



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería en Tecnologías Industriales

**DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA
IMPEDIMÉTRICA PARA EL ANÁLISIS DE
PRODUCTOS LÁCTEOS**

Autor: González López, Ángela

Tutoras:

Rodríguez Méndez, María luz

Departamento de Química Física y Química Inorgánica

Pérez González, Clara

Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería

Metalúrgica, Expresión Gráfica en la Ingeniería Cartográfica,

Geodesia y Fotogrametría, Ingeniería Mecánica e Ingeniería de los

Procesos de Fabricación

Valladolid, noviembre 2021.



Universidad de Valladolid

“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora María Luz Rodríguez Méndez por haberme dado la oportunidad de realizar este TFG, así como formarme en su equipo de investigación.

También me gustaría dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Clara por su disponibilidad para ayudarme y por todos los conocimientos enseñados. Al igual que a la profesora Ana Cristina García Cabezón, por ayudarme a profundizar en la técnica de espectroscopía de impedancias.

Gracias también a todos mis amigos, los de toda la vida y aquellos que he ido conociendo durante estos años. Habéis conseguido que me lleve un gran recuerdo.

Por último, agradecer a las personas que más han confiado en mí, mi familia. En especial mis padres y Mario que son lo más importante, sin vosotros no habría llegado hasta donde estoy. Gracias por confiar en mí, por todos los consejos recibidos en el momento apropiado y por vuestro apoyo incondicional, aunque en algunos momentos no haya sido fácil.

Muchas gracias a todos



Universidad de Valladolid

“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



RESUMEN

El presente trabajo consiste en la realización y puesta a punto de una lengua electrónica basada en sensores impedimétricos Su aplicación en la industria alimentaria, en concreto para el análisis y discriminación de diferentes productos lácteos.

En primer lugar, se realiza una caracterización y preselección de diferentes sensores comerciales que conformaran la lengua, eligiendo aquellos que aportan mayor capacidad de discriminación ante sustancias patrón. Los sensores seleccionados serán modificados con nanopartículas de plata y diferentes enzimas para conseguir mayor sensibilidad y especificidad.

Posteriormente se analizan diferentes muestras de leche con diferente contenido en grasa, lactosa o aditivos especiales como puede ser el calcio con la lengua electrónica diseñada. De esta forma se recogen una serie de datos que nos permitirán realizar un análisis estadístico con objeto de determinar la capacidad de discriminación de la lengua electrónica entre nueve tipos de leches diferentes.

PALABRAS CLAVE

Leche, biosensores impedimétricos, lengua electrónica, PCA, PLS

ABSTRACT

The present work consists of the creation and set up of an electronic tongue based on impedimetric sensors. Its application is in the food industry for the analysis and differentiation of different dairy products.

In the first place, a preselection and characterization of the different commercial sensors that would make up the tongue is carried out. Choosing that brings the best result. To achieve a bigger information, these sensors are modified with silver nanoparticles and different enzymes.

Subsequently, different milk samples with different fat, lactose, or special additives such as calcium are analysed. This way, a variety of data is collected to allow a statistical analysis to be carried out in order to determine the discrimination capacity of electronic tongue.

KEYWORDS

Milk, impedimetric biosensors, electronic tongue, PCA, PLS



Universidad de Valladolid

“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



ÍNDICE

<i>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</i>	17
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	19
1.1 INTRODUCCIÓN.....	19
1.2 OBJETIVOS.....	20
1.3 CONTENIDO DE LA MEMORIA	21
<i>CAPÍTULO II: ESTADO DEL ARTE</i>	25
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	27
2. 1 INDUSTRIA LÁCTEA: LECHE	27
2.1.1 Composición bioquímica	27
2.1.2 Propiedades físico-químicas.....	29
2.1.3 Tipos de leche	30
2.2 SENSORES.....	32
2.2.1 Sensores químicos	33
2.3 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS DE MEDIDA PARA SENSORES.....	34
2.3.1 Amperometría	34
2.3.2 Voltimetría	34
2.3.3 Potenciometría	35
2.3.4 Espectroscopía de impedancias	36
2.3.4.1 Representación de la espectroscopía de impedancias	39
2.3.4.2 Circuitos equivalentes	41
2.4 Biosensores electroquímicos.....	44
2.5 SENSORES Y BIOSENSORES MODIFICADOS CON NANOMATERIALES 48	
2.6 LENGUA ELECTRÓNICA.....	49
2.7 TRATAMIENTO DE DATOS (PCA Y PLS)	51
2.7.1 PCA.....	51
2.7.2 PLS	51
<i>CAPÍTULO III: REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS</i>	55
3. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS	57
3.1 Reactivos empleados	57
3.2 Materiales	58



3.3 Equipos empleados	59
<i>CAPÍTULO IV: DESARROLLO EXPERIMENTAL</i>	63
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	65
4.1 PREPARACIÓN DE LA RED DE SENSORES	65
4.2 DISOLUCIONES Y MUESTRAS ANALIZADAS.....	70
<i>CAPÍTULO V: RESULTADOS</i>	77
5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	79
5.1 CARACTERIZACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS SENSORES IMPEDIMÉTRICOS.....	79
5.1.1 Primera caracterización de los sensores	79
5.1.2 Modificación y caracterización de los biosensores	88
5.2.3 Aplicación de la lengua electrónica a muestras de leche.....	95
5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	105
5.2.1 Análisis estadístico mediante la aproximación de circuitos equivalentes	105
5.2.2 Análisis estadístico mediante datos de impedancias a diferentes frecuencias	110
5.2.3 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)	112
<i>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES</i>	118
6. CONCLUSIONES	120
<i>CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA</i>	124
7. BIBLIOGRAFÍA.....	126



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Subsectores más relevantes en cuanto a cifra de negocios	19
Ilustración 2: Representación de las diferentes partes de un sensor	32
Ilustración 3: Entrada de voltaje sinusoidal V y respuesta de corriente I	37
Ilustración 4: Diagrama de Nyquist.....	39
Ilustración 5: Diagrama de Bode	40
Ilustración 6: Diagrama de Nyquist. Efecto Warburg.....	43
Ilustración 7: Enzima ureasa.....	45
Ilustración 8: Enzima β -galactosidasa	46
Ilustración 9: Enzima galactosa oxidasa	46
Ilustración 10: Enzima glucosa oxidasa	47
Ilustración 11: Enzima lipasa	47
Ilustración 12: Esquema de un sensor con dos electrodos.....	65
Ilustración 13: Esquema de un sensor con 4 electrodos	66
Ilustración 14: Reactivos utilizados para la creación de nanopartículas de plata	67
Ilustración 15: Aspecto de las nanopartículas de plata	68
Ilustración 16: Espectro realizado a las nanopartículas de plata	68
Ilustración 17: Esquema de conexión entre la celda electroquímica y el potencióstato.....	70
Ilustración 18: Reactivos utilizados para la disolución de ferro-ferri	71
Ilustración 19: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode con una disolución de Ferro-Ferri a diferentes concentraciones en un sensor de oro IDA 1.....	80
Ilustración 20: Izquierda Diagrama de Nyquist; Derecha Diagrama de Bode con una disolución de Ferro-Ferri a diferentes concentraciones en un sensor de platino IDE 1. Negro: IDE 1 de platino midiendo una disolución de Ferro Ferri 10 mM.....	81
Ilustración 21: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche clásicas sobre un sensor IDA 1 de oro.....	82



Ilustración 22: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche entera diluidas en diferente proporción de agua sobre un sensor IDA 1 de oro.83

Ilustración 23: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche semidesnatada diluidas en diferente proporción de ferro ferri sobre un sensor IDA 6 de oro.....84

Ilustración 24: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche diluidas con ferro ferri al 25% sobre un sensor IDA 6 de oro.85

Ilustración 25: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche entera diluidas con ferro ferri al 25% sobre un sensor IDA 6 de oro.....85

Ilustración 26: Diagrama de Scores realizado con las diferentes muestras de leche diluidas al 25% con Ferro Ferri en los diversos sensores comerciales. 86

Ilustración 27: Diagrama de correlaciones de los diversos sensores comerciales.87

Ilustración 28: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra la señal de Ferro Ferri [5Mm] al utilizar diferente cantidad de nanopartículas de plata en el sensor IDA 6 de oro.88

Ilustración 29: Diagrama de Nyquist. Sensor IDA 6 de oro con la enzima galactosa oxidasa con diferentes cantidades de nanopartículas midiendo la señal que aporta la galactosa con una concentración 0.001 M.....90

Ilustración 30: Diagrama de Nyquist. Sensor IDA 6 de oro con la enzima galactosa oxidasa con diferentes cantidades de nanopartículas midiendo la señal que aporta la galactosa con una concentración 0.01 M.91

Ilustración 31: Diagrama de Nyquist. Sensor IDA 6 de oro con la enzima galactosa oxidasa con diferentes cantidades de nanopartículas midiendo la señal que aporta la galactosa con una concentración 0.1 M.91

Ilustración 32: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra la señal de galactosa con diferentes concentraciones utilizando 40 µL de nanopartículas plata en el sensor IDA 6 de oro.92



Ilustración 33: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra la señal de galactosa con diferentes concentraciones en el sensor IDA 6 de oro sin modificar.93

Ilustración 34: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa.94

Ilustración 35: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa.96

Ilustración 36: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa.....97

Ilustración 37: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa.....97

Ilustración 38: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche clásica desnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro.....99

Ilustración 39: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche clásica semidesnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa.99

Ilustración 40: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche clásica entera en los diferentes sensores IDA 6 de oro. 100

Ilustración 41: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche con Ca desnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro..... 101

Ilustración 42: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche con Ca semidesnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro..... 101

Ilustración 43: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche con Ca entera en los diferentes sensores IDA 6 de oro. 102

Ilustración 44: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche sin lactosa desnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. 102



Ilustración 45: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche sin lactosa semidesnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. ...	103
Ilustración 46: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche sin lactosa entera en los diferentes sensores IDA 6 de oro.	103
Ilustración 47: Circuito equivalente utilizado.....	106
Ilustración 48: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode.	106
Ilustración 49: Diagrama en 3D del gráfico de Scores	108
Ilustración 50: Diagrama de loadings.....	109
Ilustración 51: Gráfico 3D del diagrama de Scores.....	111
Ilustración 52: proporción de varianza explicada acumulada en función del número de componentes mínimo a partir del cual el incremento deja de ser sustancial.....	113
Ilustración 53: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro modificado con 40 μ L nanopartículas de plata analizando una muestra de leche desnatada enriquecida con calcio.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valor promedio de los nutrientes presentes en la leche	27
Tabla 2: Valores de las principales propiedades de la leche.....	30
Tabla 3: Sensores que conforman la lengua electrónica.....	69
Tabla 4: Disoluciones patrón utilizadas.....	72
Tabla 5: Resultados de las muestras de leche analizadas.....	73
Tabla 6: Sensores comerciales utilizados	79
Tabla 7: Valores de los diferentes elementos en la aproximación con el circuito equivalente utilizado	107
Tabla 8: Valores de Z' y Z'' a diferentes frecuencias de un sensor IDA 6 de oro modificado con 40 μ L nanopartículas de plata analizando una muestra de leche entera enriquecida con calcio.....	111
Tabla 9: Resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de leche....	113



Tabla 10: Resultados obtenidos en el modelo de regresión PLS..... 114

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Ley de Faraday.....34
Ecuación 2: Expresión de la ecuación de Nernst.....35
Ecuación 3: Ley de Ohm36
Ecuación 4: Definición de una resistencia eléctrica.....36
Ecuación 5: Expresión de un condensador37
Ecuación 6: Señal de voltaje en corriente alterna en función del tiempo37
Ecuación 7: Señal de corriente en función del tiempo38
Ecuación 8: Complejo de impedancia38
Ecuación 9: Relación de Euler38
Ecuación 10: Potencial en función de una impedancia compleja38
Ecuación 11: Corriente en función de una impedancia compleja.....38
Ecuación 12: Representación de una impedancia.....38
Ecuación 13: Ángulo de fase.....38
Ecuación 14: Impedancia de un elemento CPE.....42
Ecuación 15: Impedancia cuando existe difusión. Elemento Warburg.....43
Ecuación 16: Expresión de Michaelis-Menten45
Ecuación 17: Reacción producida de las nanopartículas de plata67
Ecuación 18: Molaridad de la disolución de KOH71



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





Universidad de Valladolid

“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

Se entiende por industria alimentaria el conjunto de las actividades industriales que se encargan del tratamiento, transformación y conservación de diferentes productos principalmente de origen vegetal o animal [1]

Dentro de la Unión Europea, la industria agroalimentaria es la principal actividad de la industria manufacturera representando el 15.2 % del total. Factura cada año alrededor de 1.205.000 millones de euros [2].

En España también tiene un papel importante, situándose al igual que en Europa en el primer puesto. Representa el 23.3% del sector industrial. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE) en España se facturan alrededor de 130.795,8 millones de euros al año [2].

La industria de la alimentación se divide en subsectores. La Ilustración 1 refleja en cuanto a cifra de negocios las más importantes en España.

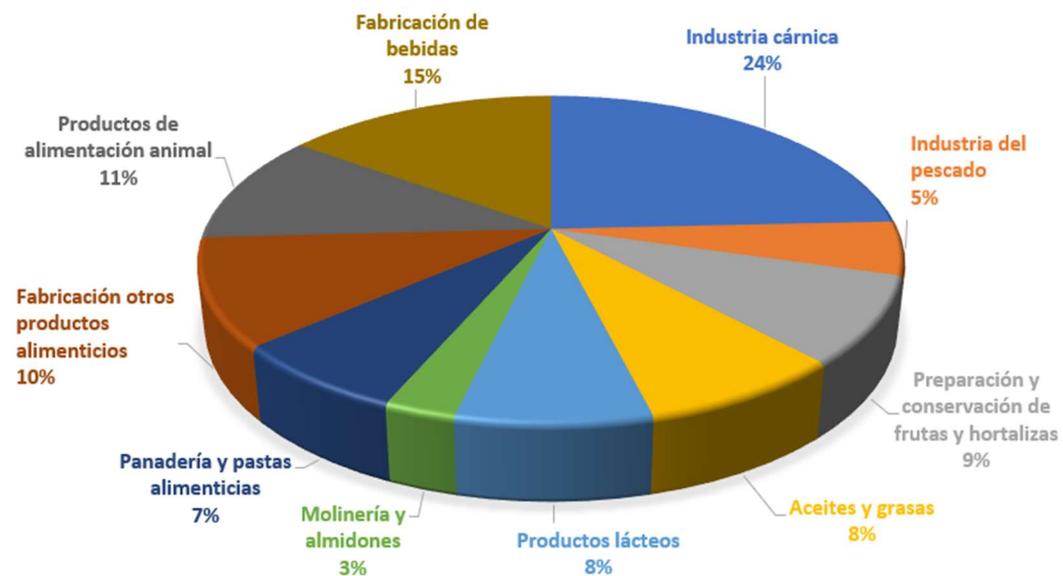


Ilustración 1: Subsectores más relevantes en cuanto a cifra de negocios.

La principal actividad es la industria cárnica, con una cifra de negocios de 31.727 millones de euros (24%). Las actividades relacionadas con productos lácteos el sexto lugar, llegando a facturar 9.923 millones de euros anuales [2].

La industria actual está en continuo crecimiento y experimentando grandes cambios. Esto se conoce como revolución industrial 4.0. Estos cambios pretenden transformar las empresas tradicionales mediante la



automatización o Big Data entre otros muchos, para conseguir mejores resultados en el negocio [3].

El principal objetivo que pretende conseguir la industria alimentaria es lograr que los procesos de producción sean más seguros, cuenten con una mayor calidad y reducir el tiempo del proceso. Para poder conseguirlo hay que diseñar y poner a punto nuevos sistemas más fiables para la realización de los diferentes ensayos y poder combinarlos con los sistemas inteligentes.

Con esta nueva situación surgen grupos de investigación para poder estar en conexión con lo que el mercado y la sociedad demanda.

El grupo UvaSens surgió en 1992 y se encuentra ubicado en la Escuela de Ingenierías Industriales. Es un equipo multidisciplinar dirigido por la profesora catedrática de Química Inorgánica, María Luz Rodríguez Méndez, del departamento de Química Física y Química Inorgánica. Este grupo lleva a cabo numerosas investigaciones sobre el desarrollo de biosensores y sensores estudiando su utilización en lenguas electrónicas aplicadas al mundo agroalimentario para el análisis y control de calidad de diferentes productos: vinos, mostos, aceites, leche, etc.

1.2 OBJETIVOS

El objetivo principal que se quiere conseguir con la realización de este Trabajo Fin de Grado es el desarrollo y caracterización de una lengua electrónica impedimétrica modificada con nanopartículas y enzimas para su aplicación con el control de calidad de productos lácteos. En concreto, su función deseada es el análisis de diferentes muestras de leche comerciales.

Para cumplir con el objetivo principal se siguieron los diferentes objetivos específicos:

- Elección de los diferentes sensores comerciales para su posterior modificación y aplicación en muestras reales.
- Modificación de los sensores con nanopartículas de plata y diferentes enzimas elegidas por su acción en compuestos de interés en la leche.
- Acondicionamiento y calibrado de la lengua electrónica mediante el uso de disoluciones patrón.
- Estudio de la capacidad de la lengua para discriminar entre diferentes muestras de leche de vaca en función de sus características nutricionales.
- Aplicación de métodos de análisis estadístico multivariante a los datos obtenidos en los análisis de las diferentes muestras, para el desarrollo



de un modelo matemático capaz de predecir correlaciones entre los datos físico-químicos obtenidos por métodos tradicionales y los datos obtenidos con la lengua electrónica.

