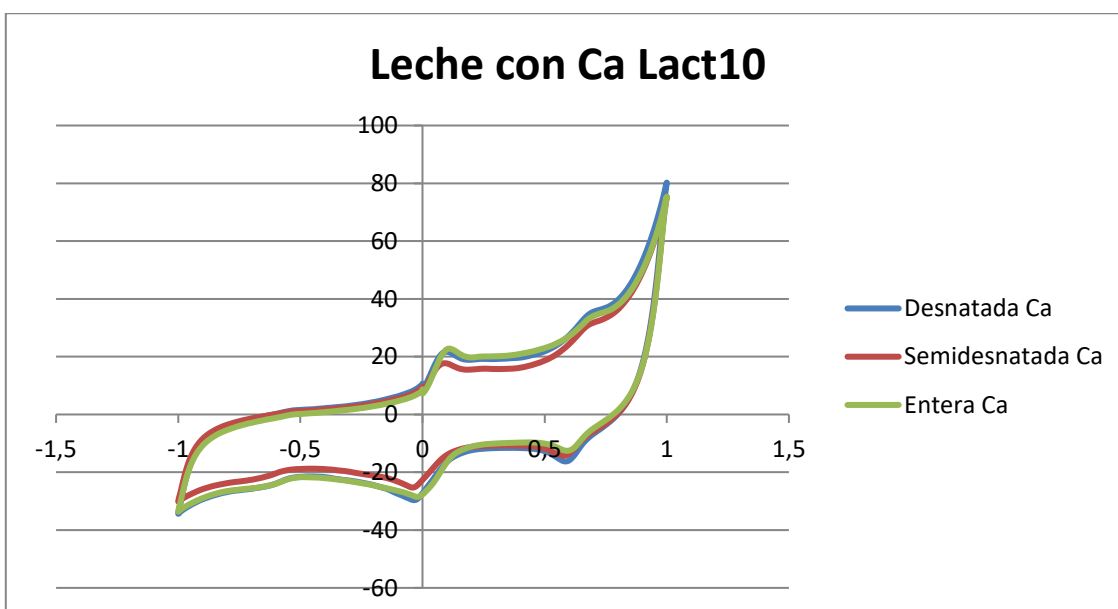


Figura 66. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo Lact10

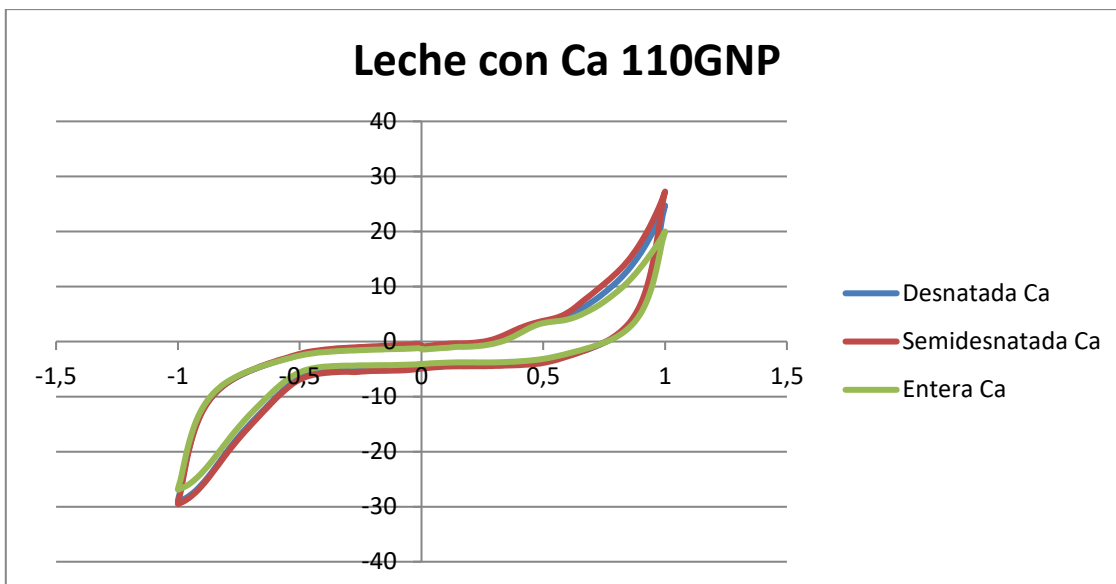


Figura 67. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo 110GNP

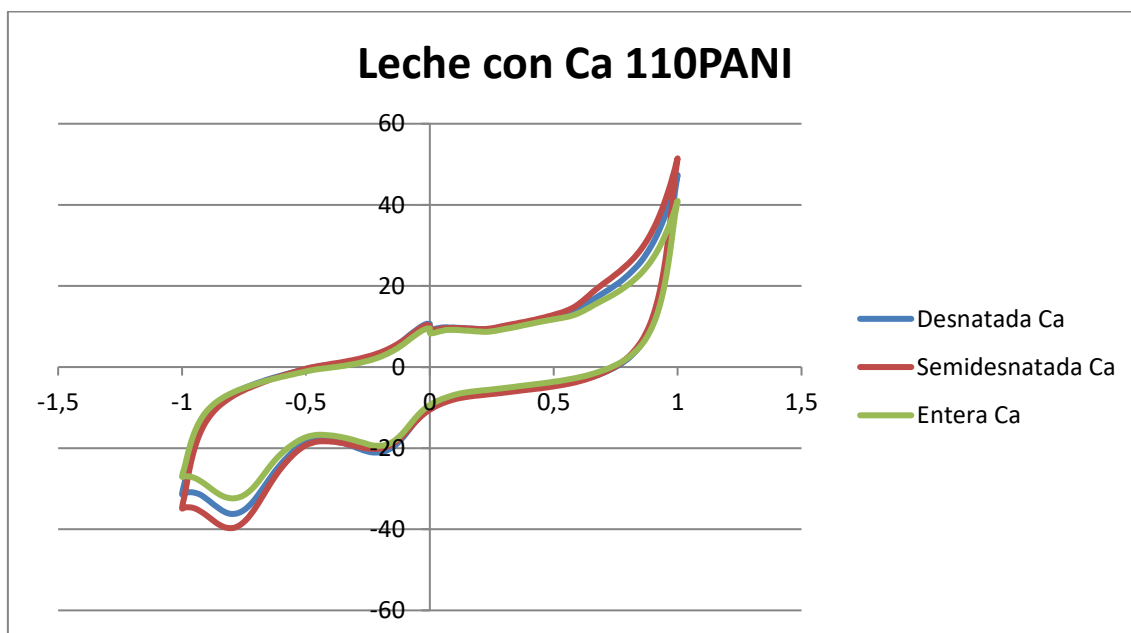


Figura 68. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo 110PANI

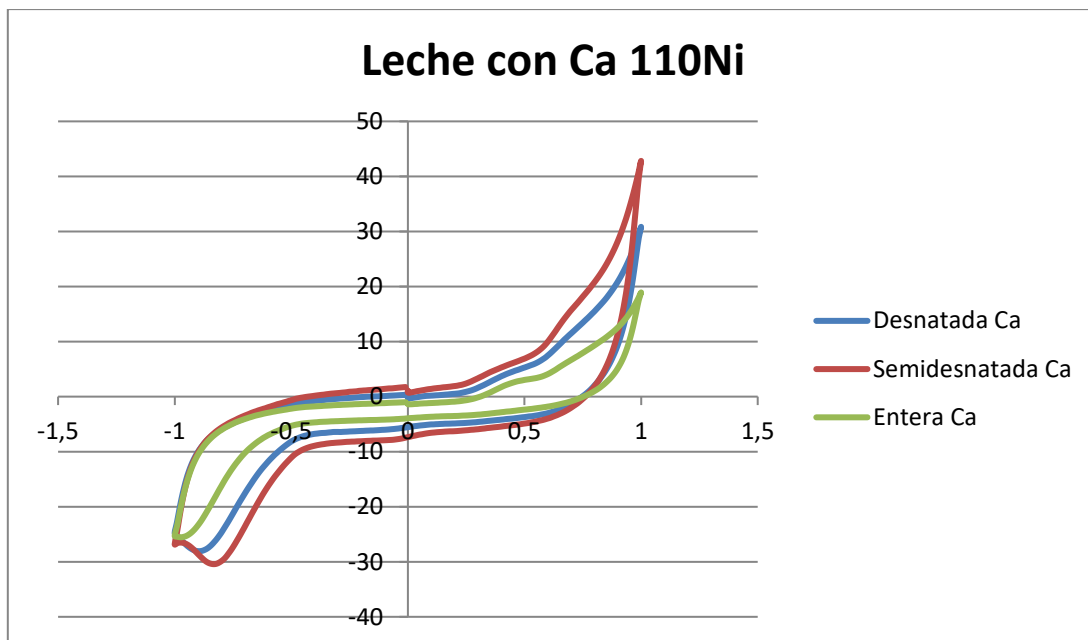


Figura 69. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo 110Ni

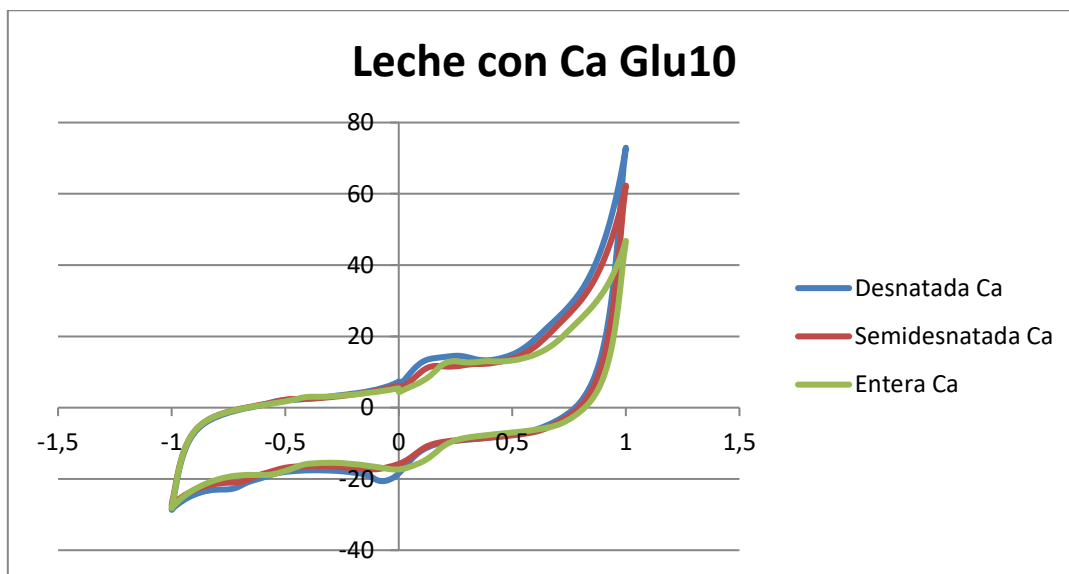


Figura 70. Voltametría cíclica con leche enriquecida con Ca y electrodo Glu10

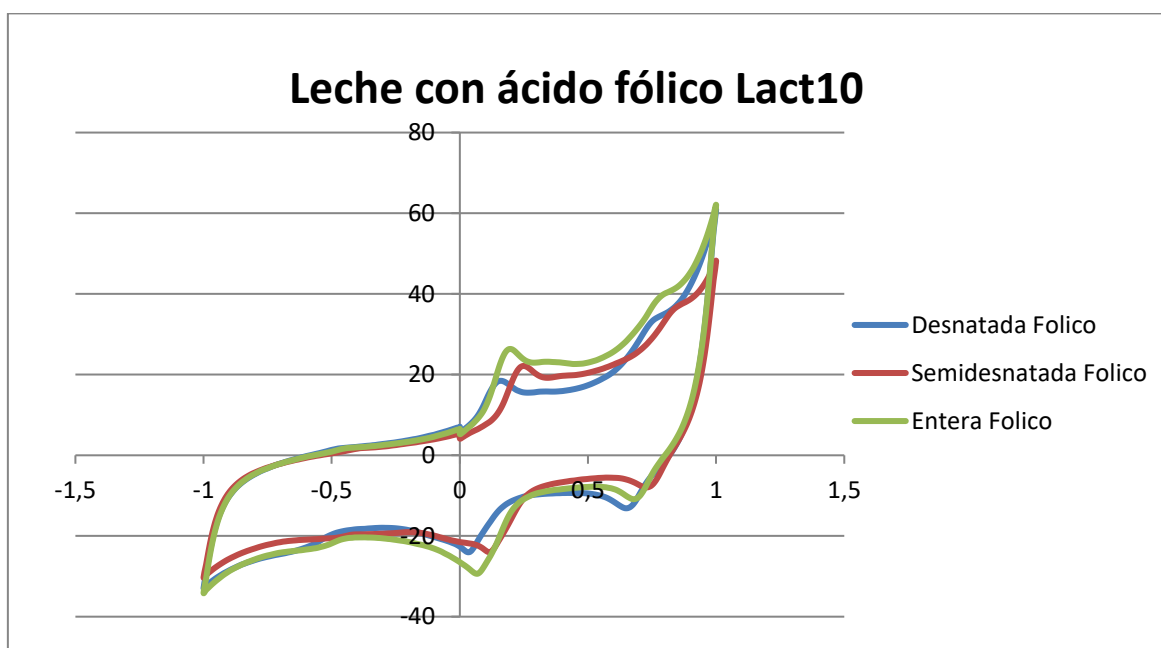


Figura 71. Voltametría cíclica con leche con ácido fólico y electrodo Lact10

En primer lugar, observamos cómo las señales obtenidas por los diferentes sensores voltamétricos son claramente diferentes unas de otras lo que nos garantiza una buena selectividad cruzada en la red construida a partir de estos sensores. En todos los casos se observan diferencias apreciables entre las muestras en función de su contenido graso si bien es cierto que las diferencias en cuanto a posición e intensidad de los picos entre las tres variedades son más