1.3 CONTENIDO DE LA MEMORIA

La memoria de este Trabajo Fin de Grado se divide en seis capítulos. A continuación, se explica de manera breve el contenido.

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En este primer capítulo se introduce el tema del trabajo y los objetivos de este, haciendo hincapié en el contexto actual de la industria agroalimentaria en España y los importantes cambios que está sufriendo.

CAPÍTULO II – ESTADO DEL ARTE

El estudio teórico acerca de los temas desarrollados en el trabajo: PRINCIPALES PROPIEDADES DE LA LECHE, SENSORES, TÉCNICAS ELÉCTROQUÍMICAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS se expone en este punto.

CAPÍTULO III – REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Este capítulo recoge todos los reactivos, materiales y equipos utilizados para la realización del presente trabajo.

Este capítulo está destinado a explicar los métodos, la programación y las estructuras utilizadas para el progreso del trabajo, además de los resultados obtenidos.

CAPÍTULO IV – DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este capítulo está destinado a explicar los métodos, pruebas, acondicionamiento y estudio de los diferentes sensores que conforman la lengua electrónica.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

En conjunto con el punto anterior, este capítulo se basa en la exposición y explicación de los resultados obtenidos a lo largo de la investigación realizada.

CAPÍTULO VI – CONCLUSIONES

Se exponen las conclusiones de esta memoria, así como posibles líneas futuras de trabajo, mejoras o ampliaciones se recogen en este capítulo.



CAPÍTULO VII – BIBLIOGRAFÍA

En este último punto de la memoria se presenta la bibliografía empleada en la realización de este trabajo con el objetivo de obtener información para la comprensión y desarrollo de este documento.



Universidad de Valladolid

“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



CAPÍTULO II: ESTADO DEL ARTE



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2. 1 INDUSTRIA LÁCTEA: LECHE

El sector lácteo en España es uno de los más importantes desde el punto de vista económico y social. La leche constituye un alimento fundamental y básico en la alimentación humana en las primeras etapas de la vida. Su principal producción es la leche de vaca, situándose las explotaciones ganaderas mayoritariamente en los territorios de Galicia, Asturias, Cantabria, Castilla y León, País Vasco y Andalucía [4].

La leche de consumo es uno de los productos más demandados. Además, sirve como materia prima para realizar diferentes productos lácteos como el yogur y el queso [5].

La denominación genérica de leche se utiliza únicamente cuando se trata de leche de origen vacuno. Las leches producidas por otras hembras de animales domésticos se designarán indicando además el nombre de la especie correspondiente [6].

Según el RD 2484/1967 se entiende por leche natural “El producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas”.

2.1.1 Composición bioquímica

La leche es una mezcla acuosa cuya composición principal presenta hidratos de carbono, grasas y proteínas. Además, contiene sales minerales, vitaminas y otros componentes en menor medida. Estos valores pueden variar dependiendo de la raza, la zona de producción, la estación del año o la alimentación entre otros [7]. La siguiente tabla (Tabla 1) recoge el valor promedio de los nutrientes en la leche [8]:

Tabla 1: Valor promedio de los nutrientes presentes en la leche.

<i>Componentes</i>	<i>%</i>
<i>Agua</i>	87.5
<i>Hidratos de carbono</i>	4.7
<i>Proteínas</i>	3.2
<i>Grasas</i>	3.6
<i>Minerales</i>	0.7
<i>Vitaminas</i>	0.3



A continuación, se explica de forma detallada cada uno de sus componentes principales:

- Agua: es el componente mayoritario y se puede distinguir entre: agua libre, la cual constituye la fase continua de la leche donde se encuentran disueltos los azúcares y sales; y agua de enlace, es aquella que se encuentra asociada a proteínas sirviendo como elemento de unión entre compuestos no solubles [9].
- Hidratos de carbono: el más característico es la lactosa. Está formada por la unión de las moléculas de glucosa y galactosa. Cuando es atacada por bacterias fermenta rápidamente dando lugar al ácido láctico. Pese a estar formada por dos moléculas de azúcares presenta un débil sabor dulce [8] [9] .
- Proteínas: son el componente más importante desde el punto de vista nutricional. Están compuestas por aminoácidos y dependiendo de la estabilidad que tengan las proteínas se determinan sus propiedades físico-químicas. Las proteínas se pueden dividir en dos grandes grupos. Las caseínas representan el 80% de las proteínas, se encuentran agrupadas formando micelas las cuales coagulan al producirse una acidificación del medio con pH próximo a 4.6. El segundo grupo en esta clasificación hace referencia a las proteínas séricas. Están en menor proporción, representan al 20 % del total, y son susceptibles de precipitar por el calor [8].
- Grasas: se encuentran en la leche en forma de pequeños glóbulos cuyo tamaño depende del tipo de leche. Cuanto mayor es el diámetro más fácil es de separarla. La materia grasa de la leche es una mezcla de diferentes componentes. La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran formados por triglicéridos, que suponen aproximadamente el 98% del total de la grasa. Se forman al unirse tres ácidos grasos con un derivado de glicerol. Otro componente de la grasa son los fosfolípidos, que se encuentran en la membrana de los glóbulos de grasa. Sólo representan un 0.8% de las grasas. Por último, las sustancias insaponificables. representan aproximadamente el 1% de las grasas. Las componen carotenoides, los cuales son antioxidantes solubles en lípidos; esteroides que se encargan de la estabilización de triglicéridos y tocoferoles que son antioxidantes naturales fotosensibles [8].
- Minerales: Calcio, potasio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, azufre y los cloruros forman aproximadamente el 99% de todos los minerales



en la leche. Los demás minerales conforman las trazas debido a su bajo contenido. Los minerales representan únicamente al 0.5% - 1% del total de la leche, pero estos ejercen una gran influencia sobre sus características y proporcionan un gran aporte nutricional [7] [10].

- Vitaminas: la leche posee gran variedad de vitaminas (vitamina A, D, C, E, B1, B2, B12, etc.) que se encuentran en pequeñas cantidades en la leche. Su presencia es muy importante debido al gran aporte nutricional que suponen [10].

2.1.2 Propiedades físico-químicas

En este apartado se presentan las principales propiedades físicas (se obtienen mediante la observación y medición), químicas (alteran la estructura interna) y organolépticas (se perciben por los sentidos) de la leche.

- Densidad: No presenta un valor constante, depende de diversos factores. Si aumenta la temperatura, disminuye la densidad, en cambio si aumenta la concentración de sólidos disueltos el valor de la densidad aumenta. Además, depende de la cantidad de grasa que tenga la leche [8].
- PH: determina la concentración de iones. Este valor depende de la temperatura y de la carga microbiológica responsables de la aparición de procesos fermentativos ácido-lácticos [11].
- Acidez: se distinguen dos tipos de acidez, la natural que es debida a la cantidad de caseína, sustancias minerales y ácidos orgánicos naturales. El otro tipo es la acidez desarrollada, producida por la degradación microbiana [11].
- Viscosidad: es la resistencia de un líquido al flujo. Principalmente va a depender del contenido en grasa, las proteínas y la temperatura [11].
- Punto de congelación: temperatura a la cual se solidifica un líquido al disminuir la energía del sistema. Es muy importante esta propiedad en la leche ya que va a determinar el contenido de agua de la leche. A medida que aumenta la cantidad de agua el punto de congelación estará más cercano a 0°C [11].

- Calor específico: es una magnitud física la cual nos expresa la cantidad de calorías para poder aumentar 1°C la temperatura. Va a depender principalmente del contenido en grasa de la leche [11].
- Punto de ebullición: temperatura a la cual un líquido se transforma en gas. Depende de los minerales y azúcares que la leche tenga disueltos [11].
- Índice de refracción: expresa la desviación de la luz cuando atraviesa el aire e incide en la leche. Permite determinar la concentración cuando la leche se evapora y comprobar las características de la materia grasa [11].

Otras características de la leche estudiadas son la apariencia, presenta un color blanquecino muy característico debido a las caseínas; el olor, fácilmente reconocible por la presencia de compuestos orgánicos volátiles; y el sabor, el cual es medianamente dulce debido al contenido en azúcares de la leche. Todas estas características permiten identificar de forma cualitativa posibles cambios en el producto final [8].

A continuación, se muestran los valores aproximados de las propiedades citadas anteriormente (Tabla 2) [8] [11]:

Tabla 2: Valores de las principales propiedades de la leche.

PARÁMETROS	VALOR
Densidad (Kg/m ³)	Entre 1.0231 y 1.0398
PH	Entre 6.65 y 6.71
Acidez (°D)	Entre 14 y 18
Viscosidad (cP)	Entre 2.1 y 1.8
Punto de congelación (°C)	Entre -0.53 y -0.57
Calor específico (cal/ g °C)	Entre 0.93-0.94
Punto de ebullición (°C)	100.17
Índice de refracción	Entre 1.3440 y 1.3485

2.1.3 Tipos de leche

Existen diversos tipos de leche, en el presente trabajo se va a hacer una diferenciación según el proceso tecnológico al cual se haya sometido el producto y en función de su composición [8] [9].

- En primer lugar, la leche puede clasificarse según su higienización aplicando diferentes tratamientos térmicos:



- Leche cruda: aquella que no ha sido procesada, puede contener microorganismos.
- Leche pasteurizada: esta leche se somete a un tratamiento térmico para conseguir eliminar los microorganismos que pudiese tener. La leche se somete a una temperatura de entre 55 y 75°C durante 17 segundos en un intercambiador de calor por placas. Su duración es un periodo corto ya que con este tratamiento la flora natural que contiene puede alterar la calidad de la leche.
- Leche UHT: la principal diferencia con la leche pasteurizada es la temperatura y el tiempo durante el cual se somete el producto al proceso de higienización. En este caso, se lleva la leche aproximadamente a unos 138°C, pero durante un breve periodo y seguidamente se realiza un rápido enfriamiento. La leche apenas es alterada ya que es un proceso de corta duración, esto permite que se pueda conservar durante varios meses.

Las siguientes clasificaciones que se realizan son dependiendo de sus componentes.

- Leche natural:
 - Leche entera: es aquella que conserva todo su contenido nutricional intacto. Es un alimento rico en todos los nutrientes necesarios para el organismo.
- Leches modificadas:
 - Leche semidesnatada: se trata de leche cuyo contenido graso no puede suponer el 15% en peso. Debido al proceso de desgrasado se elimina aproximadamente la mitad de las vitaminas. Es la variedad de leche más consumida.
 - Leche desnatada: en este tipo de leche el contenido graso no puede superar el 1% en peso. Presenta un sabor más suave y un menor índice de refracción.
 - Leche sin lactosa: es un tipo de leche la cual ha sido tratada mediante la adición de la enzima lactasa. Este proceso permite

romper las moléculas de lactosa separándose así en glucosa y galactosa. De esta forma facilita la digestión a las personas intolerantes a la lactosa.

- Leche con omega 3: se trate de un tipo de leche enriquecida en la cual se cambian los ácidos grasos saturados por ácidos grasos insaturados omega 3.

2.2 SENSORES

Un sensor es un dispositivo capaz de convertir una variable física, química o biológica en una señal medible de otra naturaleza, normalmente eléctrica debido a que este tipo de dominio físico es el más utilizado en los sistemas de medida. Un sensor sólo puede ser un dispositivo de entrada ya que funciona como un intermediario entre la variable física y el sistema de medida.

Se pueden distinguir tres partes en un sensor. La primera que se encuentra es el receptor, encargado de recoger la información para alimentar al sistema. Además, consta de un transductor encargado de transformar la señal de entrada en otra que entienda el sistema. Por último, se tiene al amplificador cuya misión es transformar la señal de salida del transductor. La Ilustración 2 refleja un esquema de un sensor mostrando las diferentes partes de las que consta [12] [13].

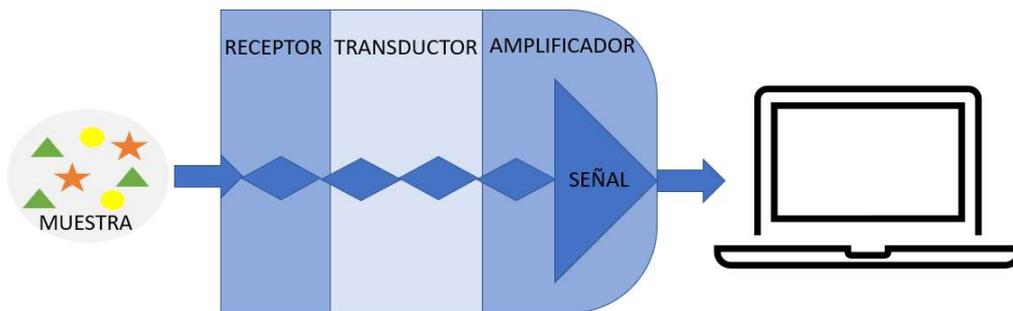


Ilustración 2: Representación de las diferentes partes de un sensor.

Existen diversos tipos de sensores según la variable física medida como mecánicos, eléctricos, magnéticos o químicos siendo estos últimos de principal interés en el presente trabajo [12][13].



2.2.1 Sensores químicos

Un sensor químico es un elemento diseñado para detectar de forma selectiva un compuesto de interés en un medio y transformar la información aportada en una señal útil (analógica), que se pueda tratar posteriormente en diferentes softwares. La forma de detección del compuesto de interés en un sensor químico es mediante la interacción química del sensor con el compuesto [14].

El uso de los sensores químicos se ha ido desarrollando de forma exponencial en los últimos años. Los campos en los que destaca su actividad son en biomedicina, medioambiente y dentro de la industria alimentaria [15].

La clasificación de este tipo de sensores se realiza atendiendo a la señal de entrada, con lo cual se diferencian los siguientes [15]:

- Sensores térmicos: detectan cambios de temperatura en la superficie del electrodo. La técnica más utilizada en los sensores térmicos consiste en colocar una capa químicamente selectiva encima de una capa térmica. De esta forma se consigue medir el calor desprendido en la reacción química específica. El calor se genera de forma continua con lo cual estos sensores no son de equilibrio [16].
- Sensores ópticos: Son sensores basados en la detección del cambio de una característica espectroscópica. Es decir, en este tipo de sensores un elemento fotosensible se encarga de procesar la información recibida de un haz de luz emitido. La principal ventaja que presentan es que no consumen el analito de interés por lo que los métodos de análisis son no destructivos [17].
- Sensores piezoeléctricos: Se fundamentan en la micro gravimetría, es decir miden los cambios de masa que se produce en la superficie del sensor debido a la interacción de las especies químicas [16].
- Sensores electroquímicos Estos sensores se fundamentan en la detección de cambios en el potencial o la corriente eléctrica cuando una especie química interactúa con el sensor. Se dividen en diferentes tipos en función del parámetro que es estudiado y las condiciones de trabajo. Una de las principales ventajas de estos para la industria es el bajo coste y el tiempo de análisis es corto. De esta manera se consigue el abaratamiento de los costes de producción. Un tiempo de análisis reducido permite corregir cualquier error más rápidamente y así perder menos tiempo en los procesos industriales [16].



2.3 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS DE MEDIDA PARA SENSORES

En las diferentes técnicas electroquímicas se estudian las propiedades eléctricas de una disolución. La principal característica de estas técnicas son su elevada precisión, la elevada selectividad y gran precisión [18].

2.3.1 Amperometría

La información se obtiene de la relación corriente-concentración. Las transformaciones químicas que tienen lugar en los electrodos al paso de corriente se rigen por la ley de Faraday y por la ecuación corriente-voltaje [16].

Ecuación 1: Ley de Faraday.

$$C = \frac{Q}{nFV_{cell}}$$

En la Ecuación 1 se representa la ley de Faraday, los parámetros que aparecen hacen referencia a la concentración (C), la carga (Q), la constante de Faraday (F), el número de electrones (n) y al volumen de la celda (V_{cell}) [16].

2.3.2 Voltimetría

Esta técnica permite obtener información de un analito midiendo la corriente cuando se modifica el potencial entre un electrodo de referencia y el electrodo de trabajo. En el electrodo de trabajo se producirá una reacción de oxidación-reducción a potenciales característicos de la especie química que se analiza [19].

En voltimetría se utilizan tres electrodos; el potencial que se impone al electrodo de trabajo que se compara con el contraelectrodo y el electrodo de referencia. En este caso se requiere un flujo de corriente mínimo en el electrodo de referencia y el de trabajo [20].

Según la forma en la que se aplica el potencial se puede realizar la siguiente clasificación [20]:

- Voltimetría de barrido lineal: se realiza un barrido lineal entre el electrodo de trabajo y el de referencia. De esta forma se recoge información de la corriente [21].



- Voltametría de pulso diferencial: la variación de potencial se produce gradualmente en pequeños intervalos [20].
- Voltametría cíclica: La variación de potencial en el electrodo de trabajo se realiza mediante una señal de forma triangular. Es una de las técnicas más utilizadas para investigar los procesos de oxidación y reducción [22].

2.3.3 Potenciometría

Las medidas se hacen con la condición de corriente cero. De esta forma se estudia el potencial eléctrico que se tiene en la superficie del sensor cuando se introduce en una disolución con iones presentes.

La relación básica que gobierna el funcionamiento de la mayoría de los sensores potenciométricos es una forma simplificada de ecuación corriente-voltaje. Dando lugar a una de las expresiones de la ecuación de Nernst [20] [16]:

Ecuación 2: Expresión de la ecuación de Nernst.

$$E = E^0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln (Q)$$

Donde:

E=potencial corregido

E₀= Potencial estándar

n= Número de electrones transferidos

F= Constante de Faraday

Q= coeficiente de reacción

Esta técnica se ha desarrollado en los últimos años ya que permiten realizar medidas directas o actuar como electrodos en valoraciones. Estos trabajos se pueden realizar con equipos baratos y portátiles con lo cual todas las ramas de la ciencia se están beneficiando de esta versatilidad y facilidad de operación. No obstante, presentan algunas desventajas como que solo son capaces de detectar los iones cargados directamente [21].



2.3.4 Espectroscopía de impedancias

La técnica de espectroscopía de impedancias se basa en aplicar un potencial a un electrodo y medir su respuesta en corriente a diversas frecuencias. En el presente trabajo las medidas que se realizan son a potencial a circuito abierto [25].

En los últimos años, esta técnica se utiliza de forma rutinaria para conocer las diferentes propiedades de materiales. Se usa de forma rutinaria en la caracterización de revestimientos, baterías, pilas de combustible y fenómenos de corrosión. También se ha utilizado ampliamente como una herramienta para investigar los mecanismos de electrodeposición, estudios de electrodisolución, pasividad y corrosión [26].

La espectroscopía de impedancias se basa en un concepto simple, la resistencia eléctrica (R). “R” está relacionado con la capacidad de un elemento de circuito para resistir el flujo de corriente eléctrica [27].

La ley de Ohm (Ecuación 3) define la resistencia en términos de la relación entre la entrada voltaje (V) y corriente de salida (I):

Ecuación 3: Ley de Ohm.

$$R = \frac{V}{I}$$

Esta relación únicamente es aplicable en una resistencia ideal. El valor R [ohmios] es independiente de la frecuencia (CA), y la corriente (CA) y las señales de voltaje a través de la resistencia ideal están "en fase" entre sí [27].

Cuando se aplica voltaje externo V, una corriente uniforme I pasa a través de la muestra, y la resistencia se define como:

Ecuación 4: Definición de una resistencia eléctrica.

$$R = \rho \frac{d}{A}$$

Donde:

ρ [ohm cm]: resistividad eléctrica característica de un material.

A: área de los electrodos.

d: distancia entre electrodos.

Un condensador almacena la energía magnética creada por la aplicación de un campo eléctrico, formado cuando dos electrodos delimitadores están separados por un medio no conductor. El valor de la capacitancia presentado en Faradios (F) dependiendo del área de los electrodos (A), la distancia entre los electrodos (d) y las propiedades del dieléctrico reflejadas en una "permitividad relativa" (ϵ) [27].

Ecuación 5: Expresión de un condensador.

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon A}{d}$$

La impedancia es la relación entre el voltaje y corriente, demostrando la capacidad de un circuito para resistir el flujo de corriente eléctrica. Se conoce como "impedancia real". También refleja la capacidad de un circuito para almacenar energía eléctrica, lo cual se conoce como "impedancia imaginaria" [27].

La impedancia se puede definir como una resistencia compleja resultante del flujo de corriente a través de un circuito compuesto por varias resistencias y condensadores alternos (AC) [25].

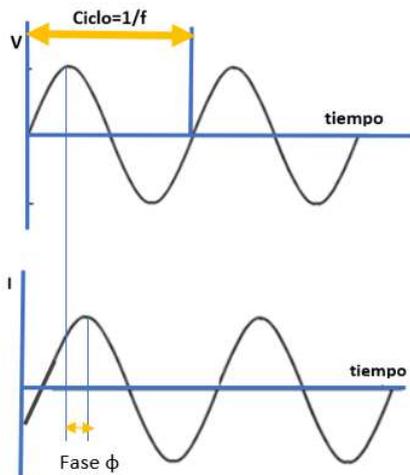


Ilustración 3: Entrada de voltaje sinusoidal V y respuesta de corriente I.

La impedancia electroquímica normalmente se mide usando una señal de voltaje de corriente alterna de excitación (V) y con una pequeña amplitud (V_A). El voltaje, expresado en función del tiempo t, tiene la forma [27]:

Ecuación 6: Señal de voltaje en corriente alterna en función del tiempo.

$$V(t) = V_A \text{sen}(2\pi ft) = V_A \text{sen}(\omega t)$$

En un sistema lineal o pseudolineal, la respuesta actual a un sinusoidal la entrada de voltaje es una senoide a la misma frecuencia, pero "desplazada

en fase". La señal de corriente de respuesta $I(t)$ es desplazado en fase (ϕ) y tiene una amplitud diferente, I_A [27]:

Ecuación 7: Señal de corriente en función del tiempo.

$$I(t) = I_A \text{sen}(\omega t + \phi)$$

Una expresión análoga a la ley de Ohm permite calcular el complejo impedancia del sistema como la relación entre el voltaje de entrada $V(t)$ y la salida medida corriente $I(t)$ [27]:

Ecuación 8: Complejo de impedancia.

$$Z^* = \frac{V_A \text{sen}(\omega t)}{I_A \text{sen}(\omega t + \phi)} = Z_A \frac{\text{sen}(\omega t)}{\text{sen}(\omega t + \phi)}$$

Usando la relación de Euler [28]:

Ecuación 9: Relación de Euler.

$$\exp(j\phi) = \cos\phi + j\text{sen}\phi$$

Es posible expresar la impedancia como una función compleja. El potencial $V(t)$ se describe como [28]:

Ecuación 10: Potencial en función de una impedancia compleja.

$$V(t) = V_A e^{j\omega t}$$

y la respuesta actual como [28]:

Ecuación 11: Corriente en función de una impedancia compleja.

$$I(t) = e^{j\omega t - j\phi}$$

La impedancia se representa entonces como un número complejo ($Z_{\text{real}} + jZ_{\text{imag}})$ [28]:

Ecuación 12: Representación de una impedancia.

$$Z^* = \frac{V}{I} = Z_A e^{j\phi} = Z_A (\cos\phi + j\text{sen}\phi) = Z_{\text{REAL}} + jZ_{\text{IM}}$$

Por último, el ángulo de fase se obtiene como [28]:

Ecuación 13: Ángulo de fase.

$$\tan\phi = \frac{Z_{\text{IM}}}{Z_{\text{REAL}}}$$

2.3.4.1 Representación de la espectroscopía de impedancias

La utilización de diferentes gráficos proporciona una aproximación para el tratamiento de los datos de impedancia. Habitualmente la información que se obtiene se representa en los diagramas de Nyquist y Bode. En este último el módulo de impedancia y el ángulo de fase se representan en función de la frecuencia [26].

Diagrama de Nyquist

En este gráfico de la Ilustración 4 se muestra la relación entre la impedancia real con la impedancia imaginaria. La siguiente ilustración refleja un ejemplo de este diagrama [25].

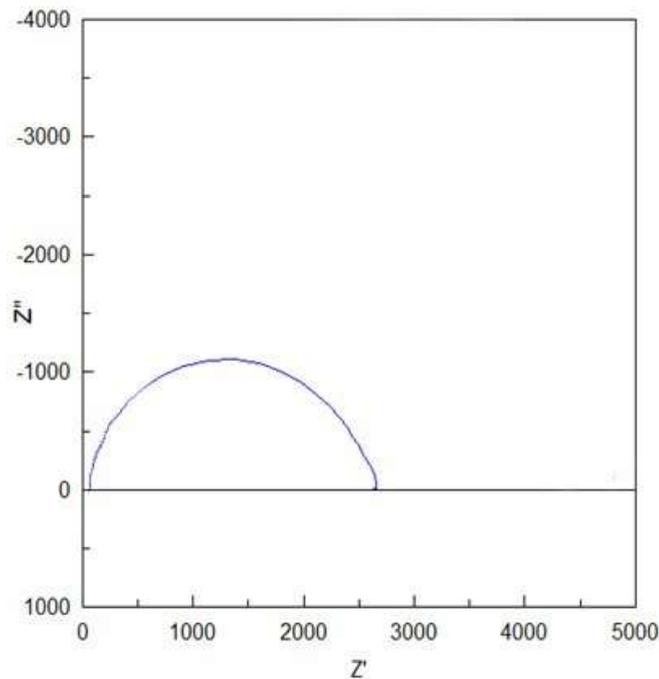


Ilustración 4: Diagrama de Nyquist.

El eje de abscisas se corresponde con la parte real de la impedancia y en el eje de ordenadas se encuentra multiplicado por -1 el valor de la parte imaginaria. De esta manera se dibuja una curva en la que cada punto representa a un valor en frecuencia los datos de impedancia real e imaginaria y permite obtener una idea de la impedancia global [29].

La mayor desventaja de la utilización de Nyquist es que no se observa con claridad la dependencia del sistema con la frecuencia. Es muy difícil

diferenciar los valores de impedancia más bajos y altos; ya que algunas veces pueden existir diferentes constantes de tiempo de diferente orden de magnitud [30].

Para solventar este problema se recurre a la utilización del diagrama de Bode. De esta forma se complementa la información que se tiene con el diagrama de Nyquist [30].

Diagrama de Bode

En este gráfico se ve reflejado el comportamiento del módulo de impedancias $|Z|$ y el ángulo de fase ϕ con respecto a la frecuencia, f . La siguiente imagen muestra un ejemplo de este diagrama [29].

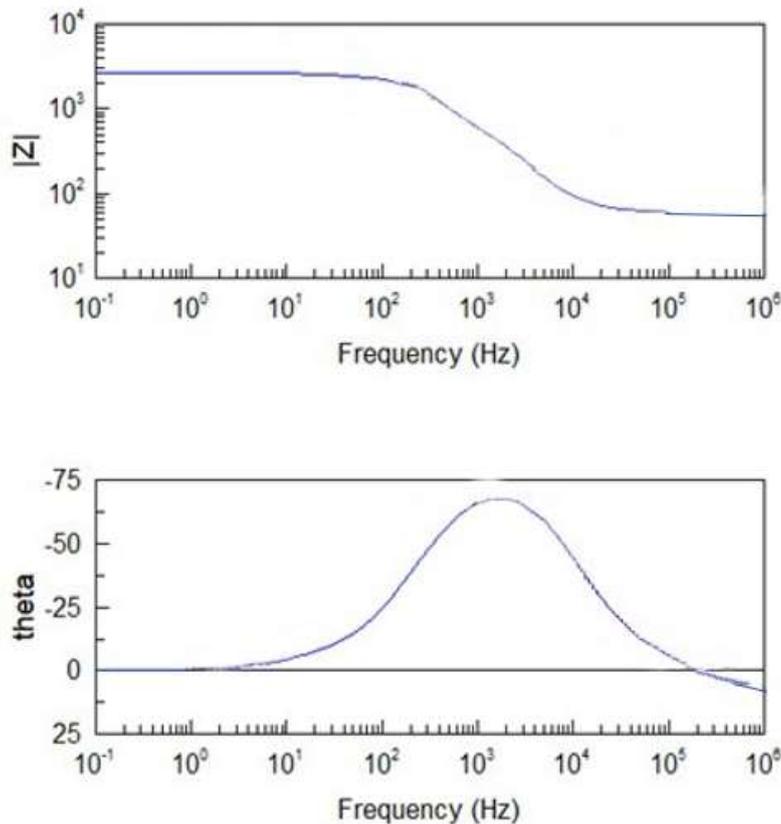


Ilustración 5: Diagrama de Bode.

Como se puede apreciar en la Ilustración 5 el diagrama de Bode se divide en dos representaciones. La primera hace referencia al módulo de impedancias con respecto a la frecuencia y la segunda al ángulo de fase [29].

La representación se realiza en escala logarítmica. Esto permite conocer mejor el comportamiento a frecuencias más bajas [28].



Los diagramas de fase hacen referencia a los parámetros del sistema. Se puede observar cuanto se aleja de la idealidad y se aproxima su valor a un condensador o una resistencia [29].

Los diagramas del módulo de impedancias en cambio son menos sensibles a estos parámetros, pero aportan información a bajas y altas frecuencias permitiendo conocer la resistencia a la solución y transferencia electrónica [29].

2.3.4.2 Circuitos equivalentes

Una vez que se realizan las medidas de impedancias en función de la frecuencia el sistema se modela mediante un modelo físico lo más ajustado posible. Este modelo es conocido como circuito eléctrico equivalente [31].

En una reacción electroquímica los electrodos no actúan como una superficie uniforme. Por lo tanto, hay que tener en cuenta la dispersión en las constantes de tiempo y en el circuito eléctrico, así como en resistencias y condensadores donde aparecerán elementos de fase constante [32].

Otro factor a tener en cuenta es la difusión derivada del hecho de que una muestra no sea finita. Por tanto, para poder realizar una buena aproximación a circuitos equivalentes hay que recurrir a los llamados elementos Warburg [32].

Resistencias

En la aproximación más simple posible a un circuito equivalente aparecen dos resistencias. Una hace referencia a la resistencia a la solución y la segunda es la que se encarga de reflejar la transferencia electrónica.

- Resistencia a la solución: se ve influenciada principalmente por la concentración de la disolución. El valor de esta resistencia se corresponde con las impedancias a frecuencias más altas [32].
- Resistencia a la transferencia electrónica: hace referencia a la transferencia de carga a través de la superficie. Depende del potencial energético asociado con los procesos de oxidación / reducción y con la energía de barrera de las especies redox que entran en contacto con el electrodo. En el diagrama de Nyquist esta resistencia se corresponde



con el radio del semicírculo. A medida que esta resistencia aumenta, el semicírculo que se produce es mayor y viceversa [32].

Condensadores

Este elemento se utiliza cuando se produce el efecto de doble capa. Entre la disolución de medida y el electrodo existe una doble capa eléctrica, es decir los iones de la disolución se adhieren en la superficie del electrodo durante el ensayo y generan esta doble capa [15].

El electrodo al estar cargado se separa de estos iones por una pequeña capa que actúa de aislante. Al separarse estas cargas se produce una capacidad, la cual quedará reflejada en los circuitos equivalentes como un condensador. Este efecto se produce en las frecuencias más altas [15].

Elementos de fase constante

Las impedancias que se obtienen en las medidas no son ideales. Esta no idealidad en los circuitos equivalentes viene representada por elementos de fase constante (CPE) [15], [25].

Este elemento representa la respuesta capacitiva del material con la interfaz. El efecto de la capacidad se ve reflejado en el semicírculo. A medida que el semicírculo se hace más plano quiere decir que la respuesta es menos ideal y se deben utilizar elementos de fase constante para su ajuste.

La impedancia de un elemento CPE se define como [15]:

Ecuación 14: Impedancia de un elemento CPE.

$$CPE = \frac{1}{C(j\omega)^n}$$

Donde:

C: capacidad de la interfase. Es un parámetro numéricamente igual a la admitancia.

ω : frecuencia

j: es la unidad imaginaria.

n: número que se mueve entre 0 y 1.

El comportamiento del CPE depende de “n”. Cuanto más próximo a 1 actúa como un condensador ideal, si es 0 se comporta como una resistencia y si es -1 se comporta como una inductancia.

Elementos Warburg

Los elementos de Warburg (W) representan el retraso que surge de la difusión de la especie electroactiva al electrodo.

La difusión da lugar a una impedancia que depende de la frecuencia del potencial de la perturbación. Se define como [15], [33]:

Ecuación 15: Impedancia cuando existe difusión. Elemento Warburg.

$$Z_{W_s} = \frac{W_R \tanh(j\omega W_c)^{W_N}}{(j\omega W_c)^{W_N}}$$

W_R , W_c , W_N son los parámetros para definir este elemento.

En el diagrama de Nyquist cuando se produce la difusión aparece una línea con un ángulo en torno a 45°. La imagen de la Ilustración 6 muestra un ejemplo en el que se puede apreciar este efecto [15]. En la región de baja frecuencia aparece la línea recta que indica un proceso gobernado por la difusión.

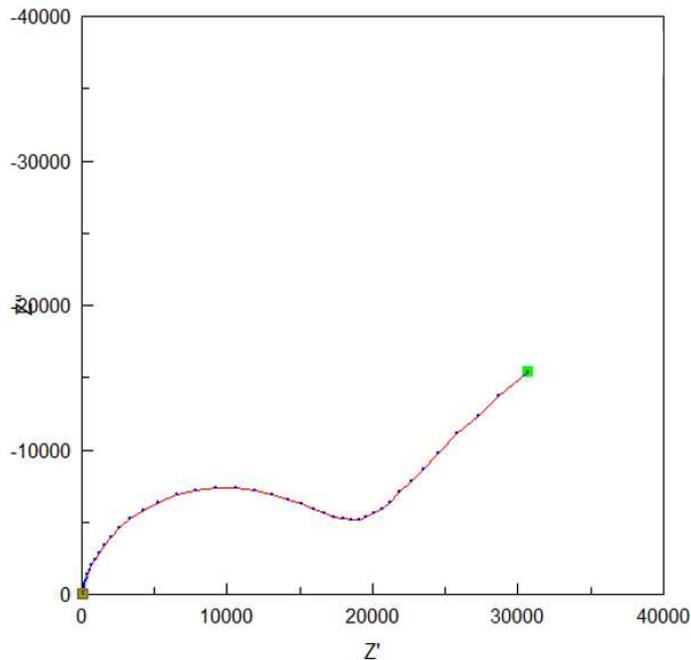


Ilustración 6: Diagrama de Nyquist. Efecto Warburg



2.4 Biosensores electroquímicos

Pese a las grandes ventajas de los sensores electroquímicos estos sistemas presentan todavía algunas limitaciones, como por ejemplo la detección de especies concretas en una disolución. Para superar este obstáculo, alguno de los analitos debe experimentar una reacción que genere iones detectables en una cantidad proporcional a la concentración de este. Una de las mejores opciones para llevar a cabo este proceso es la utilización de biosensores.