apreciables en algunos sensores e igualmente son función del tipo de variedad de leche analizada, aunque la morfología general del voltamograma no varía y es característica del tipo de electrodo y por tanto de la sustancia utilizada en su modificación.

#### 4.2.4. Comparativa entre leches del mismo tipo

Comparamos las medidas en voltametría cíclica entre leches del mismo tipo para ver las diferencias obtenidas en cada una de las diferentes variedades de leche y su influencia en la morfología del registro intensidad-potencial. Podemos ver como se aprecian diferencias pequeñas entre ellas en las Figuras 72-81

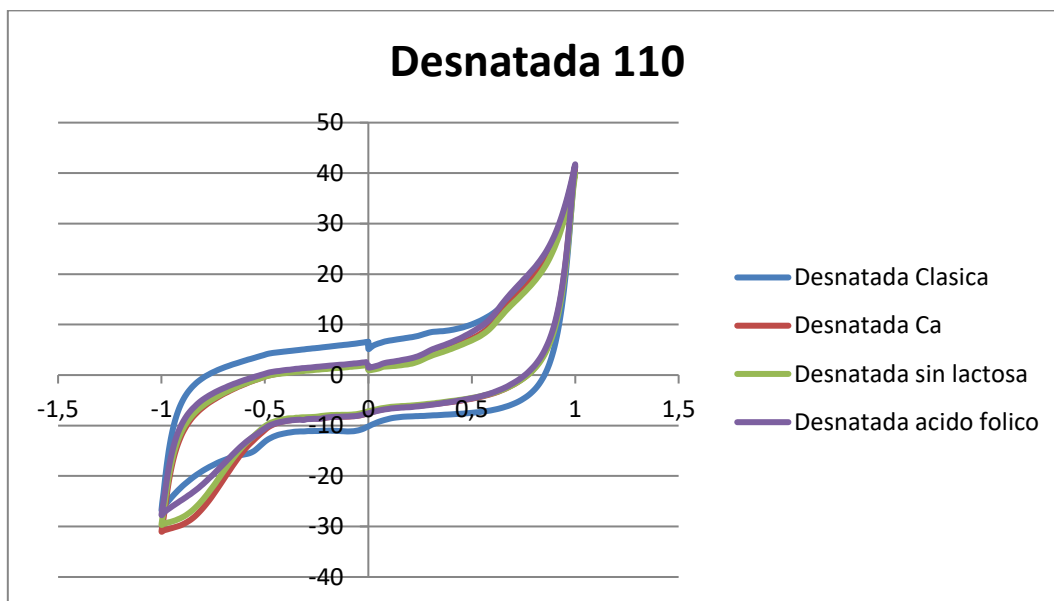


Figura 72. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche desnatada y electrodo 110

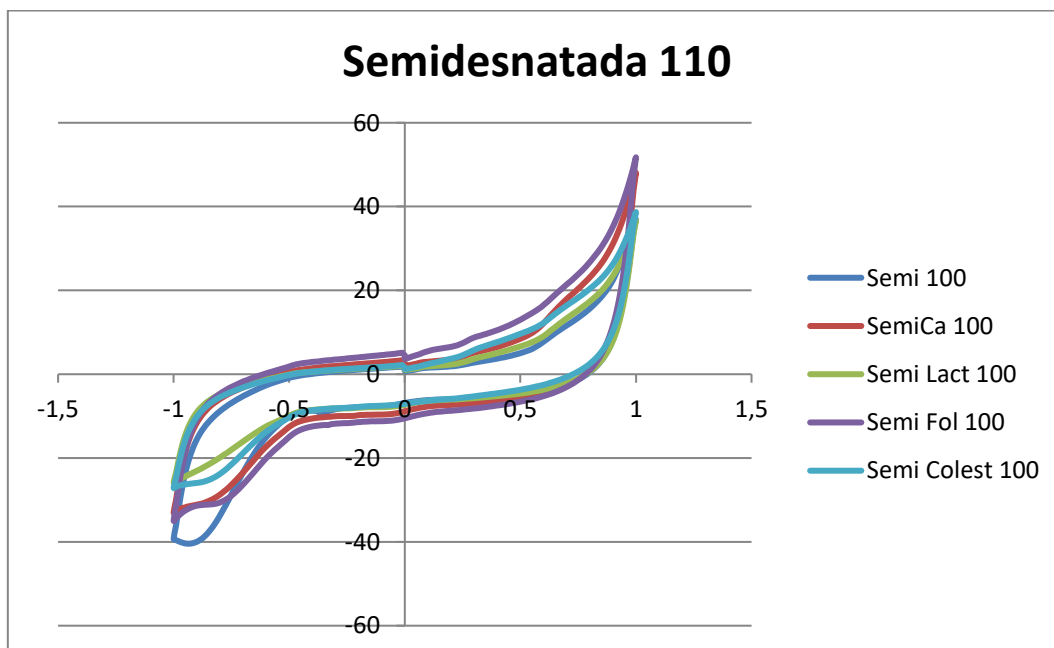


Figura 73. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche semidesnatada y electrodo 110



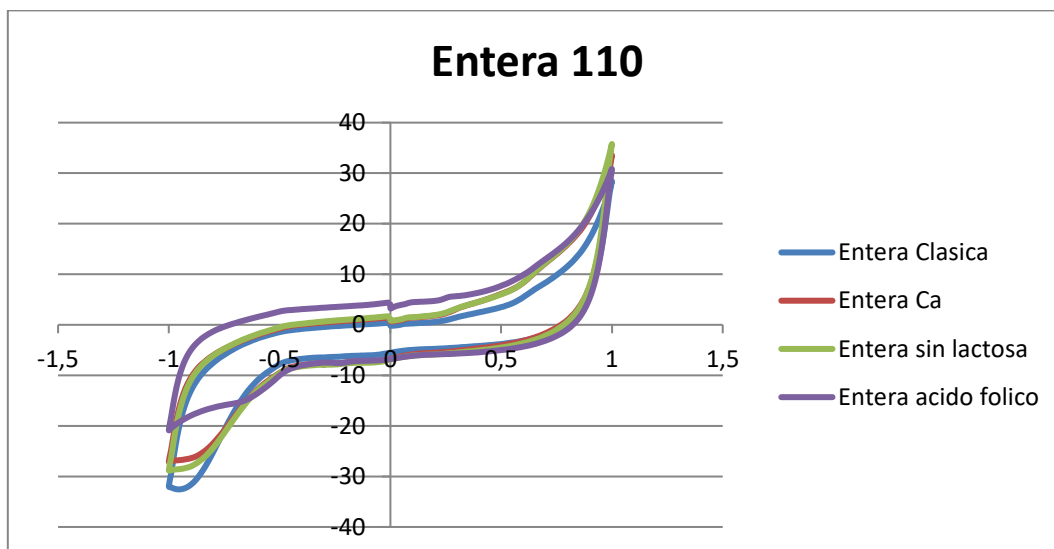


Figura 74. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche entera y electrodo 110

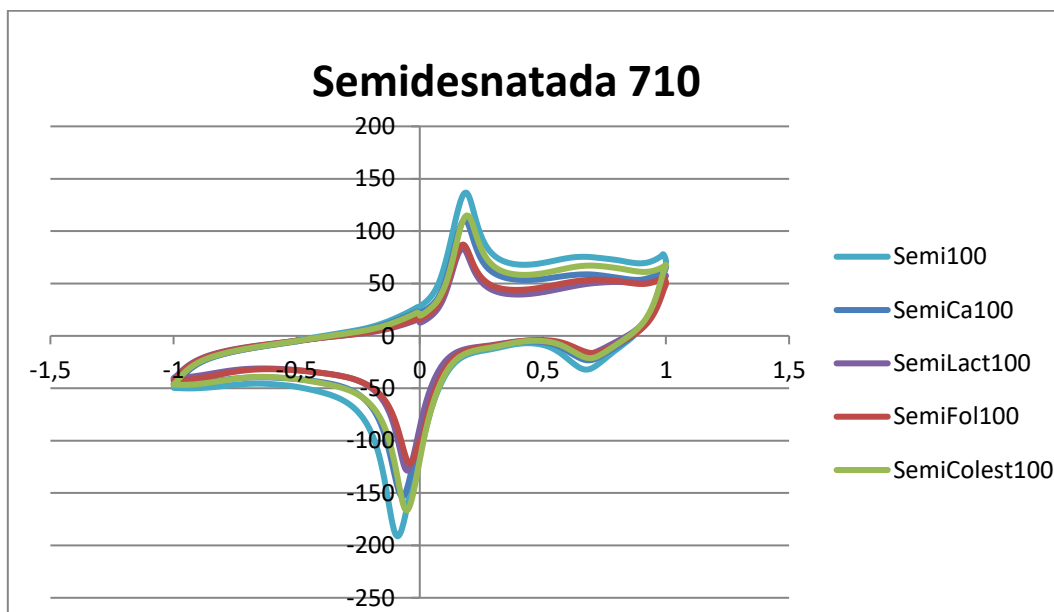


Figura 75. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche semidesnatada y electrodo 710