La principal diferencia de biosensor en relación con el sensor radica en el receptor de este. En este caso, el receptor va a estar compuesto por un elemento biológico o biomimético, que va a interactuar de forma específica con un elemento de interés. Esta interacción dará lugar a cambios en el pH, en la transferencia de electrones o alteraciones en el potencial de masa, entre otros efectos. Esta respuesta se transformará en una señal electrónica que podrá ser estudiada posteriormente [34].

Los biosensores presentan una alta sensibilidad y selectividad ya que son capaces de interactuar de forma específica con el analito de interés y no con otros de características similares. Además, pueden ser multi-análisis, es decir mediante la colocación de diferentes elementos es posible diferenciar diferentes analitos de forma simultánea. La principal ventaja que presentan por lo tanto los biosensores es su elevada especificidad [35].

Los materiales más utilizados como elementos de reconocimiento en los biosensores son el ADN, las enzimas, los anticuerpos, las células o los tejidos. Destacando entre estos las enzimas que han sido las más utilizadas en el mundo de los biosensores [34].

Enzimas

Las enzimas, catalizadores biológicos o biocatalizadores, son los encargados de acelerar las reacciones químicas en el ámbito biológico. Desde el punto de vista catalítico, las enzimas son más eficaces que los catalizadores no biológicos al disminuir la energía de activación y aumentan la velocidad de reacción sin alterar los productos de reacción [36],[37].

Una de sus principales características es la alta especificidad que presentan, reconociendo únicamente ciertos sustratos. Por ejemplo, la galactosa oxidasa puede oxidar la galactosa, pero no otro tipo de hidrato de carbono [36].

Gracias a ello, las enzimas son capaces de regular su actividad en función de la concentración del sustrato disponible [37].

Las reacciones catalizadas por enzimas se rigen por la cinética enzimática. Cuando se trata de un único sustrato se rigen por el modelo de Michaelis-Menten [38].

Ecuación 16: Expresión de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Donde K_m permite conocer la afinidad entre la enzima y el sustrato. Y V_{max} la velocidad máxima de la reacción enzimática [38].

A continuación, se realiza una breve descripción de las enzimas utilizadas en el presente trabajo [36][37]:

- Ureasa: (Ilustración 7) pertenece al grupo de las hidrolasas. Su función consiste en hidrolizar la urea generando como producto dióxido de carbono y amoníaco. La utilización de esta enzima es debido a que la urea es un componente de la leche. Además, está relacionado con la adulteración de muestras.

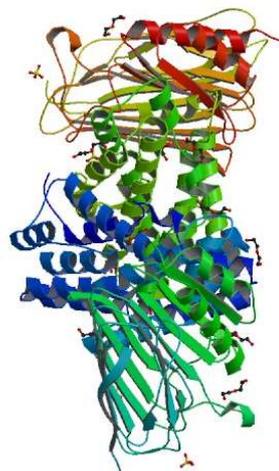


Ilustración 7: Enzima ureasa.

- β -galactosidasas: (Ilustración 8) se encargan de hidrolizar los enlaces galactosídicos beta-1,4. Su actividad enzimática principal consiste en separar el disacárido de la lactosa en galactosa y glucosa. Su utilización es muy importante en el presente trabajo ya que aporta una

valiosa información para diferenciar las leches modificada sin lactosa de otras muestras.

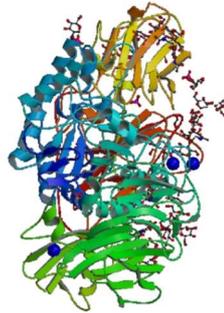


Ilustración 8: Enzima β -galactosidasa.

- Galactosa oxidasa: (Ilustración 9) se encarga de catalizar la oxidación de D-galactosa. Su utilización en el análisis de leche resulta muy interesante ya que en el caso de la leche sin lactosa estas moléculas están presentes en mayor cantidad.

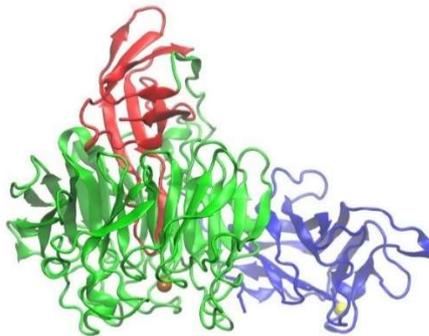


Ilustración 9: Enzima galactosa oxidasa.

- Glucosa oxidasa: (Ilustración 10) pertenece al grupo de las oxidoreductasas. Se encarga de catalizar la oxidación de la glucosa para dar lugar peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -lactona. Su función principal es determinar la cantidad de glucosa presente. Al igual que en el caso anterior, su utilización es muy importante ya que, en la leche sin lactosa, las moléculas de lactosa se han separado en glucosa y galactosa.

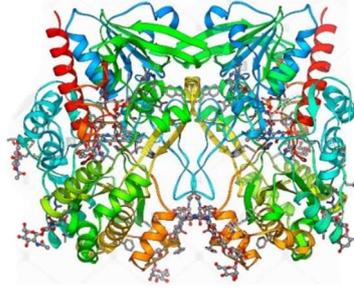


Ilustración 10: Enzima glucosa oxidasa.

- Lipasa: (Ilustración 11) su función principal es catalizar diferentes ácidos grasos. Una característica muy importante de estas enzimas es que son solubles en agua, pero actúan sobre sustratos que no lo son. En la industria alimentaria son muy útiles para realizar estudios sobre la materia grasa de la leche.

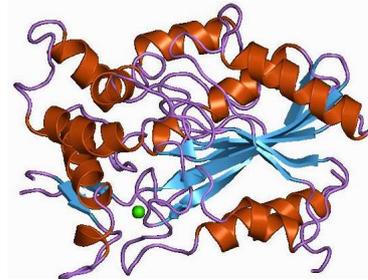


Ilustración 11: Enzima lipasa.

Métodos de inmovilización enzimática

Una de las partes más importantes en los biosensores es la inmovilización del elemento que se utiliza como receptor. A continuación, se comentan las técnicas más empleadas:

- Adsorción física: es de las técnicas más sencillas. El elemento de reconocimiento se une a la matriz mediante interacciones débiles (iónicas, puentes de hidrógeno, Van der Waals) lo que puede provocar un desprendimiento de la enzima en el tiempo [34] [39].
- Entrecruzamiento y enlaces covalentes: son técnicas en las cuales el elemento de reconocimiento se une al electrodo mediante interacciones fuertes. Son técnicas con un coste elevado, que requieren reactivos de difícil manipulación y que pueden inducir cambios conformacionales en las enzimas [34].



- Atrapamiento: al igual que en la adsorción física es una operación sencilla y el elemento de reconocimiento no sufre variaciones. En este caso la inmovilización se produce por una retención física en las cavidades interiores de la matriz. Esta técnica es la utilizada en esta investigación mediante la adición de nafion [34] [39].

2.5 SENSORES Y BIOSENSORES MODIFICADOS CON NANOMATERIALES

En la última década, la nanotecnología se ha implementado en multitud de ramas de la Ciencia incluido en el desarrollo de sensores y biosensores. Se ha comprobado que la utilización de diferentes nanomateriales proporciona propiedades mejoradas respecto a los sistemas de detección tradicionales. El uso de estos materiales hace posibles nuevas aplicaciones en los sensores y biosensores electroquímicos en la industria alimentaria, gracias a su capacidad de aumentar la sensibilidad de los sensores [46]. La modificación de estos sensores se fundamenta en la retención de nanomateriales en la superficie del sensor [40][41].

Se define como nanopartículas a las partículas aislables cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nm. Debido a su pequeño tamaño, se producen fenómenos físicos y electrónicos desconocidos hasta el momento, estableciéndose nuevos métodos de transporte de cargas o transformaciones químicas. Una de las aplicaciones que se encuentra en fase de estudio, es la utilización de nanopartículas de oro o platino en electrodos selectivos de iones ya que se ha comprobado la mejora del rendimiento [40][42].

Además, las nanopartículas metálicas facilitan la inmovilización de biomoléculas en la construcción de biosensores. Esto se debe a la relación que existe entre la superficie y el volumen de las nanopartículas, lo cual da lugar a un aumento de la reactividad superficial puesto que presentan mayor energía libre en la superficie [41].

Por otra parte, estos materiales presentan la capacidad de promover la transferencia de electrones entre el centro activo de las enzimas y el material que compone el electrodo, mejorando la sensibilidad de los biosensores. Por lo tanto, la combinación de nanopartículas metálicas con diferentes enzimas supone un gran avance para el diseño de biosensores [42].

Finalmente, cabe destacar que los materiales nanoestructurados presentan una mayor robustez mecánica; tienen mejor resistencia y estabilidad frente a aquellos que no lo son. Es por todo ello que la utilización de nanomateriales en la construcción de sensores y biosensores ha ganado gran interés en los últimos años [40].



2.6 LENGUA ELECTRÓNICA

El principal objetivo de una lengua electrónica es el análisis de alimentos y/o bebidas para su estudio en conjunto con técnicas estadísticas. En los últimos años, las necesidades de la industria alimentaria han fomentado el desarrollo e implementación de estos sistemas para el análisis de los diferentes productos, debido a su gran contribución en el campo del control de calidad [43].

Las lenguas electrónicas están formadas por un conjunto de sensores combinados con diferentes técnicas quimiométricas. Se fundamentan en el análisis de propiedades físico-químicas y bioquímicas. La red de sensores que conforma la lengua electrónica procesa diferentes señales generando un conjunto de datos los cuales serán tratados estadísticamente con el fin de determinar diferencias entre las muestras estudiadas [44].

Los sensores que componen las lenguas electrónicas presentan baja especificidad, baja selectividad, alta estabilidad y sensibilidad cruzada lo que permite realizar un estudio global sobre los diferentes componentes de una disolución [44].

La utilización de estos sistemas tiene diversas ventajas sobre los métodos tradicionales de análisis. La mayor ventaja reside en el ahorro de tiempo de análisis respecto a las metodologías tradicionales, ya que no requiere de pruebas individuales para cada uno de los parámetros estudiados ni de técnicas complejas como la cromatografía. Al obtener los datos con mayor rapidez los errores pueden ser corregidos rápidamente, lo que a su vez supondrá un ahorro económico para la industria. Otra de sus ventajas, es la posibilidad de incorporar estos sistemas a una línea de producción o bien su fácil modificación para elaborar sistemas portátiles[45].

Por tanto, las lenguas electrónicas son una excelente herramienta en el control de calidad de alimentos, especialmente en aquellos casos en los cuales se analiza información de carácter cualitativo o semicualitativo [46].

Los diferentes tipos de lenguas electrónicas dependen del tipo de sensores que las forman y los métodos de transducción empleados en la adquisición de datos. Los sensores más utilizados en el desarrollo de lenguas electrónicas son los sensores químicos, entre los cuales destacan los sensores electroquímicos. Algunas de las técnicas más utilizadas son la voltimetría y potenciometría; del mismo modo, también se han desarrollado lenguas electrónicas basadas en espectroscopía de impedancias, aunque se trata de sistemas todavía en estudio [45].



En los últimos años la elaboración de lenguas electrónicas para la industria alimentaria se ha llevado a cabo mediante la implementación de sensores electroquímicos. Estos sistemas se han desarrollado pensando en la discriminación y clasificación de diferentes productos como pueden ser el vino, la cerveza, la miel o la leche entre muchos otros. En estos trabajos, se han desarrollado principalmente lenguas electrónicas voltamétricas y potenciométricas, muestras que las lenguas electrónicas impedimétricas se encuentra aún en fase de estudio y expansión [46].

Dentro de la industria láctea, las lenguas electrónicas se han aplicado con la intención de analizar diversos parámetros de calidad, tales como adulteraciones de muestras o contaminaciones microbiológicas entre otras. Por ejemplo, en 2009, en Portugal un estudio permitió reconocer estándares básicos de sabor con una alta sensibilidad a las sustancias de sabor ácido, salado y umami. Este mismo sistema, fue capaz de determinar la presencia de adulteraciones en la leche de cabra con leche de vaca [44].

Esta nueva metodología supone por tanto una alternativa a los métodos analíticos clásicos utilizados para detectar adulteraciones en la leche caprina siendo un procedimiento más sencillo, rápido y económico. Además, el sistema desarrollado fue capaz de establecer modelos de clasificación con precisiones superiores a las obtenidas en trabajo previos [47].

Del mismo modo en el grupo de investigación UvaSens se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la aplicación de lenguas electrónicas a la industria láctea. Uno de los más recientes es el desarrollo de una lengua electrónica potenciométrica portátil. Se analizaron parámetros de calidad de muestras de leche con diferente contenido en materia grasa (desnatada, semidesnatada y entera) y con diferente contenido nutricional. El sistema constaba de una matriz simplificada de cinco sensores basados en membranas de PVC, acoplados a un registrador de datos. La lengua electrónica desarrollada fue capaz de discriminar entre muestras de leche, establecer modelos de clasificación con precisiones del 96% e incluso establecer modelos predictivos para la determinación de parámetros fisicoquímicos en futuras muestras [48].

En el caso del presente trabajo, actualmente hay pocos estudios sobre la utilización de la espectroscopía de impedancias en el análisis de leche. Un ejemplo de la aplicación de este sistema es el trabajo desarrollado por S. Shrikrishnan y V. Lakshminarayanan en India, en el cual se demostró como la leche puede actuar como medio electrolítico para estudiar procesos electroquímicos en ausencia de cualquier electrolito de soporte, combinando técnicas voltamétricas con espectroscopía de impedancias. El estudio



demonstró el gran potencial de desarrollar nuevas técnicas innovadoras basadas capaces de combinar técnicas electroquímicas capaces de estudiar varios aspectos de la leche de manera paralela [7].

Los avances en esta área han sido muchos, pero aún hay que superar diferentes problemas como la baja sensibilidad a compuestos orgánicos de los sensores, o la baja estabilidad de los sistemas a largo plazo.

2.7 TRATAMIENTO DE DATOS (PCA Y PLS)

2.7.1 PCA

El análisis por componentes principales (PCA) es una técnica en la que los datos se proyectan a un espacio de menor dimensión que el original. Esta situación produce una reducción de la dimensionalidad [49].

Una de las principales características que presentan la técnica de PCA es que la estructura de correlación de las variables se conserva. Esta técnica es de las más usadas para obtener información sobre la variabilidad de los datos tratados [50].

Este mecanismo es muy útil para conocer las variables responsables de los fallos o aquellas variables que se ven más afectadas por estos fallos [51].

Para poder calcular el modelo PCA se necesita un conjunto de datos representativo de las muestras que se quieren estudiar. Para ello se realiza un pretratamiento de datos. Consiste en eliminar las variables que tienen errores en la medida ya que posteriormente serán tratadas como “outliers”. Otro factor para tener en cuenta es el escalado para poder asegurar que cada variable tiene el mismo peso [50].

2.7.2 PLS

La regresión de mínimos cuadrados (PLS) es una técnica de análisis multivariante. Consiste en reducir las variables a un conjunto de componentes más reducido que no tienen correlación entre sí. De esta manera se realiza la regresión de mínimos cuadrados sobre estos datos en vez de utilizar los valores originales [50].

Realizar este análisis es muy útil cuando el conjunto de datos es muy colineal. Este método es utilizado para crear modelos de predicción con los datos



obtenidos en las medidas realizadas y los parámetros químicos aportados [52].

La regresión PLS se utiliza principalmente en las industrias química, de medicamentos, de alimentos y de plásticos [52].



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





CAPÍTULO III: REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS





3. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS

3.1 Reactivos empleados

Para la realización de este trabajo se utilizan los siguientes reactivos:

- $K_4[Fe(CN)_6]$, hidrato de ferrocianuro (III) (contiene un 99.99% de metales básicos, Sigma-Aldrich, CAS Number: 14459-95-1).
- $K_3[Fe(CN)_6]$, potasio hexacianoferrato (III) (Panreac Química SA, CAS Number: 0137476-66-2)
- $NaBH_4$, borohidruro de sodio (pureza mínima 98%, Alfa Aesar, CAS Number: 16940-66-2)
- $AgNO_3$, nitrato de plata (Sigma-Aldrich, CAS Number: 7761-88-8).
- Nafion® solución de resina perfluorada (contiene entre un 15 y un 20% de agua, Sigma-Aldrich, CAS Number: 31175-20-9).
- Agua desionizada Milli-Q de conductividad 18,2 M Ω -cm.
- KOH, hidróxido potásico (pureza mínima 85%, Merck Darmstadt, CAS Number: 1310-58-3).
- NaH_2PO_4 , fosfato sódico (pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-80-7).
- Na_2HPO_4 , fosfato disódico (pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-79-4).
- $CO(NH_2)_2$, urea (Sigma-Aldrich, CAS Number: 57-13-6).
- $C_6H_{12}O_6$, D-(+)-Galactosa (pureza mínima 99 %, Amresco, CAS Number: 59-23-4).
- $C_{12}H_{22}O_{11}$, lactosa (Sigma-Aldrich, CAS Number: 63-42-3).
- $C_6H_{12}O_6$, Alpha-D-(+)-Glucosa (Sigma-Aldrich, CAS Number: 492-62-6).
- $C_{15}H_{26}O_6$, Tributirina (triglicérido, Sigma-Aldrich, CAS Number: 60-01-5).



- Enzima ureasa, (obtenida de *Canavalia ensiformis* (Jack vean), actividad enzimática 63163 ud/g sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number:9002-13-5)
- Enzima galactosa oxidasa, GaOx (obtenida de *Dactylium dendroides*, actividad enzimática mínima 3000 ud/g sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number:9028-79-9)
- Enzima glucosa oxidasa, GOx (tipo X-S, obtenida de *Aspergillus niger*, liofilizada aproximadamente 75% proteína, actividad enzimática 147000 ud/g sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number:9001-37-0)
- Enzima β -galactosidasa (obtenida de *Aspergillus oryzae*, actividad enzimática 10.9 ud/mg sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number:9031-11-2)
- Enzima Lipasa (obtenida por *Candida rugosa*, Sigma-Aldrich, CAS Number:9001-62-1)
- Muestras de leche, de la marca Pascual:
 - Clásicas: desnatada, semidesnatada y entera.
 - Sin lactosa: desnatada, semidesnatada y entera.
 - Con calcio y vitamina D: desnatada, semidesnatada y entera.

3.2 Materiales

En este apartado se nombran todos los materiales utilizados:

- Cubeta de cuarzo (10 mm × 10 mm).
- Vidrio de reloj.
- Espátula.
- Vaso de precipitados.
- Matraz aforado de diferentes volúmenes.



- Micropipetas.
- Pipetas de plástico.
- Pipeta de cristal.
- Agitador.
- Eppendorf.
- Gradilla.
- Electrodo interdigitado de la marca comercial “Micrux technologies” IDA6.Au.
- Celda comercial de “Micrux technologies”.

3.3 Equipos empleados

- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japón).
- Potenciostato/Galvanostato modelo AUTOLAB
- Potenciostato/ Galvanostato Modelo 273A (Princeton Applied Research).
- Analizador de impedancias SOLARTRON 1260



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”







CAPÍTULO IV: DESARROLLO EXPERIMENTAL



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo se divide en dos partes. En la primera se estudia la caracterización y acondicionamiento de sensores impedimétricos comerciales para conocer su funcionamiento en muestras de leche. A partir de la caracterización de los sensores se eligió un sensor para su posterior modificación. La segunda parte de este trabajo se centra en la modificación de un sensor comercial mediante la inmovilización de nanopartículas de plata y diferentes enzimas dirigidas contra productos de interés en leche; dando lugar a una red de biosensores que se caracterizará analizando disoluciones patrón de interés.

Por último, se utilizará esta red de biosensores para analizar distintos tipos de leche. Con todos estos datos se procederá a realizar un análisis estadístico para poder determinar si la lengua electrónica desarrollada es capaz de discriminar entre diferentes muestras de leches.

4.1 PREPARACIÓN DE LA RED DE SENSORES

- Tipos de sensores utilizados

Para la realización de este trabajo se han utilizado sensores comerciales de la marca “Micrux Technologies”. Disponen de dos tipos de sensores disponibles.

En primer lugar, se encuentran, los mostrados en la Ilustración 12, los sensores IDE (electrodos interdigitados), están formados por dos electrodos interdigitados independientes. Estos sensores tienen una dimensión de: 10 x 6 x 0.75 mm, el sustrato del que se componen es vidrio y la capa aislante es resina EPON SU8. La celda electroquímica tiene un diámetro de 3.5 mm [31].

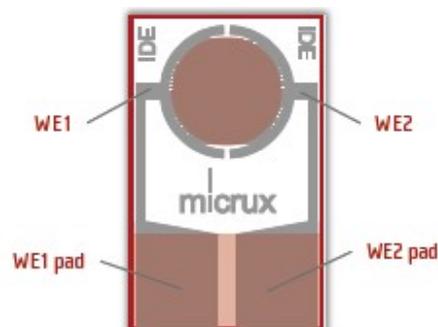


Ilustración 12: Esquema de un sensor con dos electrodos.

Se disponen de los siguientes tipos de sensores, los cuales se diferencian en la relación entre el tamaño de la pista y su separación, y el material del que están contruidos [31]:

- IDE 1 Au/ IDE 1 Pt: se componen de 10 μm de pista y 10 μm de separación entre ellas.
- IDE 2 Au/ IDE 2 Pt: en este caso la pista sigue siendo 10 μm , pero la separación entre ellas es de 5 μm .
- IDE 3 Au/ IDE 3 Pt: en estos sensores la pista es de 5 μm y están separados 15 μm .

En segundo lugar, se muestra en la Ilustración 12 los sensores IDA (array interdigitado de microelectrodos). Este tipo de sensores están compuestos por cuatro electrodos, de los cuales dos electrodos son de trabajo, otro es el contraelectrodo y por último se tiene un electrodo de referencia [32].

La dimensión, el material del sustrato y la capa aislante que los componen son igual que en los IDE. La única diferencia entre ellos es el diámetro de la celda electroquímica que en este caso es de 2 mm [32].

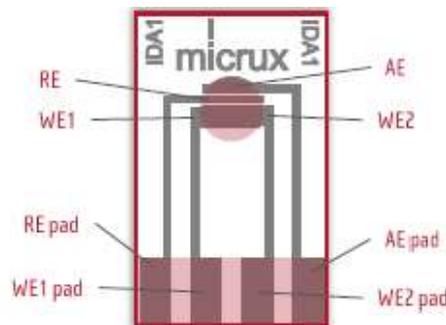


Ilustración 13: Esquema de un sensor con 4 electrodos.

Los sensores IDA utilizados al igual que los IDE se diferencian en la relación entre el tamaño de la pista y su separación, así como en el material [32]:

- IDA 1 Au/ IDA 1 Pt: están formados por 10 μm de pista y 10 μm de separación entre ellas.
- IDA 5 Au/ IDA 5 Pt: al igual que en los sensores anteriores la pista sigue siendo 10 μm , pero la separación entre ellas es de 5 μm .
- IDA 6 Au/ IDA 6 Pt: la pista en este caso es de 5 μm y están separados 15 μm .

Construcción de los biosensores

De entre los sensores comerciales se seleccionó el sensor IDA 6 en oro para su posterior modificación.

Los sensores fueron modificados con nanopartículas de plata y diferentes enzimas (galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ureasa y lipasa).

- Preparación de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata se obtienen siguiendo el método Creighton [55]. Se tiene un agente precursor, el cual es el nitrato de plata y se reduce con borohidruro de sodio. Este método es el más utilizado en la actualidad ya que se obtienen nanopartículas muy homogéneas. La reacción que se da es:

Ecuación 17: Reacción producida de las nanopartículas de plata.

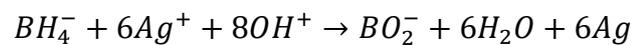


Ilustración 14: Reactivos utilizados para la creación de nanopartículas de plata.

En la Ilustración 14 se pueden ver los reactivos utilizados. Se comienza preparando las dos disoluciones; de borohidruro de sodio, $NaBH_4$ 2mM y la de nitrato de plata, $AgNO_3$ 1mM. Ambas se disuelven con agua desionizada Milli-Q. Una vez que se tienen preparadas ambas disoluciones, los matraces se envuelven con papel de aluminio, ya que los reactivos pueden estropearse con la luz.

El siguiente paso es colocar en un agitador magnético un recipiente con hielo porque la mezcla tiene que ser en frío. En un Erlenmeyer se vierten 30 mL de borohidruro de sodio y se comienza a agitar. De la disolución de nitrato de plata se necesitan 10 mL, los cuales se añaden gota a gota con pipeta. Según se va añadiendo, el color va cambiando de transparente a amarillo. Cuando se termina de echar el nitrato de plata se deja de agitar. En este trabajo las nanopartículas se utilizan diluidas con agua, es muy

importante mantenerlas tapadas con papel de aluminio como se ha hecho antes con las disoluciones ya que son fotosensibles y con la luz se oxidan. Si pasa esto el color amarillo tan característico que tienen va oscureciéndose por el óxido, se pierden las propiedades y el tamaño deja de ser uniforme. En la Ilustración 15 se puede ver el color tan característico de las nanopartículas de plata que se ha comentado anteriormente.



Ilustración 15: Aspecto de las nanopartículas de plata.

Para comprobar que las nanopartículas han salido correctamente se realiza un espectro ultravioleta (Ilustración 16). La siguiente ilustración muestra el espectro que se ha realizado, cuanto más estrecho es el pico más regular es la forma de las nanopartículas. El plasmón de plata aparece de 450-400 nm, con lo cual se puede afirmar que las nanopartículas han salido correctamente.

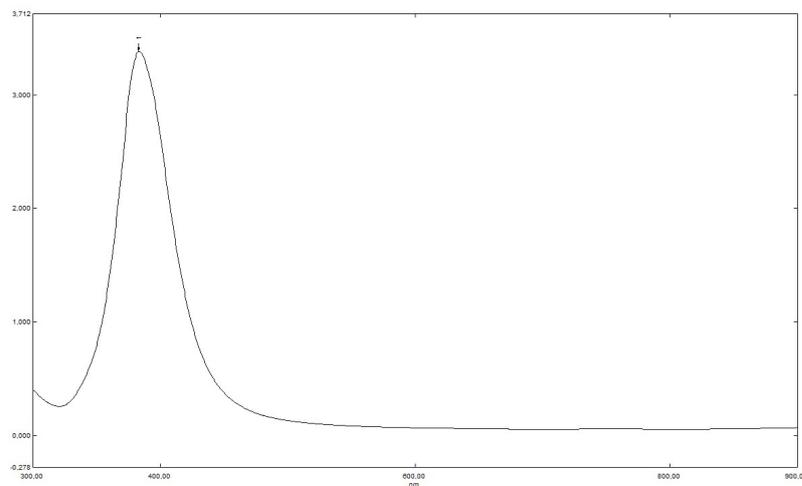


Ilustración 16: Espectro realizado a las nanopartículas de plata.

Modificación de los sensores

Una vez sintetizadas las nanopartículas de plata se procede a depositarlas en la superficie del electrodo. Su deposición se realiza mediante la técnica de dropcasting. La cual consiste en colocar un volumen determinado de la preparación en la superficie del electrodo y esperar a que el solvente se evapore dejando en la superficie las nanopartículas.

Además, debido a que las nanopartículas de plata son solubles en agua es necesario inmovilizarlas en la superficie del electrodo. Para ello se coloca una capa de nafion que impide la difusión de las nanopartículas durante la toma de medidas.

En este trabajo se utilizaron tres volúmenes distintos de nanopartículas en la modificación de los sensores: 20, 30 y 40 microlitros. Una vez colocadas las nanopartículas se procede a colocar las enzimas.

La lengua impedimétrica la componen 6 sensores, uno de ellos únicamente lleva nanopartículas de plata, y todos los demás llevan una enzima cada uno. Las enzimas que se utilizan son ureasa, glucosa oxidasa, beta galactosidasa, galactosa oxidasa y lipasa. Todas ellas con una concentración de 5mg/ml.

Se colocaron 20 microlitros de cada enzima en cada uno de los sensores. Posteriormente, se inmovilizó la enzima mediante una capa de nafion.

En total la red de sensores estará compuesta por 6 sensores. La siguiente tabla (Tabla 3) muestra los sensores desarrollados que se utilizan en la lengua electrónica impedimétrica. Los nombres que se muestran hacen referencia al tipo de sensor utilizado, y las diversas capas que lo componen.

Tabla 3: Sensores que conforman la lengua electrónica.

SENSORES	DEFINICIÓN
<i>IDA6 AU_AgNPs_nafion</i>	Sensor IDA 6 de oro con nanopartículas y nafion.
<i>IDA6 AU_AgNPs_GAOX_nafion</i>	Sensor IDA 6 de oro con nanopartículas, la enzima galactosa oxidasa y nafion.
<i>IDA6 AU_AgNPs_GOX_nafion</i>	Sensor IDA 6 de oro con nanopartículas, la enzima glucosa oxidasa y nafion.
<i>IDA6 AU_AgNPs_UREASA_nafion</i>	Sensor IDA 6 de oro con nanopartículas, la enzima ureasa y nafion.
<i>IDA6 AU_AgNPs_B-GAL_nafion</i>	Sensor IDA 6 de oro con nanopartículas, la enzima β -galactosidasa y nafion.
<i>IDA6 AU_AgNPs_LIPASA_nafion</i>	Sensor IDA 6 de oro con nanopartículas, la enzima lipasa y nafion.

Adquisición de medidas

Para poder realizar los diferentes ensayos y analizar todas las muestras deseadas se utiliza una celda electroquímica de la misma casa comercial que los sensores. Su montaje es muy sencillo, ya que únicamente hay que conectar esta celda a un potencióstato/galvanostato asociado a un módulo de impedancias y ya se puede comenzar el ensayo.

La siguiente ilustración muestra la celda, con el electrodo de medida. Además, aparece la conexión entre el potencióstato y la celda y por último está representado el potencióstato utilizado.

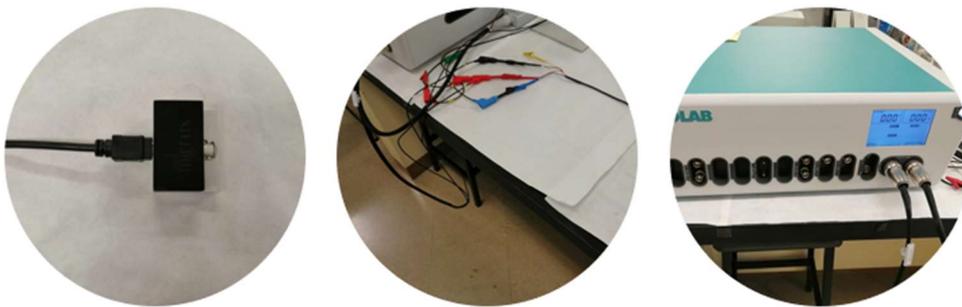


Ilustración 17: Esquema de conexión entre la celda electroquímica y el potencióstato.

Las condiciones en las cuales se realizó la espectroscopia de impedancias fueron:

- Tiempo de estabilización de la muestra sobre el sensor de 10 minutos.
- OCP previo al experimento de 60 segundos.
- Frecuencias: 0,1 Hz - 10^5 Hz
- Intensidad: 10 mA

4.2 DISOLUCIONES Y MUESTRAS ANALIZADAS

- DISOLUCIÓN DE FERROCIANURO FÉRICO

Esta disolución se obtiene a partir de la mezcla de $K_4[Fe(CN)_6]$, hidrato de ferrocianuro (III) con potasio hexacianoferrato (III) $K_3[Fe(CN)_6]$. Para conseguir una disolución con una concentración de 5mM se han pesado 0.5280g de $K_4[Fe(CN)_6]$ y 0.4116g de $K_3[Fe(CN)_6]$. La ilustración 18 muestra los reactivos

utilizados. Se utiliza como disolvente agua desionizada. Además, se realizan otras dos disoluciones cuyas concentraciones son de 2.5 mM y 10 mM.

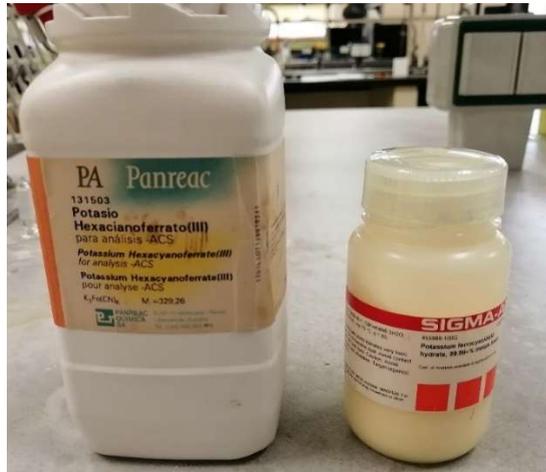


Ilustración 18: Reactivos utilizados para la disolución de ferro-ferri.

- DISOLUCIÓN DE BUFFER FOSFATO

Se prepara a partir de las disoluciones de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 con agua desionizada. Es una disolución reguladora, su propiedad principal es mantener el pH estable. Se va a utilizar para disolver los diferentes azúcares utilizados en el trabajo.

- DISOLUCIÓN KOH

Se prepara una disolución de hidróxido potásico con una concentración de 0.1M. Para ello se pesan 0.5611 g de KOH y se añaden a un matraz aforado de 100 mL el cual se enrasa con agua desionizada.

Ecuación 18: Molaridad de la disolución de KOH.

$$[\text{KOH}] = \frac{0.5611 \text{ g}}{100 \text{ mL}} \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \frac{1 \text{ mol}}{56.156 \text{ g}} = 0.1 \text{ M}$$

Esta disolución se prepara porque posteriormente se va a utilizar como disolvente para preparar una disolución de urea. Además, a partir de esta disolución se realizan dos diluciones para obtener una concentración de 0.01M y 0.001M.

- DISOLUCIONES PATRÓN

Para conocer el funcionamiento de los sensores modificados con las diferentes enzimas y entrenar la lengua impedimétrica para la discriminación de muestras se preparan las disoluciones patrón del sustrato que estas reconocen.

En el caso de la galactosa, lactosa y glucosa se pesa la cantidad correspondiente para obtener las concentraciones deseadas y se disuelve con buffer puesto que son azúcares. En cambio, en la preparación de urea el disolvente utilizado es hidróxido potásico (KOH).

Para la preparación de la disolución tributirina únicamente se realizó para una concentración de 0.1 M. El disolvente que se utilizó fue el metanol. Se utiliza un disolvente orgánico ya que este compuesto es un ácido graso y las moléculas que lo forman tienen una región apolar que no permite su disolución en medios acuosos. La tabla 4 recoge toda la información de las diferentes disoluciones.

Tabla 4: Disoluciones patrón utilizadas.