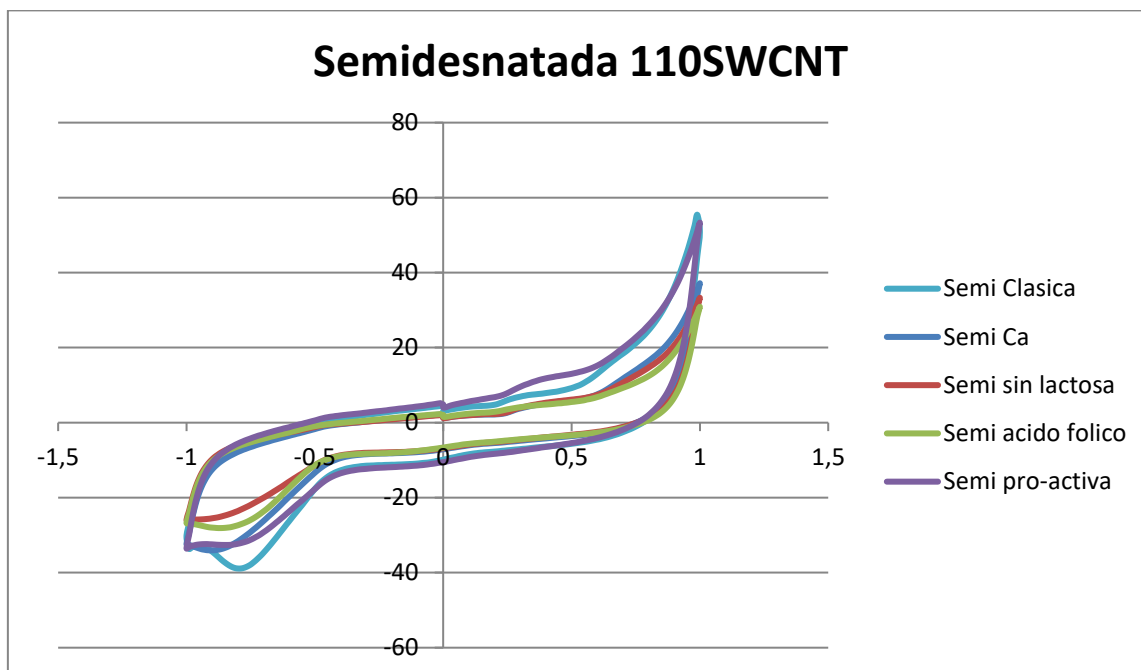


Figura 76. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche semidesnatada y electrodo 110SWCNT

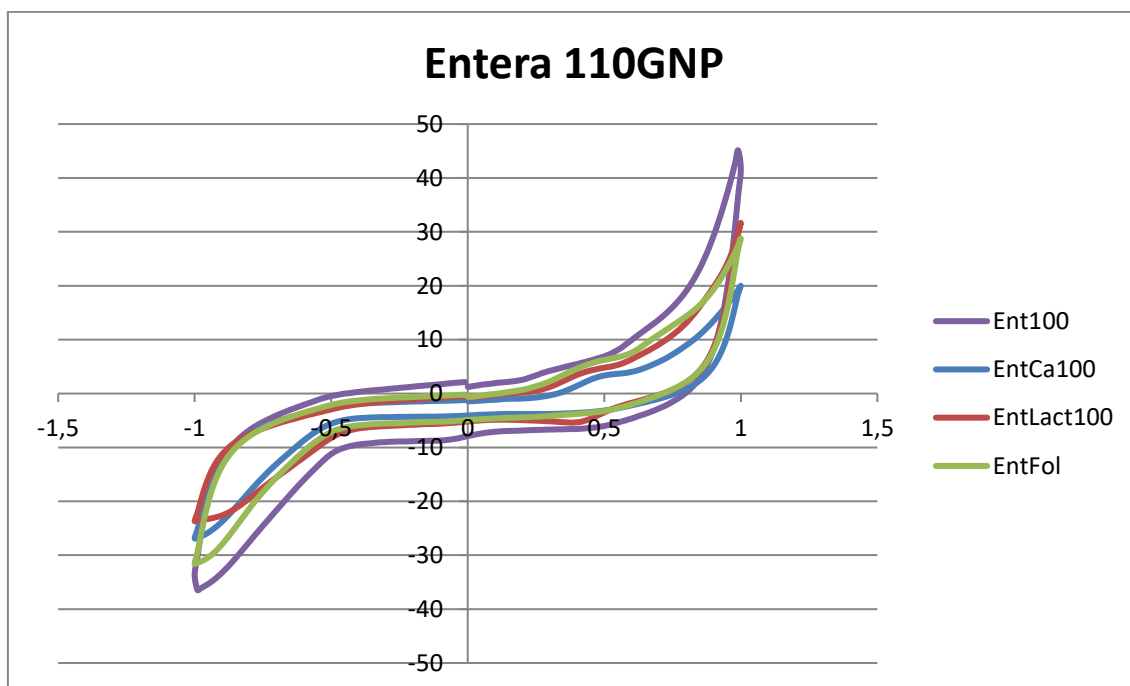


Figura 77. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche entera y electrodo 110GNP

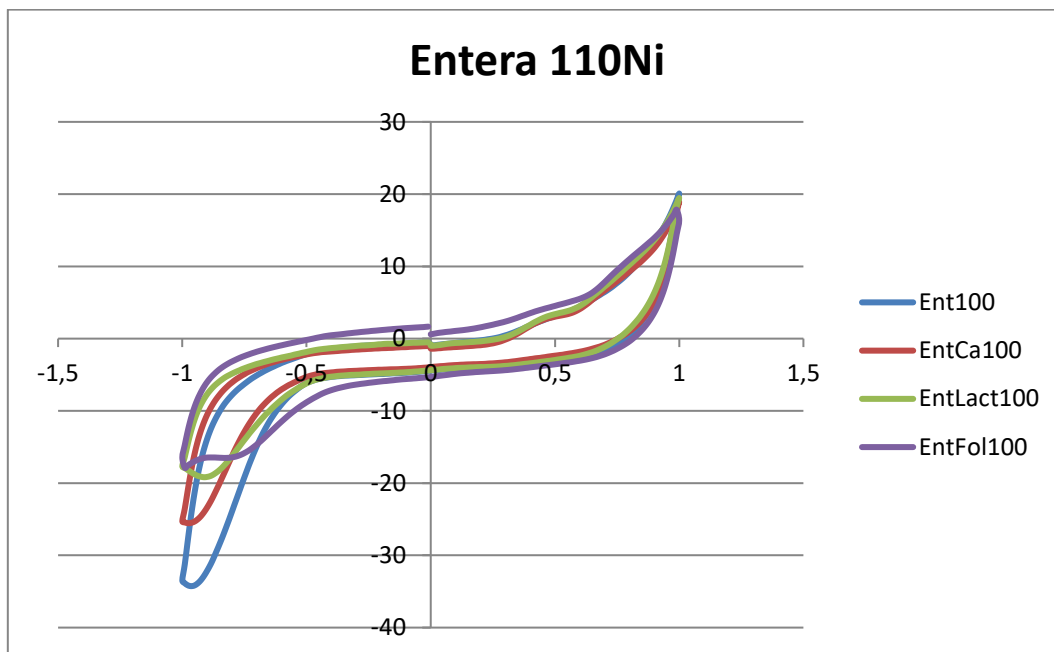


Figura 78. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche entera y electrodo 110Ni

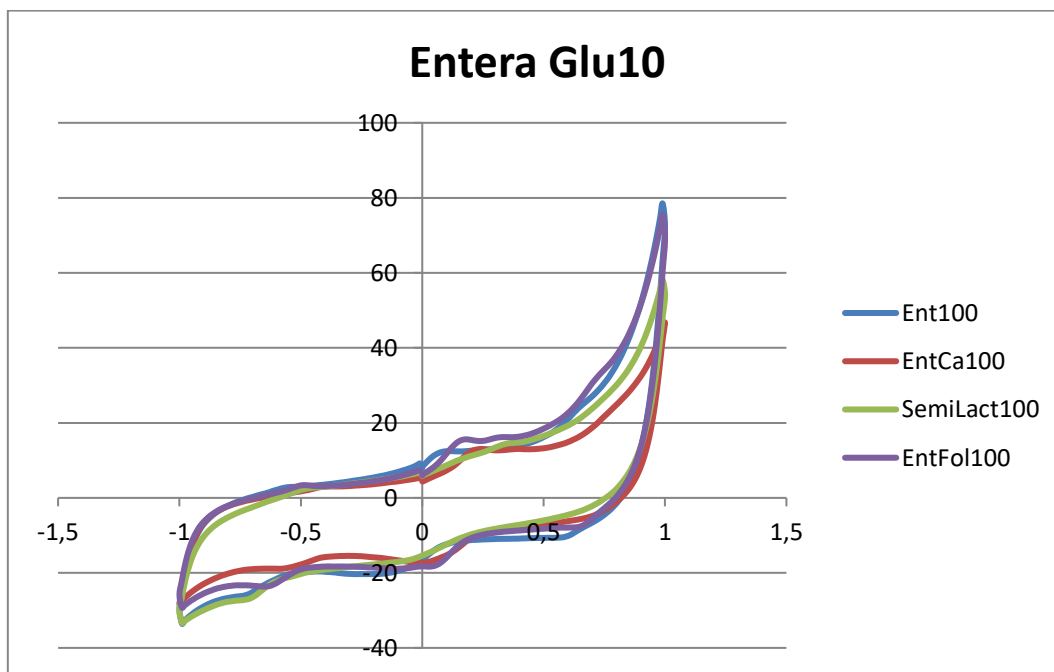


Figura 79. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche entera y electrodo Glu10

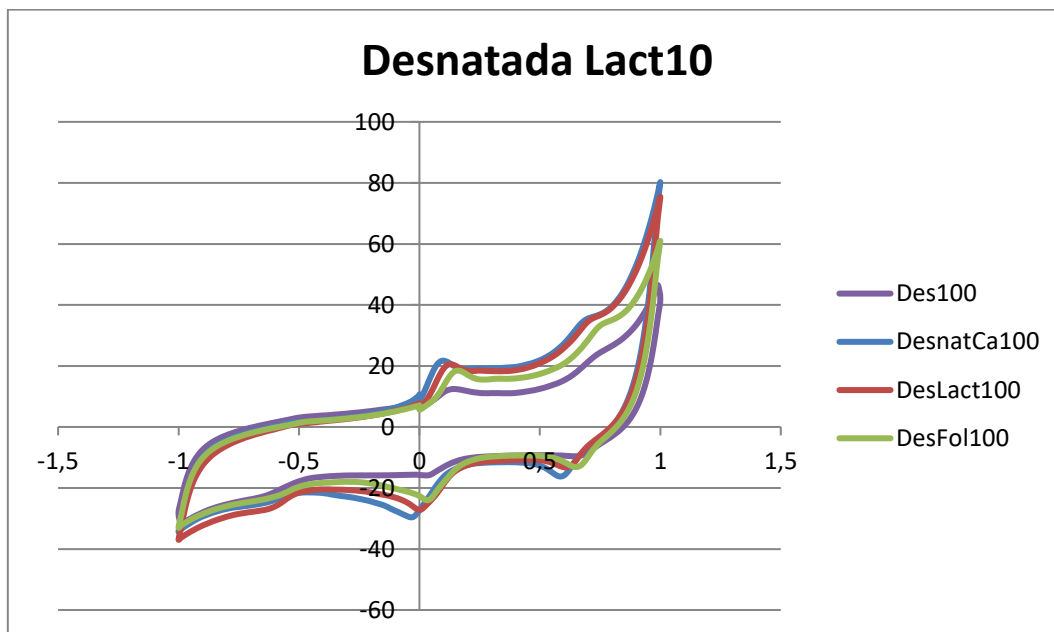


Figura 80. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche desnatada y electrodo Lact10