Nombre	Disoluciones	Concentraciones analizadas
Urea	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0,001M; 0.01M; 0.1M
Lactosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	0,001M; 0.01M; 0.1M
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0,001M; 0.01M; 0.1M
Galactosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0,001M; 0.01M; 0.1M

Muestras de leche analizadas

En el análisis de la capacidad de discriminación de la lengua electrónica entre diferentes tipos de leche en función de su contenido nutricional se utilizaron muestras de nueve tipos de leche (Tabla 4) facilitadas por el grupo de Calidad Pascual.

Con el fin de establecer correlaciones entre los datos experimentales a obtener con la lengua electrónica y las propiedades físico-químicas de la leche, las muestras utilizadas en este trabajo fueron analizadas por los laboratorios de Calidad Pascual. Los resultados de los análisis físico-químicos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de las muestras de leche analizadas.

Muestra	Tipo de leche	Acidez	Densidad	MG (%m)	Prot (%m)	Lact (%m)	E.S.M (%m)	E.S.T (%m)
D	Clásica desnatada	12,65	1033,55	0,32	3,3	5	9,02	9,33
S	Clásica semidesnatada	12,55	1031,6	1,56	3,27	4,91	8,91	10,47
E	Clásica entera	12,17	1029,38	3,56	3,21	4,85	8,78	12,33
DSL	Sin lactosa desnatada	12,67	1033,57	0,31	3,29	0,36	9,02	9,33
SSL	Sin lactosa semidesnatada	12,19	1032,09	1,59	3,31	0,42	8,99	10,57
ESL	Sin lactosa entera	11,98	1029,4	3,59	3,23	0,31	8,82	12,41
DCa	Enriquecida con Ca desnatada	15,82	1039,47	0,29	3,93	5,59	10,51	10,8
SCa	Enriquecida con Ca semidesnatada	16,06	1037,29	1,55	3,9	5,49	10,4	11,95
ECa	Enriquecida con Ca entera	15,86	1035,71	3,55	3,91	5,54	10,45	14

El análisis de cada una de las muestras de leche se realizó por seis veces, de forma que por cada tipo de leche se realizaron cinco medidas para asegurar un número suficiente de muestras para el estudio.



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”







“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





CAPÍTULO V: RESULTADOS



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS SENSORES IMPEDIMÉTRICOS

5.1.1 Primera caracterización de los sensores

Una vez presentados los sensores comerciales en el apartado 4.1, se procede a estudiar su comportamiento. En esta primera parte del trabajo se utilizan todos los sensores que aparecen nombrados en la tabla 6. El objetivo principal es determinar cuáles de todos ellos son los que mejor resultado ofrecen para los productos lácteos en estudio y además conocer si es necesario que la leche reciba algún pretratamiento para facilitar el reconocimiento y la discriminación de los diferentes productos mediante estos sensores.

Tabla 6: Sensores comerciales utilizados.

NOMBRE	DEFINICIÓN
IDE 1 Pt	2 electrodos interdigitados de platino. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 10 μm
IDE 1 Au	2 electrodos interdigitados de oro. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 10 μm
IDE 5 Pt	2 electrodos interdigitados de platino. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 5 μm
IDE 5 AU	2 electrodos interdigitados de oro. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 5 μm
IDE 6 Pt	2 electrodos interdigitados de platino. Pista=5 μm Separación entre las pistas=15 μm
IDE 6 AU	2 electrodos interdigitados de oro. Pista=5 μm Separación entre las pistas=15 μm
IDA 1 Pt	2 arrays interdigitados de platino. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 10 μm
IDA 1 Au	2 arrays interdigitados de oro. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 10 μm
IDA 5 Pt	2 arrays interdigitados de platino. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 5 μm
IDA 5 AU	2 arrays interdigitados de oro. Pista=10 μm Separación entre las pistas= 5 μm
IDA 6 Pt	2 arrays interdigitados de platino. Pista=5 μm Separación entre las pistas=15 μm
IDA 6 AU	2 arrays interdigitados de oro. Pista=5 μm Separación entre las pistas=15 μm

La espectroscopía de impedancias es una de las técnicas analíticas que más información aporta sobre la interacción entre la superficie del electrodo y el medio de ensayo. Se aplica una señal de excitación y permite conocer las cinéticas de la transferencia de carga, así como información sobre las propiedades y estructura de los electrodos.

Para llevar a cabo la caracterización del comportamiento impedimétrico de nuestros sensores es necesario utilizar una disolución electrolítica cuyo comportamiento se encuentre bien estudiado dentro de la espectroscopía de impedancias. En este caso, la disolución electrolítica seleccionada es una disolución de ferro/ferricianuro de potasio. Los iones entrarán en contacto con el electrodo produciendo una transferencia electrónica que será registrada por el equipo. Concretamente, se observará el paso de hierro (II) a hierro (III) y viceversa. Los procesos electrolíticos de este tipo se denominan procesos faradaicos.

En un primer lugar, se analizaron disoluciones de concentración creciente de ferro/ferricianuro de potasio con los diferentes sensores comerciales presentados anteriormente.

Las condiciones de medida en el ensayo de EIS fueron las siguientes:

- Frecuencia: 0,1 Hz – 10^5 Hz.
- Intensidad: 10 mA.
- Impedancias versus OCP. A circuito abierto, es decir sin paso de corriente se comprueba que polarización tiene y respecto a este resultado se corrige cuando se hace la impedancia.

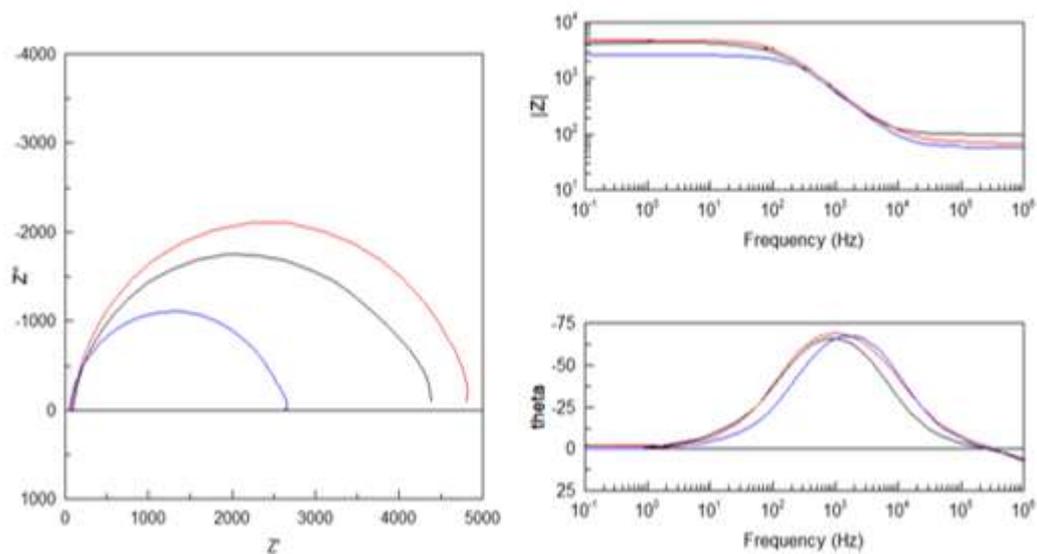


Ilustración 19: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode con una disolución de Ferro-Ferri a diferentes concentraciones en un sensor

de oro IDA 1. Rojo: IDA 1 de oro midiendo una disolución de Ferro Ferri 10 mM; Negro: IDA 1 de oro midiendo una disolución de Ferro Ferri 5 mM. Azul: IDA 1 de oro midiendo una disolución de Ferro Ferri 2.5 mM.

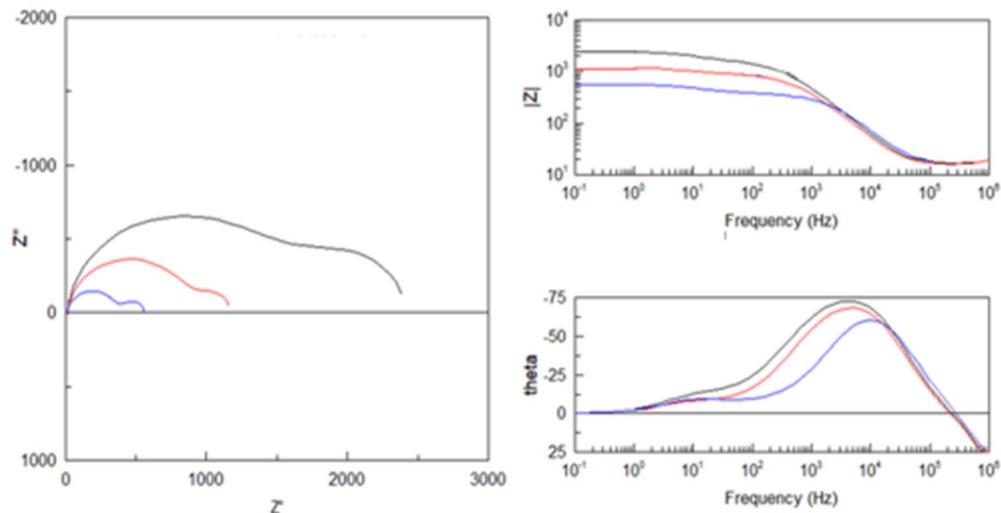


Ilustración 20: Izquierda Diagrama de Nyquist; Derecha Diagrama de Bode con una disolución de Ferro-Ferri a diferentes concentraciones en un sensor de platino IDE 1. Negro: IDE 1 de platino midiendo una disolución de Ferro Ferri 10 mM. Rojo: IDE 1 de platino midiendo una disolución de Ferro Ferri 5 mM; Azul: IDE 1 de platino midiendo una disolución de Ferro Ferri 2.5 mM.

Tomando como ejemplo dos tipos de sensores con configuración y materiales diferentes (Ilustraciones 19-20) se puede observar cómo entre ambos sensores se aprecian grandes diferencias. La principal diferencia radica en el tipo de configuración, aunque también el material del cual está formado el sensor, es decir oro o platino influye también en el comportamiento.

Los sensores de configuración tipo IDE y de platino muestran en el diagrama de Nyquist la aparición de dos semicírculos con un radio menor respecto a la respuesta de los sensores de configuración IDA y de oro, este comportamiento sería debido tanto al material que compone el sensor el cual se encuentra directamente relacionado con la resistencia electrónica al paso de electrones en la superficie del electrodo como al tipo de configuración. Además, aquellos sensores elaborados con el mismo material, pero con diferente configuración, mostraron respuestas diferentes. Por ejemplo, los electrodos IDE mostraron módulos de impedancias más bajos comparados con sus homólogos IDA fabricados con el mismo material. Por otra parte, los sensores nos dan señales claramente diferentes en función de la concentración del analito, en todos los sensores los valores de impedancia real e imaginaria disminuyen al disminuir la concentración del analito.

Por otra parte, en todos los casos independientemente del material y la configuración del sensor a medida que se aumenta la concentración de ferro/ferricianuro de potasio el radio del semicírculo aumenta y el módulo de impedancias en el diagrama de bode se incrementa. Este comportamiento era de esperar ya que la resistencia a la transferencia electrónica aumentará en consecuencia con la concentración.

Una vez que se comprobó el correcto funcionamiento de los diferentes sensores con la disolución patrón, se procedió a analizar muestras reales de leche. Como paso previo al análisis de leche con todos los sensores comerciales, se realizaron diversos pretratamientos a muestras de leche para intentar determinar el tipo de procesado necesario de la muestra que permitía obtener buenos resultados en la espectroscopia de impedancias.

En primer lugar, se efectuaron medidas con la leche sin pretratar, y como puede apreciarse en la Ilustración 21 los diagramas que se obtuvieron mostraron que la señal no era estable lo que impedía extraer información fiable del estudio. Esto es debido a que la leche, aunque contiene electrolitos disueltos no puede considerarse una disolución electrolítica. Además, presenta un problema añadido que es su elevado contenido en materia grasa la cual afecta directamente a la resistencia a la transferencia de electrones.

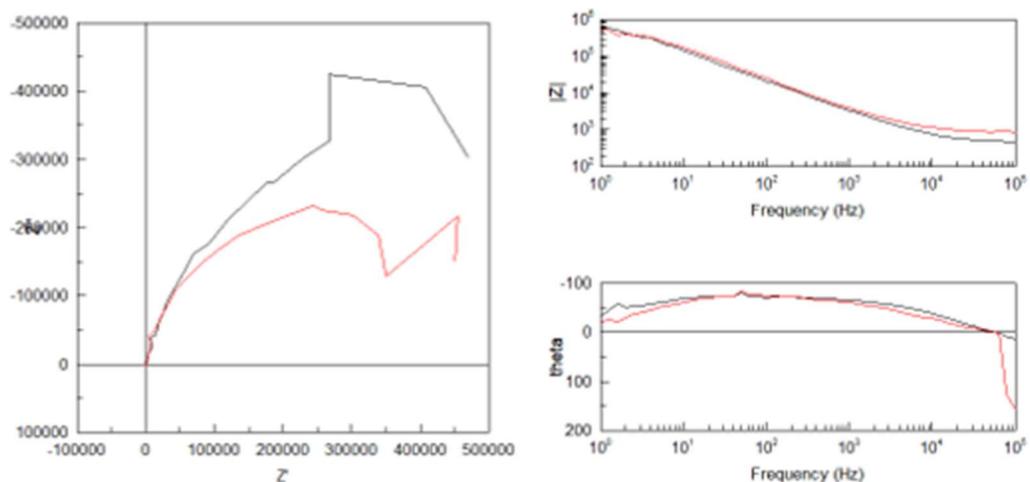


Ilustración 21: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche clásicas sobre un sensor IDA 1 de oro. Negra: Leche clásica entera. Roja: leche clásica semidesnatada.

En la Ilustración 21 se puede apreciar que la señal que da la leche entera tiene mayor radio en el diagrama de Nyquist y un mayor módulo de impedancias en el diagrama de Bode que lo que muestra la leche semidesnatada. Esto es debido a que la leche entera tiene un contenido en grasa mayor, por lo que dificulta la conductividad eléctrica.

Estos resultados mostraron que en el análisis de la leche sin pretratar podrían existir especies como la grasa que impiden que tenga lugar un proceso faradaico y que como resultado da lugar a un gran número de interferencias. Para comprobarlo se diluyó la leche con agua al 50%, 5% y 1%.

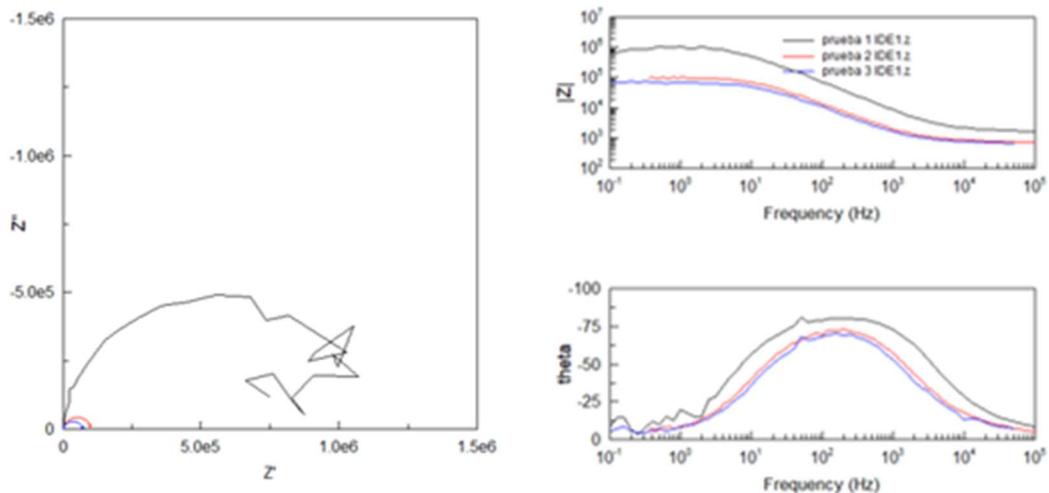


Ilustración 22: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche entera diluidas en diferente proporción de agua sobre un sensor IDA 1 de oro. Negra: Leche clásica entera 50%; Roja: leche clásica entera 5%. Azul: Leche clásica entera 1%.

En la Ilustración 22 se muestra un ejemplo de las tres diluciones de leche en agua realizadas. En todos los casos estudiados se observó que independientemente del sensor utilizado, cuanto menor era la dilución de la leche se obtenían diagramas con un mayor número de interferencias, que dificultaban su estudio. Este resultado apoyaba la idea de que cuanto mayor era el contenido en materia grasa de la muestra existía una mayor dificultad para llevar a cabo el estudio, especialmente a frecuencias altas donde las interferencias eran mayores.

Además, este estudio permitió estudiar como el módulo de impedancias y el radio del semicírculo en Nyquist eran mayores para la leche entera respecto de la leche semidesnatada. Es decir, los sensores fueron capaces de determinar diferencias entre muestras de leche en función de sus características nutricionales, siendo estas diferencias mucho más pequeñas de las esperadas debido a la dilución realizada a la muestra lo que podría suponer un problema para la discriminación entre muestras de leche con pequeñas diferencias.

Por último, se procedió a diluir la leche con ferro/ferricianuro de potasio. Al diluir las muestras de leche en una disolución electrolítica aseguramos la disolución resultante presentará procesos faradaicos que podrán ser estudiados mediante el estudio de impedancias. La gran diferencia respecto a

los pretratamientos anteriores es que en este caso se estudiará como las diferentes muestras de leche modifican la señal característica del ferro/ferricianuro en lugar de analizar directamente la muestra.