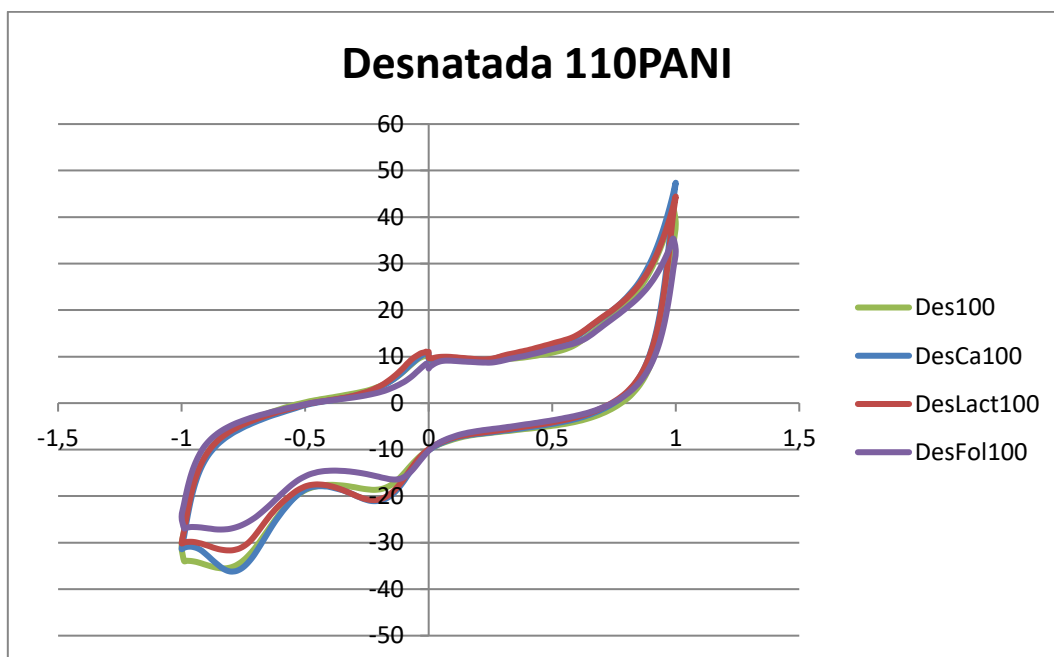


Figura 81. Voltametría cíclica con todos los tipos de leche desnatada y electrodo 110PANI

En los voltamogramas anteriores observamos que cada sensor tiene una morfología que le es característica y que por tanto es diferente del resto, esto cómo hemos comentado es indicativo de que la red voltamétrica diseñada muestra alta selectividad cruzada. Para los diferentes tipos de leche con y sin aditivos observamos que las posiciones de los picos de oxidación y reducción, así como las intensidades varían en función del tipo de leche. Las diferencias son más notables que las observadas en función del contenido graso. El sensor básico de carbono sin modificar es el que cualitativamente da lugar a menores diferencias entre los cuatro tipos de leche para los tres contenidos grasos entera, semidesnatada y desnatada (figuras 72, 73 y 74) siendo los sensores modificados con y sin enzimas los que a simple vista dan lugar a variaciones más importantes en función del tipo de leche analizada. Posteriormente mediante el análisis estadístico estas diferencias serán más visibles.

Finalmente analizamos los cambios observados en los voltamogramas en función del envejecimiento de las leches.

#### 4.2.5. Envejecimiento

Otro de los aspectos que queremos analizar es si la lengua voltamétrica diseñada es capaz de detectar el envejecimiento de las leches y si las alteraciones que se producen en el producto con el paso del tiempo se pueden medir con nuestros sensores. Hemos comparado los datos obtenidos con una leche recién abierta (0 días) con los datos de esa misma leche pasados 7 días. Los resultados de algunas leches (leches enriquecidas con Ca) se muestran en la Figuras 82-84

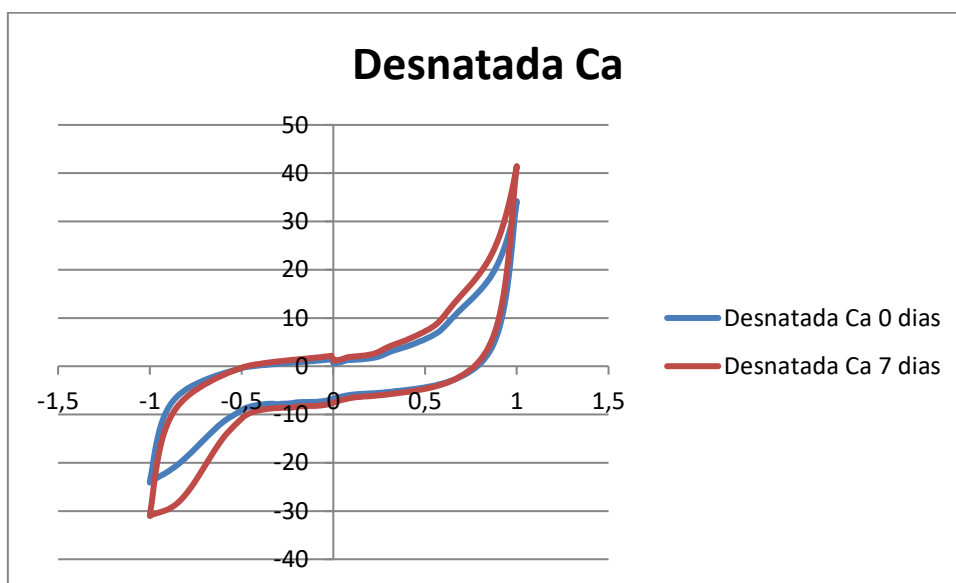


Figura 82. Envejecimiento de leche desnatada enriquecida con Ca tras 7 días

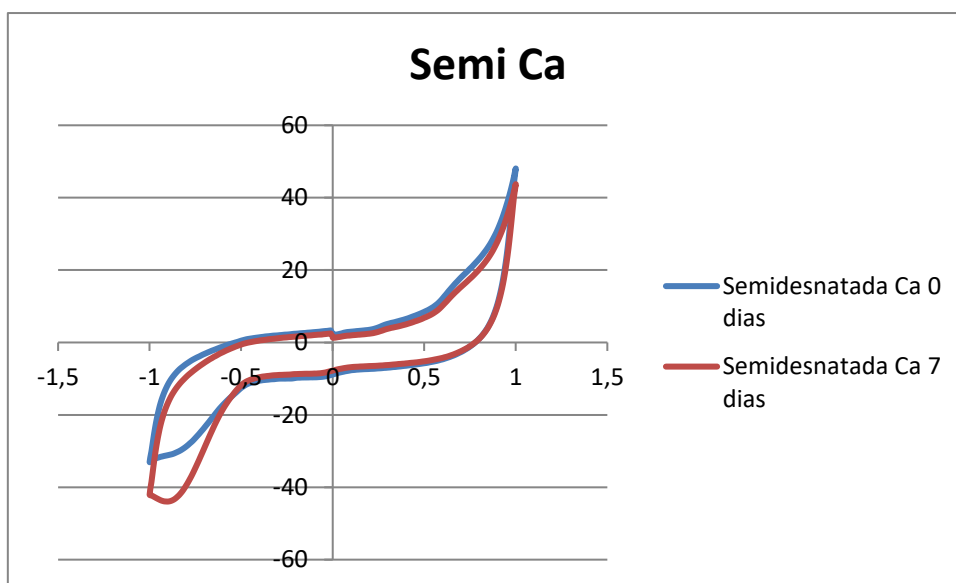


Figura 83. Envejecimiento de leche semidesnatada enriquecida con Ca tras 7 días

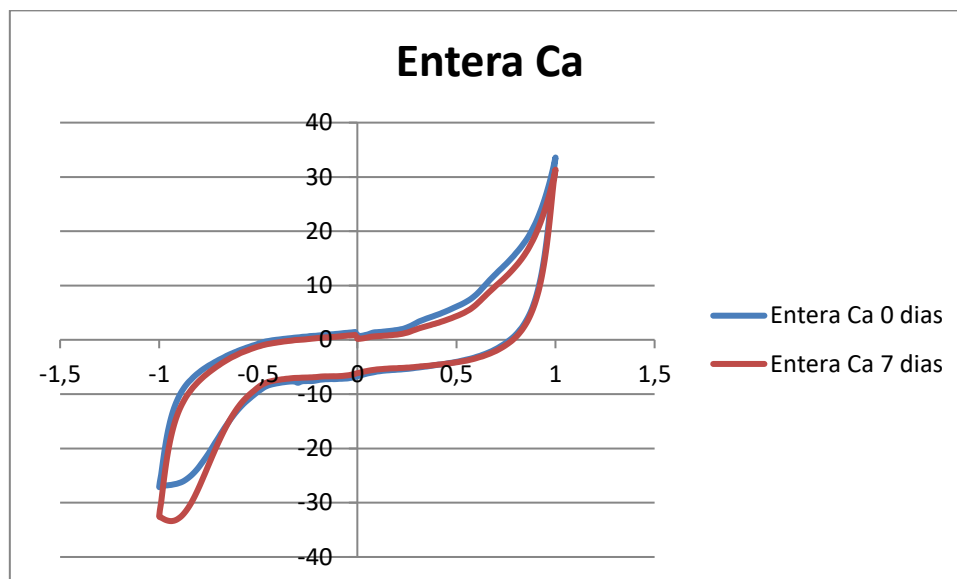


Figura 84. Envejecimiento de leche entera enriquecida con Ca tras 7 días

Vemos como para el caso de la leche enriquecida con Ca en su versión desnatada, semidesnatada y entera, se puede apreciar que la morfología del voltamograma no cambia, pero si se observa una variación entre sus medidas, lo cual nos indica que podemos medirlo con nuestros sensores. Esta variación es más evidente en el pico de reducción a potenciales más negativos lo cual tiene lógica ya que tras esos 7 días la leche se degrada variando sus propiedades, especialmente ocurre la acidificación del producto que es lo que se mide a potenciales tan bajos.

## 4.2.6. Tratamiento estadístico de datos

*Análisis de componentes principales*

Al igual que en los sensores potenciométricos para el diseño de la lengua voltamétrica se han realizado análisis estadístico a los datos registrados en el voltamograma para en primer lugar observar la capacidad de discriminación de la lengua mediante un método no supervisado y por ello hemos empezado haciendo PCAs a los distintos datos obtenidos. Posteriormente se ha utilizado un estudio de correlaciones entre los datos de la lengua electrónica y los datos químicos para lo que se ha utilizado el análisis mediante PLS. Tanto para los análisis de PCA como para las PLS del siguiente apartado se han utilizado los datos de todos los ciclos menos de los primeros por motivos de estabilización, por lo que nos hemos quedado con los que considerábamos que nos valían para realizar las comparaciones y que nos proporcionaban una señal más estable y más reproducible. De este modo eliminamos la simplificación de un solo ciclo propuesta en los apartados anteriores ya que de esta forma obtenemos unos datos más fidedignos a la vez que conseguimos tener un número suficiente de datos para que estos análisis puedan tener de verdad relevancia.

Para la elaboración de los datos de nuestra lengua de sensores voltamétricos hemos seleccionado los 8 tipos distintos de electrodos (110, 710, 110NI, 110PANI, 110GNP, 110SWCNT, GLU10 y LACT10).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 85.

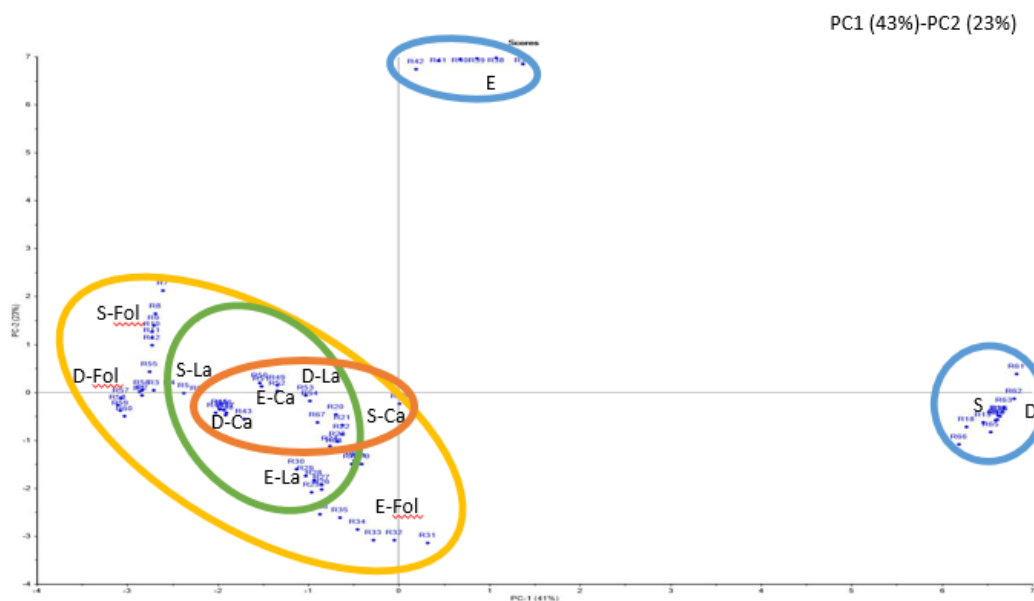


Figura 85. PCA (PC1 y PC2) lengua electrónica con 8 sensores (110, 710, 110NI, 110PANI, 110GNP, 110SWCNT, GLU10 y LACT10)



En la imagen anterior se muestra el score 2D con la combinación de los 8 sensores. Tenemos una primera componente (PC1) que contiene el 43% de la variabilidad y una segunda (PC2) que contiene el 23%. Se puede apreciar que mediante estas dos componentes no se distinguen diferencias entre las leches, salvo las de leche clásica, las cuales salen apartadas del resto. Esto, unido a la poca variabilidad que representa la combinación de la PC1 y PC2 nos indica que con esta PCA no es lo suficientemente buena como para poder distinguir nuestras muestras con lo que se hace necesario utilizar una tercera componente. Para asegurarnos, representamos la combinación de la primera y tercera componente (PC1 y PC3). Figura 86.

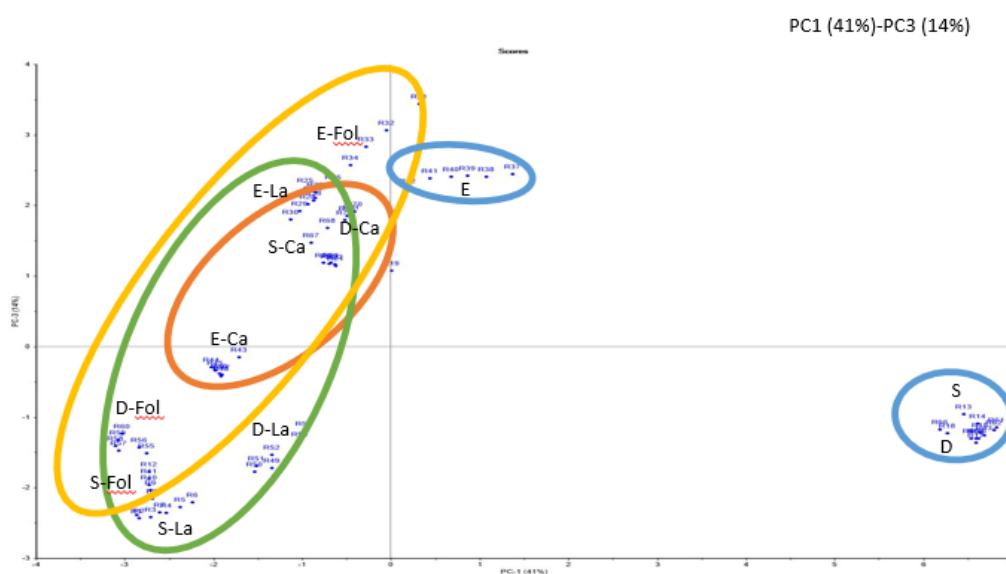


Figura 86. PCA (PC1 y PC3) lengua electrónica con 8 sensores (110, 710, 110NI, 110PANI, 110GNP, 110SWCNT, GLU10 y LACT10)

Vemos como la tercera componente representa una variabilidad del 14%, insuficiente en nuestro caso y que como se puede observar supone una cierta mejora no se aprecian persisten diferencias en la discriminación entre nuestras leches.

Por ello, decidimos realizar una selección de sensores que nos permitirán optimizar el modelo para ello fue necesario analizar estadísticamente uno a uno los datos de nuestros sensores para ver cuál era el problema y detectamos que varios de ellos, en concreto el 110, 110NI y GLU10, arrojaban unos datos con muy poca variabilidad entre leches, por lo que decidimos eliminarlos y volver a hacer el análisis, pero esta vez con una lengua electrónica compuesta por 5 sensores (710, 110PANI, 110GNP, 110SWCNT y LACT10).

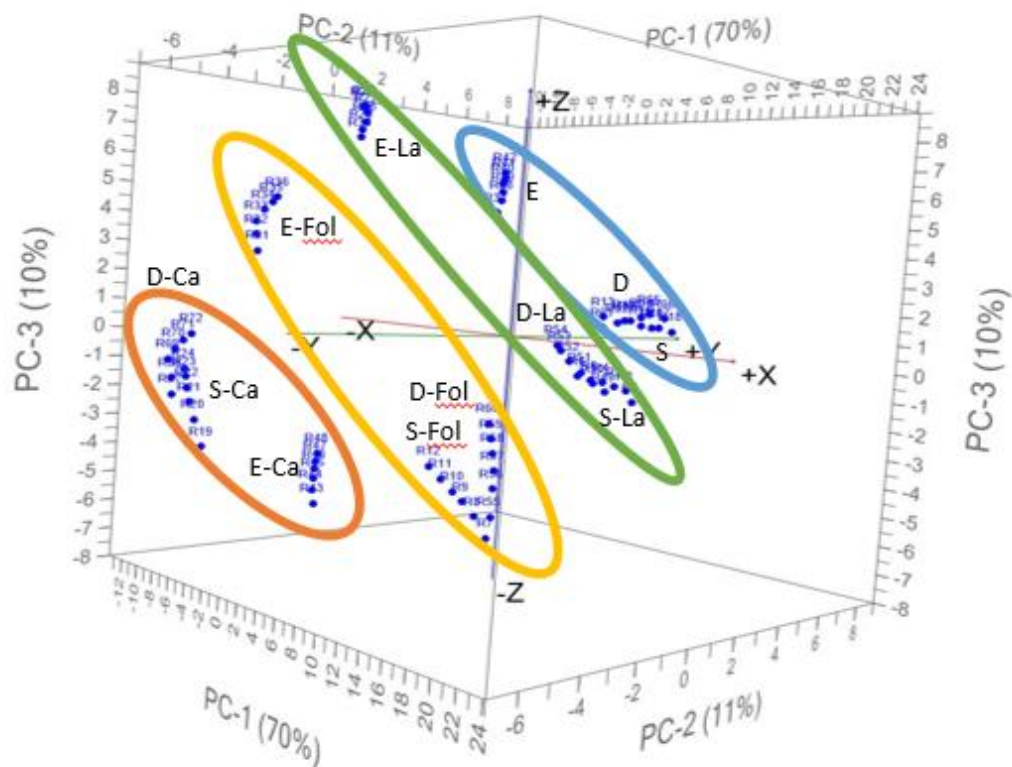


Figura 87. PCA (3D) lengua electrónica con 5 sensores (710, 110PANI, 110GNP, 110SWCNT y LACT10)

En la Figura 87 se muestra el score 3D que hemos obtenido. Tenemos una PC1 que contiene una variabilidad del 70%, una PC2 que contiene el 11% y una PC3 que contiene un 10%, por lo que en este score tenemos el 91% de información. Esto significa que la PCA nos está mostrando un 91% de la información original del muestreo.

Asimismo, vemos como ahora si podemos discriminar entre tipos de leche, arrojándonos unos resultados mucho mejores que los obtenidos con los 8 sensores. Hemos agrupado los distintos tipos de leches como se ve en la figura y con ello podemos determinar que sí que hemos conseguido obtener una discriminación entre los distintos tipos. También podemos ver como dentro de un mismo tipo las leches desnatadas y semidesnatadas tienden a agruparse, dejando las muestras de leche entera un poco separadas, los resultados indican por tanto que la lengua electrónica formada por 5 sensores (710, 110PANI, 110GNP, 110SWCNT y LACT10) es la que nos ofrece la mayor capacidad de discriminación.

### Regresión por mínimos cuadrados parciales

Ahora pasamos a hacer el análisis estadístico teniendo en cuenta los datos químicos de nuestras leches proporcionados por leche Pascual en uno de sus análisis con objeto de analizar la calidad de nuestro modelo.

A continuación, se muestran las PLS para algunos de los datos químicos más relevantes como son: acidez (Figura 88), densidad (Figura 89), sedimentos (Figura 90), % proteínas (Figura 91) y % materia grasa (Figura 92).