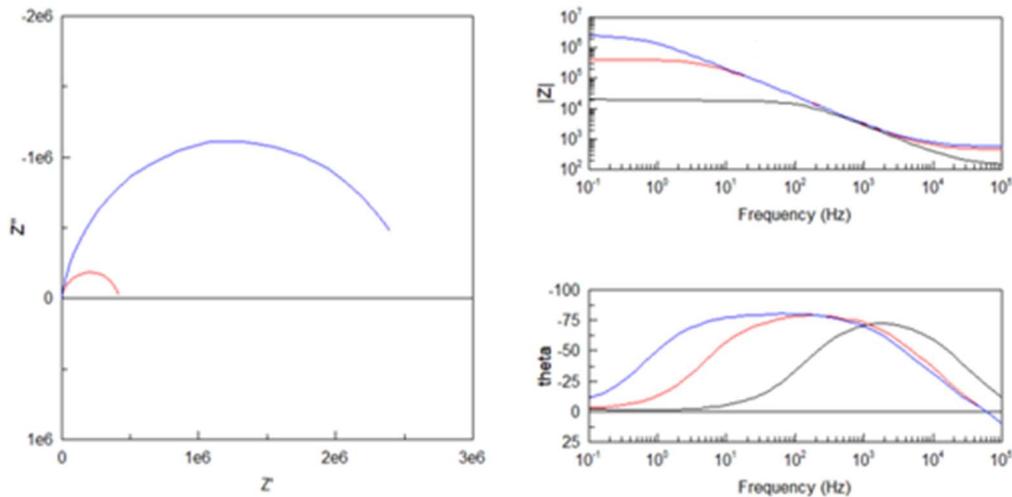


Ilustración 23: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche semidesnatada diluidas en diferente proporción de ferro ferri sobre un sensor IDA 6 de oro. Azul: Leche clásica semidesnatada 75%. Roja: leche clásica semidesnatada 50%. Negra: Leche clásica semidesnatada 25%.

Se prepararon muestras de leche diluidas un 25, 50 y 75% en ferro/ferricianuro para determinar el contenido necesario para obtener una señal estable. Todas las disoluciones preparadas dieron como resultado señales sin interferencias que se distinguían entre si según el grado de dilución (Ilustración 23). Se decidió utilizar leche diluida un 25% en ferro/ferricianuro ya que de esta forma se altera menos la muestra de leche a analizar y se obtiene una señal suficientemente estable.

A continuación, se muestran algunos ejemplos significativos en las ilustraciones 24 y 25 de las diferentes medidas realizadas en nueve tipos de leche con diferente contenido nutricional diluidas en ferro/ferricianuro. Este estudio pretendía comprobar si los diferentes sensores comerciales eran capaces de determinar diferencias entre leches con contenido graso diferente o bien en función de su diferente contenido nutricional (leches sin lactosa, enriquecidas en calcio).

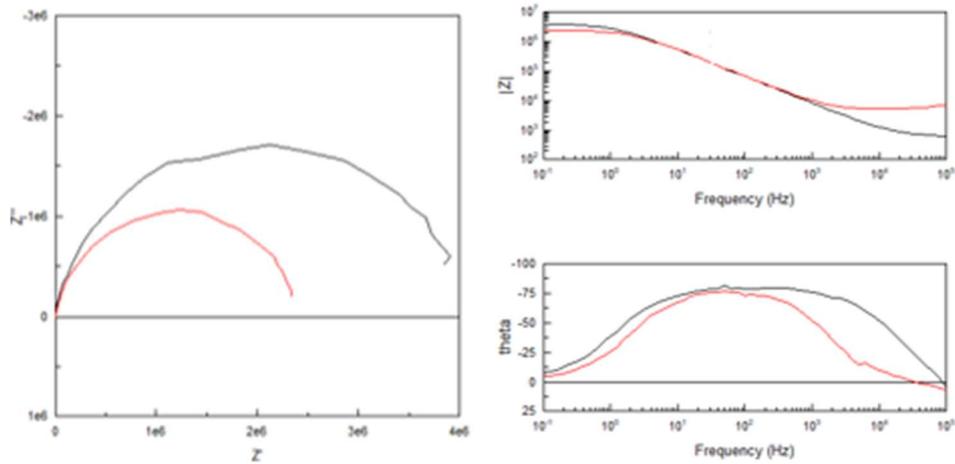


Ilustración 24: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche diluidas con ferro ferri al 25% sobre un sensor IDA 6 de oro. Negra: Leche clásica entera; Roja: leche clásica semidesnatada.

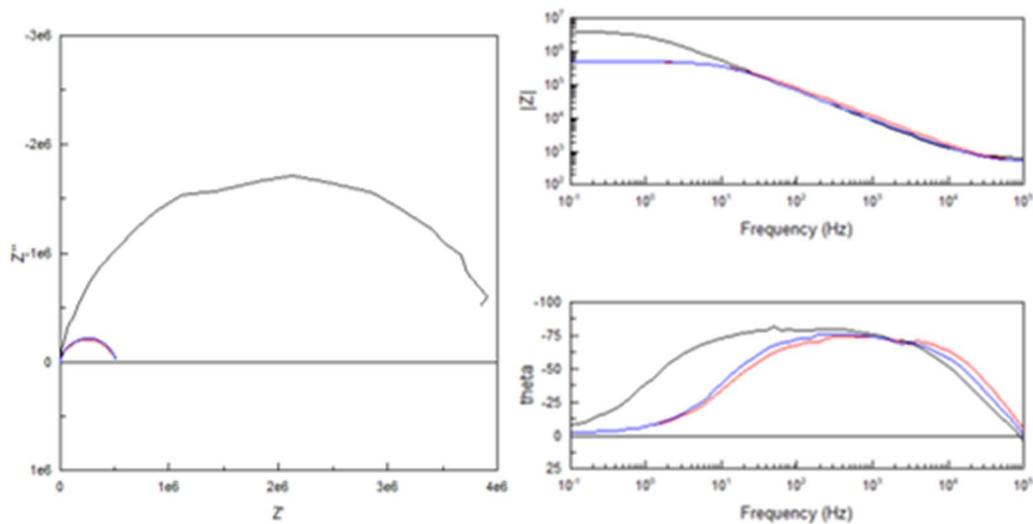


Ilustración 25: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode midiendo diferentes muestras de leche entera diluidas con ferro ferri al 25% sobre un sensor IDA 6 de oro. Roja: leche entera sin lactosa; Negra: leche entera con calcio; Azul: Leche entera clásica.

Observando la Ilustración 25 se puede extraer una conclusión general del estudio de la respuesta de los sensores respecto a los diferentes tipos de leche: en todos los sensores a medida que el contenido en grasa aumenta, el valor del módulo de impedancias crece. Es decir, tal y como se esperaba la grasa de la leche dificulta el transporte de electrones aumentando la resistencia a la transferencia electrónica.

Una vez analizadas todas las muestras de leche con los 12 sensores comerciales se procede a seleccionar aquellos con mayor capacidad de

discriminación. Para ello se realiza un análisis estadístico mediante componentes principales (PCA). En este análisis, la matriz de datos original se construye mediante los datos aportados por los valores del desfase, Z' y Z'' para cinco frecuencias determinadas que corresponden a: 10^5Hz , 10^3Hz , 10^2Hz , 10^1Hz y 0.1 Hz .

La ilustración 26 muestra el diagrama de Scores resultante del análisis por componentes principales de los seis tipos de leche estudiados. Tal y como puede observarse la primera componente (PC1) contiene el 61% de la varianza y la segunda componente (PC2) el 24%. Es decir, en las dos primeras componentes es posible explicar el 85% de la varianza del conjunto original de datos. Además, se puede apreciar como las muestras aparecen ordenadas en función de su contenido nutricional, apareciendo de izquierda a derecha a lo largo de la primera componente en el siguiente orden: leches clásicas, leches enriquecidas en calcio y por último leches sin lactosa. Del mismo modo, puede apreciarse como en el caso de la leche entera y la leche enriquecida con calcio el sistema es capaz de diferenciar entre leches enteras y semidesnatadas.

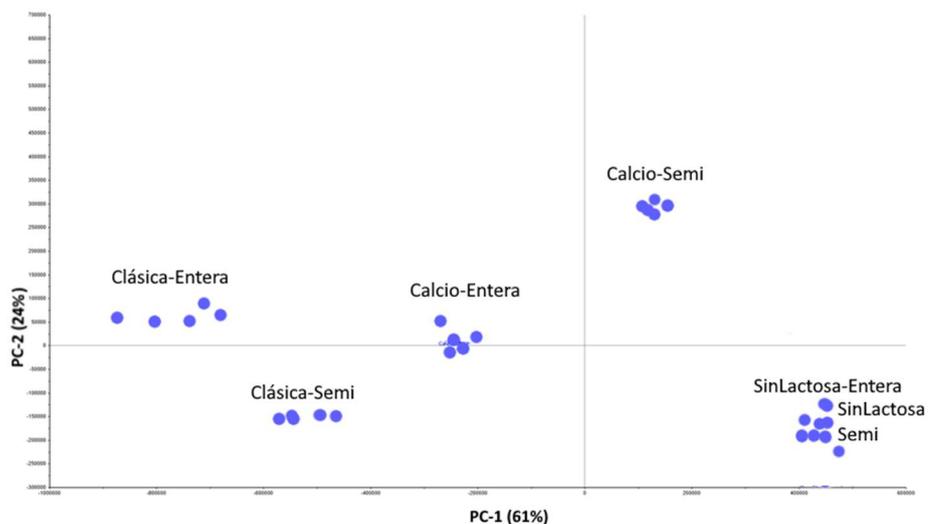


Ilustración 26: Diagrama de Scores realizado con las diferentes muestras de leche diluidas al 25% con Ferro Ferri en los diversos sensores comerciales.

El estudio del diagrama de Scores permite asegurar que la red de 12 sensores impedimétricos fue capaz de discriminar entre las muestras de leche analizadas. A continuación, se procede a analizar el diagrama de Loadings resultante de la PCA; este diagrama nos muestra las variables correspondientes a los diferentes sensores respecto de las componentes principales y la varianza que aportan al sistema. Mediante una correcta interpretación del diagrama de Loadings y su círculo de correlaciones (Ilustración 27) es posible determinar aquellos sensores que aportan más información al sistema y que serán los seleccionados.

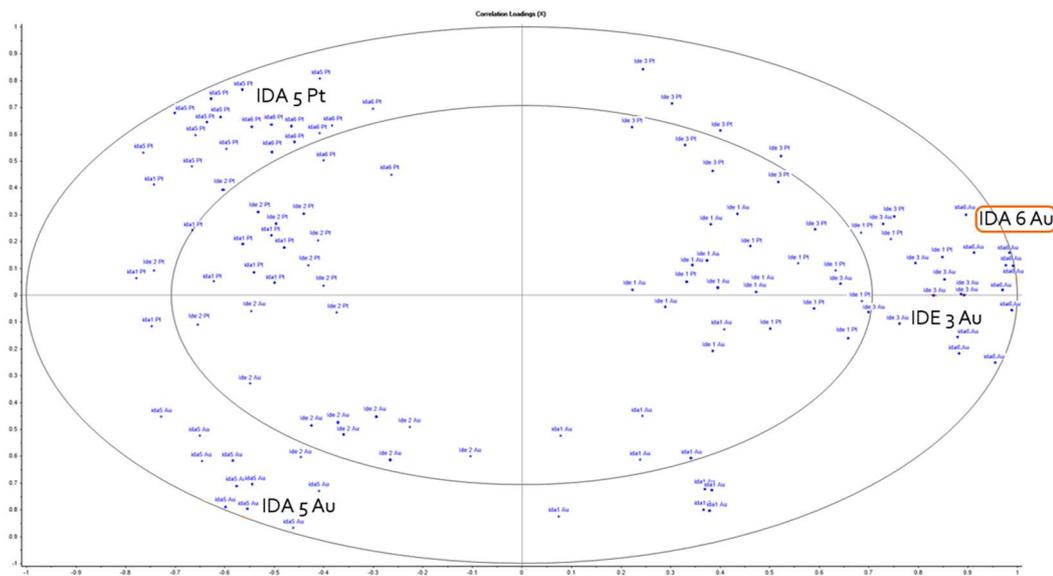


Ilustración 27: Diagrama de correlaciones de los diversos sensores comerciales.

Observando el círculo de confianza del diagrama de correlaciones, Ilustración 27, se puede ver cómo no todas las variables correspondientes a los diferentes sensores se encuentran dentro del mismo. Con la intención de seleccionar un único sensor para su posterior modificación se descartaron todos aquellos sensores fuera del área del círculo de confianza. Esto dio como resultado la selección de cuatro sensores IDA 5 Pt, IDA 6 Au, IDA 3 Au e IDA 5 Au. El segundo criterio de selección empleado fue su distancia al origen del diagrama, la cual se encuentra directamente relacionada con la varianza aportada al sistema y la dispersión de las diferentes variables de cada sensor. Aplicando estos criterios se seleccionó el sensor IDA 6Au, el cual se encuentra dentro del círculo de confianza y además aporta una elevada varianza al sistema.

En el presente trabajo sólo se trabajará a partir de este punto con el sensor IDA 6 Au, el cual se modificará con nanopartículas de plata y enzimas para conseguir mejorar todavía más su capacidad de discriminación. La utilización de nanopartículas en la superficie del electrodo busca aumentar la sensibilidad del sensor. Además, la utilización de enzimas aporta mayor especificidad al sensor ya que sólo actúan sobre su sustrato. Como resultado, se obtendrá una red de sensores a partir del sensor IDA 6 Au sometido a 6 modificaciones distintas.

Construir una lengua bioelectrónica para la discriminación de las diferentes leches es muy buena opción ya que, al tratarse de un medio complejo, un único sensor presentaría poca sensibilidad para establecer discriminaciones

entre muestras. De esta manera, se tienen 6 sensores similares, pero con distinta composición, los cuales proporcionan distintas respuestas entre sí, lo que permite obtener una selectividad cruzada mediante el análisis estadístico posterior.

5.1.2 Modificación y caracterización de los biosensores

Una vez decidido el sensor que se va a utilizar, se proceden a realizar sus diferentes modificaciones. Los sensores modificados obtenidos aparecen agrupados en la tabla 3.

La primera modificación que se realizó fue colocar nanopartículas de plata en la superficie del sensor mediante la técnica de dropcasting. Gracias a las propiedades de las nanopartículas se consigue aumentar la transferencia electrónica lo que conllevará una menor resistencia eléctrica y por tanto una disminución del módulo de impedancias. Esto es beneficioso ya que supone la construcción de un sensor más eficiente que se verá menos influenciado por elementos que puedan aumentar la resistencia a la transferencia electrónica como es el caso de las grasas.

Además de la deposición de nanopartículas, se coloca una capa de nafion sobre el sensor modificado. El nafion es un tipo de polímero que impide que las nanopartículas de plata difundan desde la superficie del electrodo y se disuelvan en las disoluciones analizadas. La Ilustración 28 muestra el efecto que produce utilizar cantidades crecientes de nanopartículas en la modificación del electrodo.

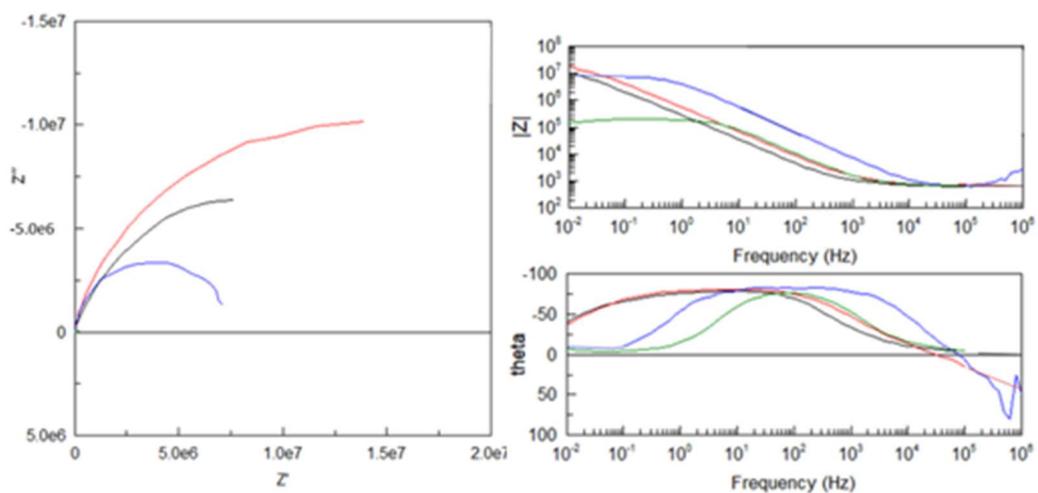


Ilustración 28: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra la señal de Ferro Ferri [5Mm] al utilizar diferente cantidad de nanopartículas de plata en el sensor IDA 6 de oro. Rojo: 20 μ L de



nanopartículas; Negro: 30 μ L de nanopartículas; Verde: 40 μ L de nanopartículas Azul: sin nanopartículas.

Se realizaron diversas pruebas colocando diferentes volúmenes de nanopartículas de plata (AgNPs) con una concentración de aproximadamente 2 mg/ μ L. Las cantidades que se probaron fueron 20, 30 y 40 μ L todas ellas cubiertas posteriormente con una capa de nafion de 10 μ L.