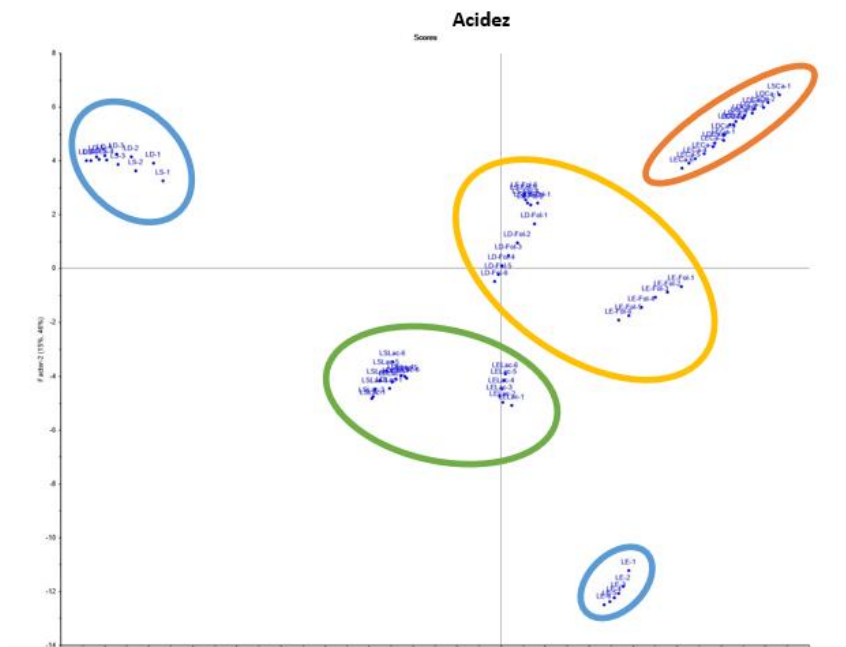


Figura 88. PLS 2D de la acidez

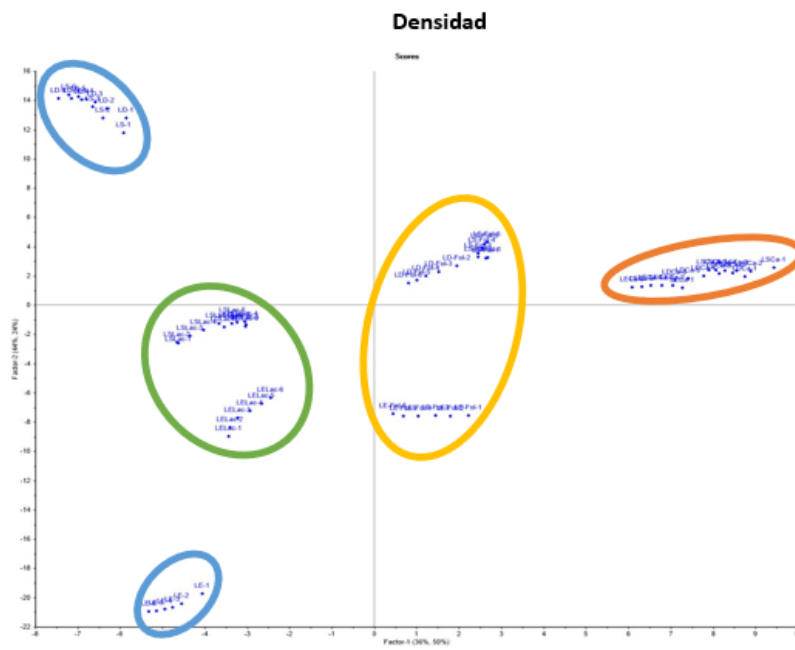


Figura 89. PLS 2D de la densidad

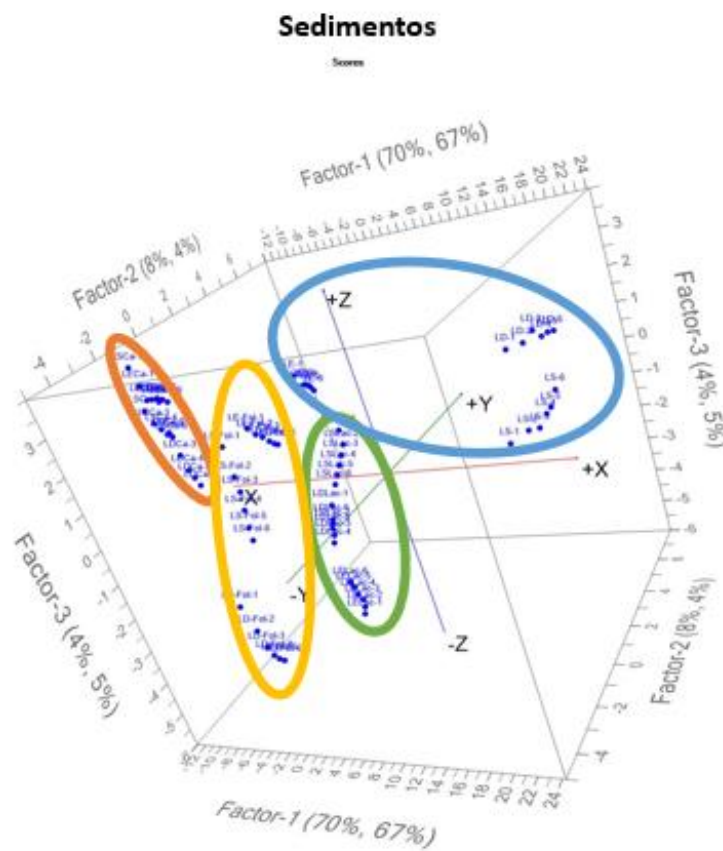


Figura 90. PLS 3D de los sedimentos

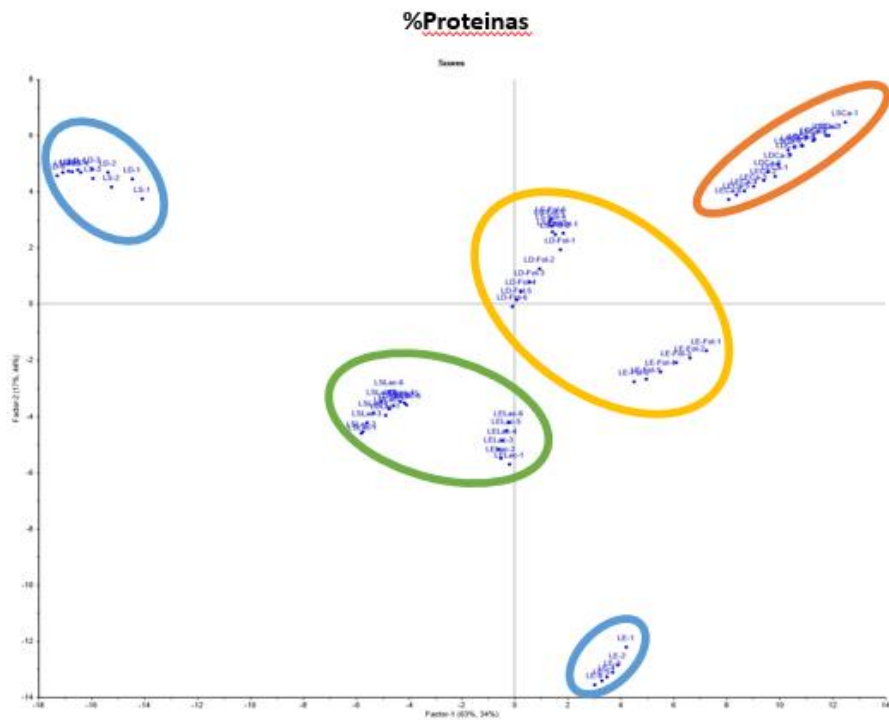


Figura 91. PLS 2D de las proteínas

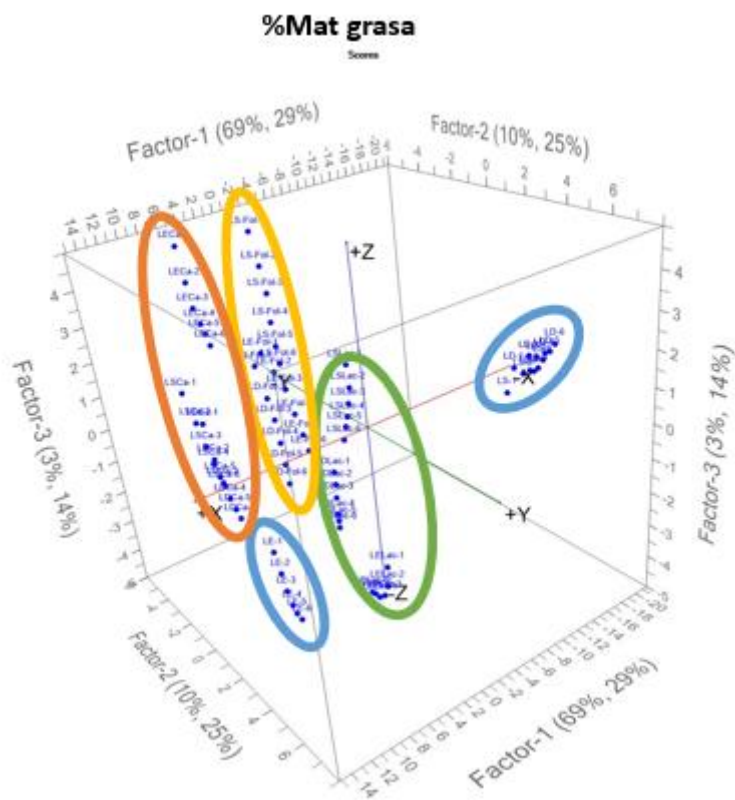


Figura 92. PLS 3D de la materia grasa

Se observa claramente que para todos los parámetros químicos analizados se consigue discriminar claramente las diferentes leches en función de los aditivos y del contenido graso.

En la tabla 8 se muestran los distintos datos obtenidos de las PLS

Parámetros	$R^2_c$	RMSE <sub>c</sub>	$R^2_p$	RMSE <sub>p</sub>	Variables latentes
Acidez	0,9332	0,3830	0,9177	0,4312	4
Densidad	0,8997	0,8284	0,8759	0,9347	4
Sedimentos	0,8060	0,0413	0,7510	0,0474	4
%Proteínas	0,9084	0,0718	0,8877	0,0807	4
%Mat grasa	0,7344	0,6625	0,6487	0,7726	4

Tabla 8. Resultados PLS con los sensores voltamétricos

Vemos como los ajustes son algo inferiores a los obtenidos en la lengua potenciométrica tanto en calibración como en validación. Tenemos 4 variables latentes en todas ellas, una R2 aceptable (un poco baja en el caso de la materia grasa) y una RMSE (raíz del error cuadrático medio) muy diverso en todas ellas. Cuanto menor sea este último dato, mejor ajuste tienen los datos obtenidos (0 indicaría un ajuste perfecto). Viendo los datos de la tabla podemos decir que hemos discriminado entre tipos de leches, sobre todo en cuanto a sedimentos y a proteínas a lo que resulta ser especialmente sensible la lengua potenciométrica.

## Envejecimiento

Ahora vamos a comentar un poco los análisis estadísticos obtenidos sobre el envejecimiento en los sensores voltamétricos. En este caso hemos hecho un análisis simple mediante una PCA para ver, en primer lugar, si encontramos una diferencia en las medidas tomadas 7 días después, con respecto a las tomadas inicialmente, y, en segundo lugar, si siguen un patrón común en todos los casos. Como vamos a trabajar con el doble de muestras que en el análisis anterior vamos a dividir el análisis en leches clásicas, enriquecidas con calcio, sin lactosa y con ácido fólico. Así podremos ver mejor los resultados para sacar las debidas conclusiones.

## Leche clásica

Empezaremos analizando las leches clásicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 93 y 94.

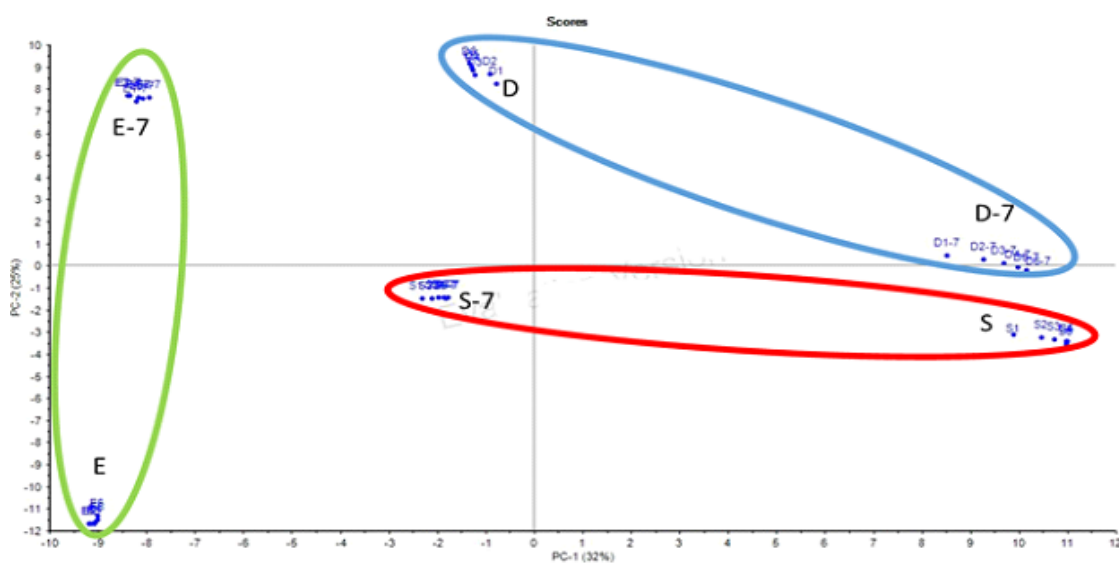


Figura 93. Resultados PCA leche clásica envejecida con los sensores voltamétricos

Se han acotado los resultados en color para facilitar su visualización. En la figura 93 hemos usado un score 2D ya que era el que mejor mostraba la diferencia entre las muestras. A simple vista vemos como las muestras de las leches envejecidas salen distintas a las de las mismas leches en su estado original, lo cual es lógico debido a que, al tenerlas un tiempo abiertas, el estado y las propiedades de estas varían. Por otra parte, si nos fijamos exclusivamente en si podemos discriminar todas las leches originales respecto a las envejecidas, vemos en el score 3D de la figura 94 como las leches envejecidas las encontramos en la parte superior, mientras que las originales

las encontramos en la parte inferior, aunque es cierto que no se acaban de agrupar perfectamente, debido sobre todo a la similitud entre la leche semidesnatada original y la desnatada envejecida.

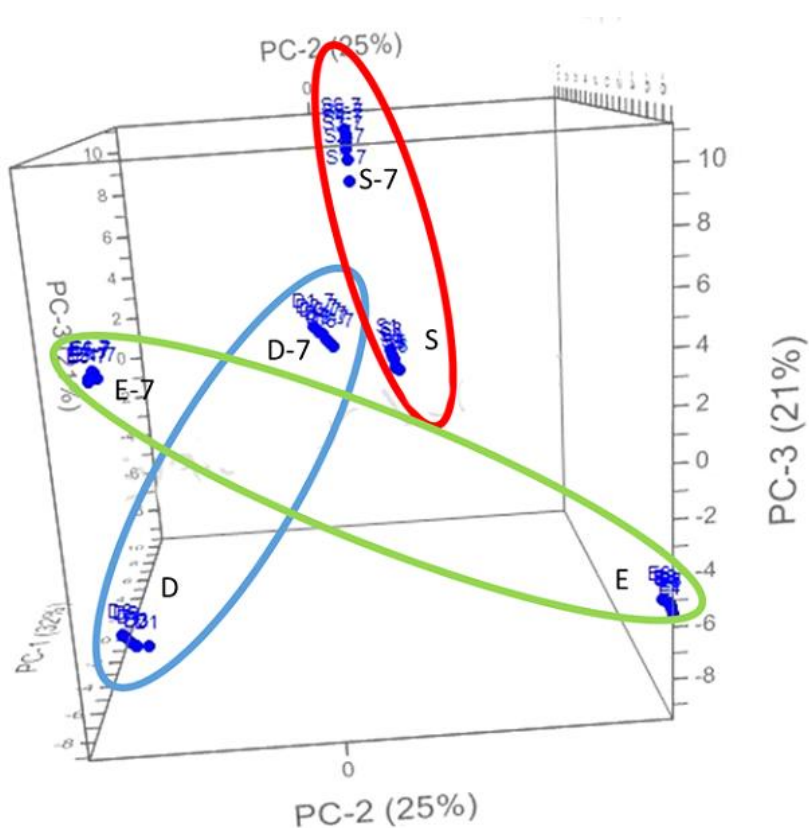


Figura 94. Resultados PCA (Score 3D) leche clásica envejecida con los sensores voltamétricos

Por lo tanto, podemos concluir que los sensores voltamétricos también discriminan cada leche envejecida con respecto a la original sin problemas y también lo hacen entre todas las envejecidas y las originales, con la duda de lo comentado en el párrafo anterior.



*Leche enriquecida con calcio*

Ahora vamos a analizar las leches enriquecidas con calcio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 95.

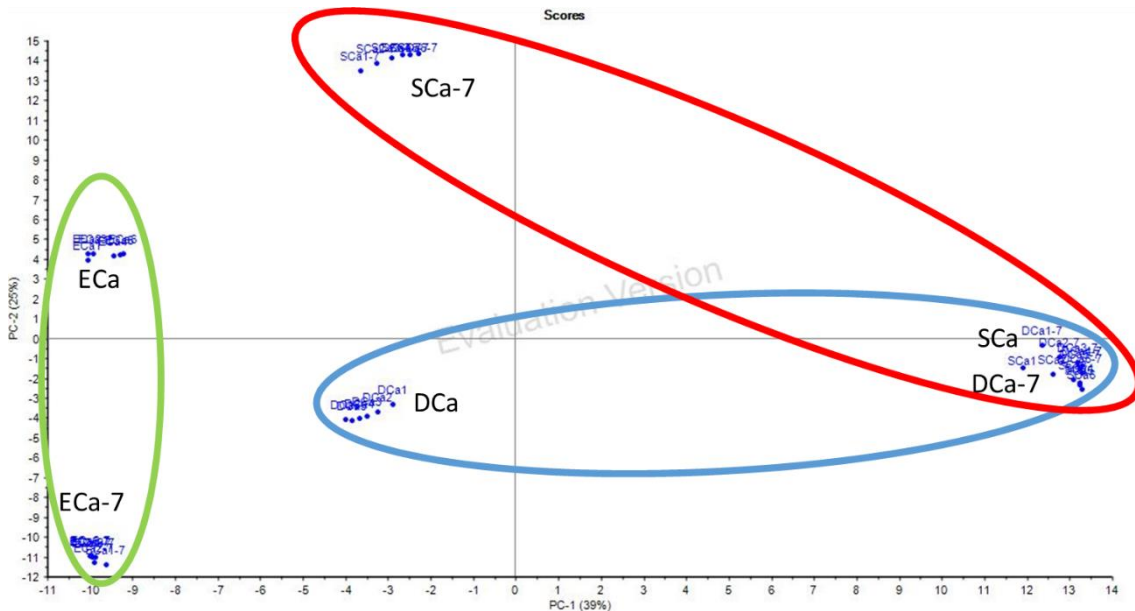


Figura 95. Resultados PCA leche con Ca envejecida con los sensores voltamétricos

En la figura 95 hemos usado un score 2D, que era el que mejor mostraba lo que queremos analizar. Podemos apreciar cómo, nuevamente, las muestras de las leches envejecidas salen distintas a las de las mismas leches en su estado original. En cuanto a si podemos discriminar todas las leches originales respecto a las envejecidas, vemos que en este caso la leche semidesnatada original y la desnatada envejecida se solapan, tanto en este score como en el 3D, lo cual nos dificulta discriminar tanto entre todas las leches originales y envejecidas como separar la desnatada de la semidesnatada.

Por lo tanto, podemos concluir una vez más que los sensores voltamétricos discriminan cada leche envejecida con respecto a la original sin problemas, pero no tanto entre todas las leches originales y las envejecidas.

### Leche sin lactosa

Ahora vamos a analizar las leches sin lactosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 96.

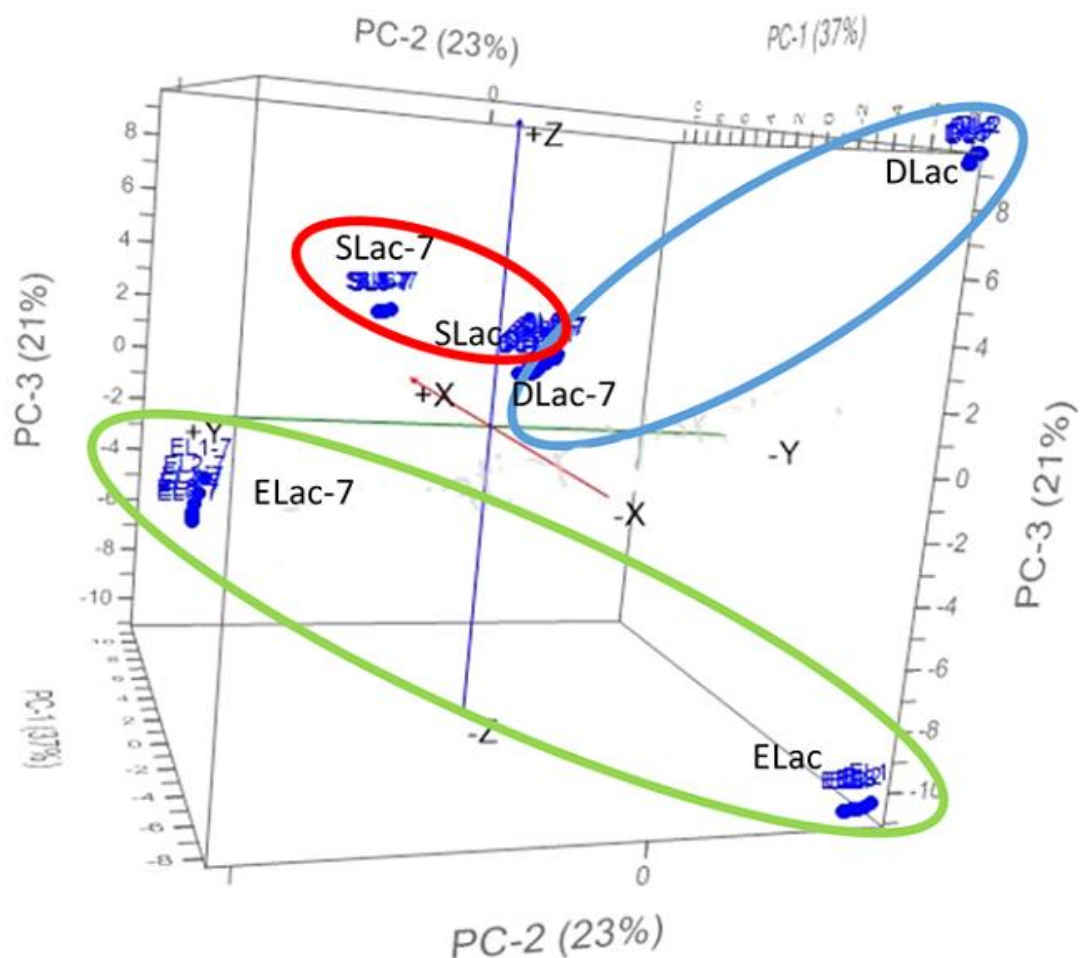


Figura 96. Resultados PCA leche sin lactosa envejecida con los sensores voltamétricos

En la figura 96 hemos usado un score 3D debido a que precisábamos de las tres dimensiones para ver bien las diferencias. Podemos apreciar cómo las muestras de las leches envejecidas nuevamente salen distintas a las de las mismas leches en su estado original. En cuanto a discriminación entre las leches originales respecto a las envejecidas, vemos como de nuevo la leche desnatada envejecida y la semidesnatada original se solapan. Quitando esto, sí que se puede ver en el resto de casos la tendencia de que las leches originales salen a la dcha (teniendo en cuenta la referencia visual de la figura 96) y las envejecidas a la izquierda.

Leche con ácido fólico

Ahora vamos a analizar las leches con ácido fólico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 97.

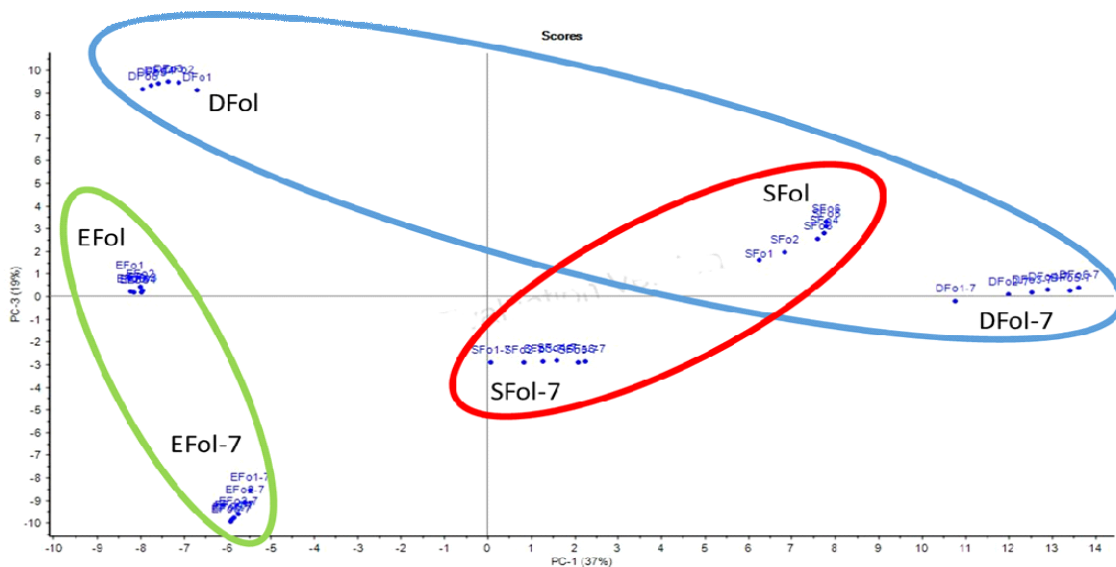


Figura 97. Resultados PCA leche con ácido fólico envejecida con los sensores voltamétricos

En la figura 97 hemos usado un score 2D para ver las diferencias. Vemos cómo las muestras de las leches envejecidas nuevamente salen distintas a las de las mismas leches en su estado original y en cuanto a discriminación entre las leches originales respecto a las envejecidas, vemos como las leches envejecidas se concentran en la parte interior mientras que las originales lo hacen en la superior. De nuevo la leche desnatada envejecida y la semidesnatada original son las que hacen que las diferencias no sean tan notables.



# CAPITULO 5: CONCLUSIÓN FINAL Y POSIBILIDADES FUTURAS



## 5.- CONCLUSIÓN FINAL Y POSIBILIDADES FUTURAS

A continuación, se expondrán las conclusiones finales sobre este trabajo basado en los siguientes puntos:

- Se ha comprobado con éxito que la posibilidad de utilizar una lengua electrónica basada en sensores potenciométricos creada por UvaSens para la discriminación de las trece variedades de leches comerciales de la marca Pascual, tanto en lo referido a su contenido graso como a sus diferentes contenidos nutricionales. Igualmente se ha podido comprobar que la lengua potenciométrica se puede utilizar con éxito para determinar los parámetros químicos más interesantes de los tipos de leche medidos, mediante el uso de análisis estadístico mediante PLS.
- La lengua potenciométrica diseñada es capaz de detectar fácilmente los cambios químicos que se producen en las diferentes variedades de leche sometidas a un proceso de envejecimiento de 7 días.
- Se ha comprobado que la lengua electrónica basada en sensores voltamétricos de la marca Dropsens es capaz de discriminar entre todos los tipos y clases de leche medidos, aunque no con el mismo éxito que la lengua potenciométrica. Gracias a un proceso de selección de sensores se ha llegado a diferenciar con claridad entre las diferentes variedades nutricionales y contenidos grasos de las leches comerciales de Calidad Pascual, El análisis estadístico mediante PLS permite predecir algunos parámetros químicos de leche, pero con mayores márgenes de error que con la lengua potenciométrica. También ha sido posible mediante esta lengua voltamétrica la discriminación entre leches originales y leches envejecidas durante un periodo de siete días. En el apartado de posibilidades futuras se planteará un método para mejorar esta lengua electrónica voltamétrica.
- Resultado del estudio comparativo se ha concluido que, la lengua electrónica potenciométrica diseñada y realizada por el grupo UvaSens es capaz de discriminar de la misma forma o incluso mejor que muchas lenguas compuestas por sensores comerciales.

Con respecto a posibilidades futuras se expondrán tres puntos para continuar con este trabajo en busca de mejorar lo presente o ampliar la información. Son los siguientes:

- Los sensores potenciométricos, que nos han dado buenos resultados en la discriminación de leches, se pueden mejorar utilizando nanomateriales como componente de nuestras membranas que permitan aumentar la sensibilidad de los sensores a la vez que añadiendo enzimas que mejoren su especificidad. Esta mejora ya se está implementando dentro de UvaSens debido a los buenos resultados de estos sensores.

- Dentro de los sensores voltamétricos, la medida clara sería modificarlos con sustancias electrocatalíticas para obtener unos resultados más concluyentes y una mejor discriminación. Tras lo observado durante este trabajo, la propuesta para mejorarlos sería conseguir en primer lugar una mayor estabilidad en la señal que consiguiera aumentar la precisión de los mismos. Para conseguir esto habría que conseguir una correcta activación de los sensores. Dentro de las propuestas estudiadas la que mejores resultados mostraba era la activación mediante peróxido de hidrógeno, consiguiendo una estabilidad mucho mejor, aunque con el inconveniente del tiempo de activación, demasiado alto para un estudio con tantas muestras. Con la reducción de estos tiempos, o con otro tipo de activación se alcanzaría el objetivo. En segundo lugar, se propone una modificación de los sensores que han resultado más útiles con nanomateriales para conseguir una mayor capacidad de discriminación.
- Dentro de los sensores impedimétricos, el objetivo claro para el futuro es que puedan utilizarse para la discriminación de productos lácteos. La principal idea para conseguir este objetivo creemos que es la eliminación de la grasa de la leche. Para ello, se deberían coger las muestras de leche y centrifugarlas para poder facilitar la eliminación de esta grasa. Con esto creemos que aumentarían las posibilidades de discriminación en leche, debido a la eliminación del elemento que manchaba nuestros sensores y que creemos que era la principal causa del problema. También un estudio de procesos de activación de los mismos ayudaría a conseguir señales más estables.



## 6.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] FEN & FINUT (2015). *La leche como vehículo de salud para la población*. Fundación Española de Nutrición (FEN) y Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT).
- [2] López, A.L.; Barriga, D. (2016). *La leche, composición y características*. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía.
- [3] López, G. R. (2008). *Estudio de la leche*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica.
- [4] *Aspectos Nutricionales y Tecnológicos de la Leche*. Dirección General de Promoción Agraria. Ministerio de agricultura.
- [5] Villalba, M. Á. (2019) Tipos de leche, composición y nutrientes. Natural Castelló. <https://www.naturalcastello.com/es/tipos-leche-composicion-nutrientes/>
- [6] PA Vélez, AMG Torres, CD Ferrin, EC Agudelo, LE Vélez, A. Ramirez (2017). *Aspectos relevantes para el diseño de una lengua electrónica*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- [7] J. G. Ruiz, “Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria,” Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.
- [8] Cano Luna, M. (2008). Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras. Universidad de Córdoba, Química Física y Termodinámica aplicada. Córdoba: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- [9] Gandía Romero, J. M. (2014). Sensores electroquímicos aplicados al estudio de la corrosión en estructuras de hormigón armado. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de construcciones arquitectónicas, Valencia.
- [10] Flores, B. E. (1995). Voltametría cíclica: La espectroscopia electroquímica. Parte I
- [11] Ortíz R., R., Martínez, Y., & Hernández, R. (2006). Técnicas Electroanalíticas Parte II Voltamperometría. Universidad de los Andes (Facultad de Ciencias), Química Laboratorio de Análisis instrumental. Mérida: Universidad de los Andes.
- [12] Dias, L., Peres, A., Veloso, A., Reis, F., Vilas-Boas, M., & Machado, A. (2009). *An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk*. Sensors and Actuators B: Chemical, 209-217
- [13] Janata, J. (2009). Principles of chemical Sensors (Segunda Edición ed.). USA: Springer.

- [14] Podrażka, M., Bączyńska, E., Kundys, M., Jelen, P. S., & Witkowska Nery, E. (2017). *Electronic Tongue—A Tool for All Tastes?* Ed. biosensors
- [15] Salvo Comino, C.; García Hernández, C.; García Cabezón, C.; Rodríguez Méndez, M.L. (2018) *Discrimination of Milks with a Multisensor System Based on Layer-by-Layer Films*. *Sensors*,18,2716.
- [16] Vivancos Bono, J. L.. *Lenguas electrónicas. Una tecnología Innovadora para el análisis de alimentos*. Universidad Politécnica de Valencia, Instituto Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Valencia.
- [17] Web oficial de Leche Pascual: <https://lechepascual.es/productos/leche/>
- [18] Web oficial de Metrohm Dropsens: <http://www.dropsens.com/>
- [19] Shrikrisshnan, S., & Lakshminarayanan, V. (2012). Electron transfer studies of redox probes in bovine milk. *Journal of Colloid and Interface Science*,
- [20] OCW Universidad de Cádiz (UCA). (s.f.). *Principios de Voltimetría (Apuntes de Electroquímica)*. Universidad de Cádiz. Cádiz: Universidad de Cádiz.
- [21] Labrador Montero, R. H. (2009). *Diseño y caracterización de sensores químicos en estado sólido. aplicación de modelos teóricos para el estudio de interferencias*. Valencia: Universidad Politecnica de Valencia.
- [22] Rodríguez Méndez, M.L. *Electronic Noses and Tongues in the Food Industry*; Ed:Elsevier Inc: Amsterdam, The Netherlands, 2016.
- [23] Rodríguez Méndez, M.L.; De Saja, J.A.; González Anton, R.; García Hernández, C.; Medina Plaza, C.; García Cabezón, C.; Martín Pedrosa, F. (2016) *Electronic noses and tongues in wine industry*. *Front. Bioeg. Biotechnol*
- [24] Sensor potenciométrico. (s.f.). Recuperado en Marzo de 2020, de Sensor potenciométrico: <http://sensorpotenciometrico.blogspot.com/>
- [25] Gutiérrez, M.; Alegret, S.; del Valle, M. (2008) *Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples*. *Science Direct Biosensors Bioelectronics*
- [26] Aguilera, T., Lozano, J., Paredes, J. A., Álvarez, F. J., & Suárez, J. I. (2012). *Electronic Nose Based on Independent Component Analysis Combined with Partial Least Squares and Artificial Neural Networks for Wine Prediction*. *Sensors*, 12.
- [27] Medina Plaza, C.; García Hernández, C.; De Saja, J.A.; Fernández Escudero, J.A.; Barajas, E.; Medrano, García Cabezón, C.; Martín Pedrosa, F.; Rodríguez Méndez, M.L. *The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes*. *LWT Food Sci. Technol*. 2015, 62

- [25] Web oficial de Micrux Technologies: <https://www.micruxfluidic.com/>
- [26] Vázquez Gutiérrez, J. L. (2007) Empleo de la técnica de espectroscopía de impedancias electroquímicas para la caracterización de biomateriales. Aplicación a una aleación biomédica de Co-Cr-Mo. Universidad Politécnica de Valencia.
- [27] Valera, E, Ramón-Azcón, J, Sánchez-Baeza, F , Marco, M.-P. y Rodríguez, Á. (2008). Inmunosensor impedimétrico para la detección de pesticidas.
- [28] Ramón-Azcón, J; Sánchez Baeza, F. J. ; Marco, M. P.; Bratov, A; Abramova, N ; Ipatov, A. (2011). Multi-analytical method and system based on impedimetric measurements