Tomando como referencia la disolución de ferro ferri 5 mM, se puede observar en la Ilustración 28 que en los casos en los que se añaden 20 y 30 μ L de AgNPs el efecto que se produce es totalmente contrario al esperado. En vez de observarse una disminución del módulo de impedancias como consecuencia de la mejora en la transferencia electrónica se observó que el módulo de impedancias aumenta. Esto sería debido a que posiblemente el nafion esté apantallando el efecto de las nanopartículas. Es decir, al colocar una capa de nafion este actúa como aislante dificultando la transferencia electrónica en la superficie del electrodo impidiendo que el efecto de las nanopartículas sea observable. Sin embargo, al colocar 40 μ L de nanopartículas de plata pudo observarse que en este caso el módulo de impedancias si disminuía considerablemente produciéndose el efecto esperado a pesar del apantallamiento que produce la capa de nafion como fijador.

Estos resultados parecen indicar que es necesario colocar una mayor cantidad de nanopartículas de plata para contrarrestar el efecto aislante del nafion.

Otros de los objetivos de este trabajo fue aumentar la selectividad y sensibilidad de los sensores, para ello además de las nanopartículas se utilizan diferentes enzimas. Las enzimas escogidas fueron la ureasa, galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, beta galactosidasa y la lipasa, todas ellas dirigidas a compuestos de interés en la leche. Se construyeron por tanto cinco biosensores en los cuales se combinaron nanopartículas de plata con cada una de las enzimas y nafion para la inmovilización de ambos componentes.

De forma paralela se prepararon biosensores que no habían sido modificados con nanopartículas para intentar identificar un posible efecto sinérgico del nanomaterial y las enzimas.

Para comprobar la capacidad de distinción de los diferentes biosensores se preparan disoluciones patrón (galactosa, lactosa, glucosa, urea y tributirina) a tres concentraciones distintas 0,001M, 0,01M y 0,1M. Estas disoluciones fueron analizadas mediante:

- Sensores sin nanopartículas y con enzima.
- Sensores con nanopartículas (20, 30 y 40 μ L) y con enzima.

A continuación, se muestran como ejemplo las respuestas obtenidas de los biosensores que contienen la enzima galactosa oxidasa. Las conclusiones que se han extraído son aplicables al resto de biosensores desarrollados.

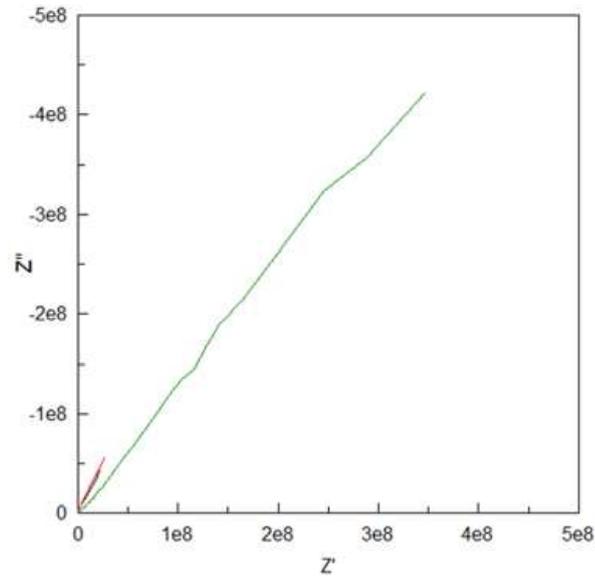


Ilustración 29: Diagrama de Nyquist. Sensor IDA 6 de oro con la enzima galactosa oxidasa con diferentes cantidades de nanopartículas midiendo la señal que aporta la galactosa con una concentración 0.001 M. Rojo: sensor con 20 μL de nanopartículas de plata. Negro: sensor con 30 μL de nanopartículas de plata. Azul: sensor con 40 μL de nanopartículas de plata. Verde: sensor sin modificar.

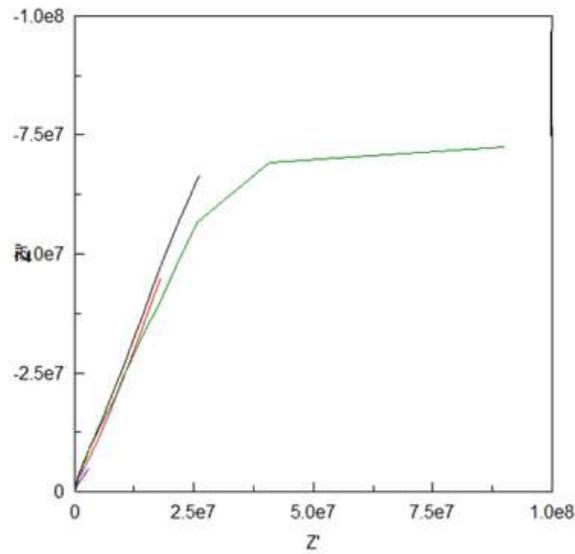


Ilustración 30: Diagrama de Nyquist. Sensor IDA 6 de oro con la enzima galactosa oxidasa con diferentes cantidades de nanopartículas midiendo la señal que aporta la galactosa con una concentración 0.01 M. Negro: sensor con 20 μL de nanopartículas de plata. Rojo: sensor con 30 μL de nanopartículas de plata. Azul: sensor con 40 μL de nanopartículas de plata. Verde: sensor sin modificar.

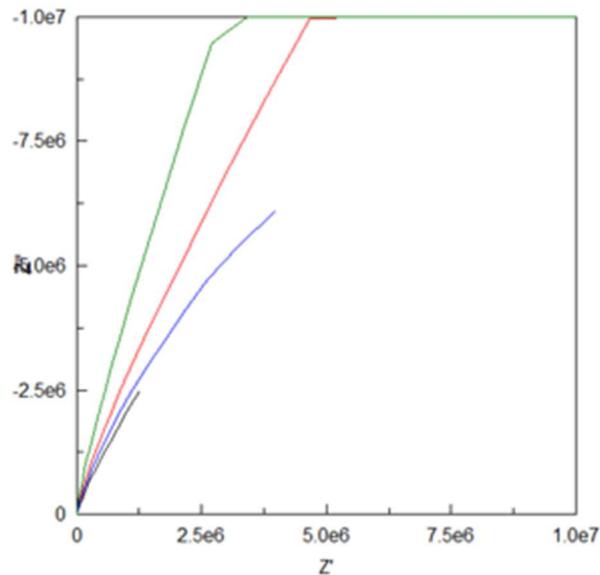


Ilustración 31: Diagrama de Nyquist. Sensor IDA 6 de oro con la enzima galactosa oxidasa con diferentes cantidades de nanopartículas midiendo la señal que aporta la galactosa con una concentración 0.1 M. Azul: sensor con 20 μL de nanopartículas de plata. Rojo: sensor con 30 μL de nanopartículas de plata. Negro: sensor con 40 μL de nanopartículas de plata. Verde: sensor sin modificar.

De las Ilustraciones 29, 30, y 31 se extrae la siguiente información. En primer lugar, cuando los sensores presentan baja cantidad de nanopartículas sucede el efecto descrito anteriormente, el nafion apantalla el efecto de las nanopartículas por lo que el módulo de impedancias no se reduce hasta que se alcanzan los 40 μL de nanopartículas de plata. Además, a concentraciones bajas del analito las enzimas inmovilizadas en el electrodo no se encuentran activas generando respuestas parecidas.

No obstante, si se compara la señal obtenida por un mismo sensor (IDA 6 Au + 40 μL nanopartículas de plata + galactosa oxidasa) a las tres concentraciones estudiadas de la disolución patrón (0.001M, 0.01M y 0.1M), en este caso de galactosa, se observa en la ilustración 32 que la resistencia a la transferencia electrónica y el módulo de impedancias se correlaciona con las concentraciones de las disoluciones y aparecen ordenadas de menor a mayor concentración.

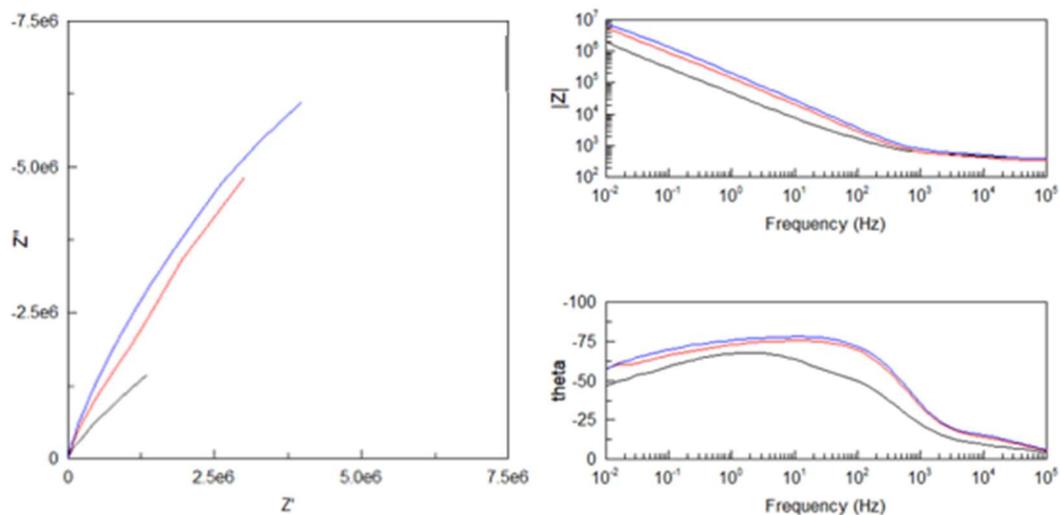


Ilustración 32: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra la señal de galactosa con diferentes concentraciones utilizando 40 μL de nanopartículas plata en el sensor IDA 6 de oro. Negro: galactosa 0.001M Rojo: galactosa 0.01M; Azul: galactosa 0.1M.

El radio del semicírculo en el diagrama de Nyquist aumenta al igual que el módulo de impedancias en Bode a medida que crece la concentración de galactosa. Este comportamiento se repite para las diferentes enzimas en cada una de las disoluciones patrón estudiadas.

Si se compara este resultado con el que se obtendría al comparar la respuesta del sensor sin modificaciones a tres concentraciones crecientes de galactosa (Ilustración 33), se observa que la capacidad de discriminación del sensor es menor y para todas las concentraciones se obtiene un módulo de

impedancias más elevado. Lo que indicaría que tal y como se esperaba uso de nanopartículas favorece la transferencia electrónica, mientras que la enzima galactosa oxidasa aumenta la selectividad del sensor.

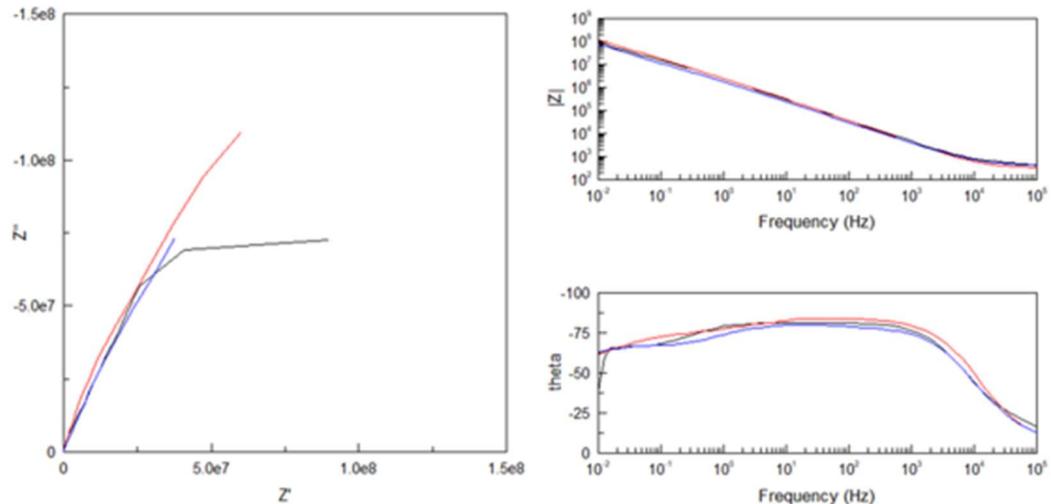


Ilustración 33: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra la señal de galactosa con diferentes concentraciones en el sensor IDA 6 de oro sin modificar. Negro: galactosa 0.001M; Rojo: galactosa 0.01M; Azul: galactosa 0.1M.

Por último, como comprobación de la especificidad de las enzimas se utilizaron los biosensores descritos para analizar disoluciones patrón las cuales no contenían el sustrato enzimático requerido por el sensor. Es decir, tomando como ejemplo el sensor de ureasa se analizaron disoluciones de galactosa, lactosa e hidróxido de potasio; y se compararon con la señal obtenida por el mismo sensor en una disolución de urea en la cual la enzima se encuentra activa. De esta forma se pretende comprobar si la enzima inmovilizada está actuando específicamente sobre su sustrato y como consecuencia se obtienen señales distintas.

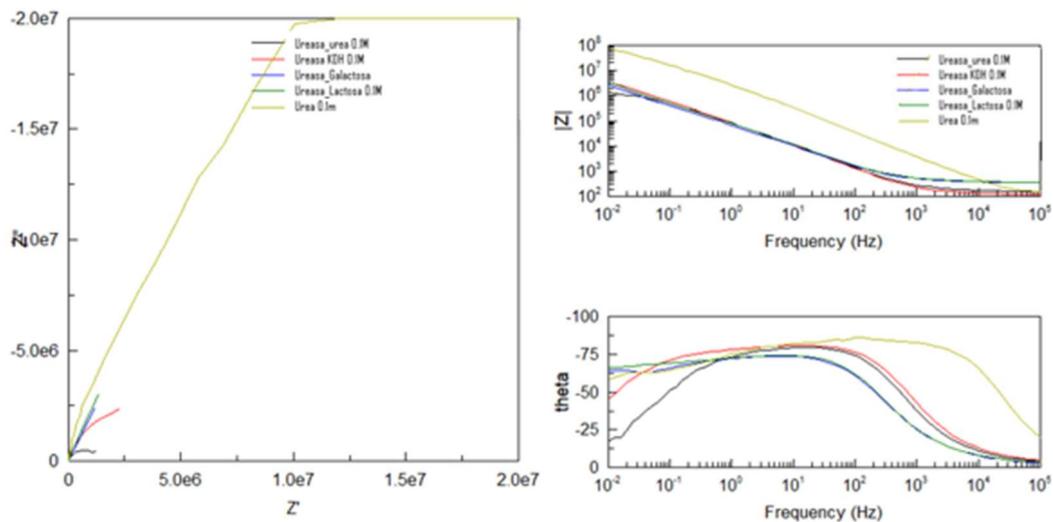


Ilustración 34: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Negra: urea 0.1M. Rojo: KOH 0.1M. Azul: galactosa 0.1M. Verde oscuro: Lactosa 0.1M. Verde claro: sensor sin modificar analizando urea 0.1M.

En la Ilustración 34 se observa el ejemplo propuesto anteriormente junto con la señal original de un sensor sin modificar en una disolución de urea.

La señal con el módulo de impedancias más alto la genera el sensor sin modificar tal y como era de esperar, dado que no presenta ninguna modificación que favorezca la transferencia de electrodos en su superficie. Por otra parte, la señal que se obtiene para las disoluciones de galactosa y lactosa entre si son muy parecidas, pero muy diferentes a la de la urea, esto es debido a que ambas son disoluciones de azúcares mientras que la urea es una base, molecularmente muy diferente a los azúcares. Por último, el biosensor de ureasa presenta un módulo de impedancias más bajo frente a la disolución de urea, lo que podría indicar que la enzima ureasa se encuentra activa y cumple con el objetivo que se pretendía, reducir el módulo de impedancias al aumentar la sensibilidad del sistema.

En el caso de utilizar la glucosa oxidasa como enzima en el biosensor la disolución a la cual irá dirigida la enzima será la glucosa y así ocurrirá respectivamente con el resto de biosensores. En el caso de los diferentes azúcares observamos que existe un comportamiento muy similar entre la glucosa oxidasa y la galactosa oxidasa, esto es debido a que estas enzimas actúan sobre azúcares muy similares entre sí.

Con todo ello se puede decir que los sensores desarrollados son capaces de diferenciar concentraciones crecientes de productos de interés en leche. Además se ha comprobado de forma cualitativa la especificidad de los



biosensores respecto a disoluciones patrón y el aumento de la sensibilidad de los mismos al aumentar el volumen de nanopartículas utilizadas en su preparación y con el uso de enzimas que promueven su especificidad.

5.2.3 Aplicación de la lengua electrónica a muestras de leche

Una vez optimizada la red de sensores que conformarán la lengua electrónica, se comienza a aplicar la red completa al análisis de muestras de leche. Las diferentes muestras de leche analizadas se diferenciaban entre sí en función de su contenido nutricional (leche clásica, leche con calcio y leche sin lactosa) así como según el contenido en materia grasa (leche entera, semidesnatada y desnatada). Todas las muestras se diluyeron en ferro/ferricianuro de potasio tal y como se había establecido en la optimización del sistema, de forma que en este apartado se estudiará como las diferentes clases de leche modifican el comportamiento de esta disolución faradaica.

Utilizando la técnica de espectroscopía de impedancias, se mide la resistencia al paso de corriente eléctrica en la superficie de los sensores. Los resultados que se espera obtener deberían reflejar como en el diagrama de Nyquist el semicírculo más grande corresponde a aquellas muestras de leche que dificulten la transferencia electrónica debido a su composición, lo que a su vez supondrá un mayor valor en el módulo de impedancias.

En primer lugar, se conecta la celda al potencióstato y se evalúa su correcto montaje. Se trabaja siempre siguiendo las mismas condiciones de trabajo para lograr la mayor reproducibilidad y estabilidad en las medidas:

- Tiempo de estabilización de la muestra sobre el sensor de 10 minutos.
- OCP previo al experimento de 60 segundos.
- Frecuencias: 0,1 Hz – 10^5 Hz
- Intensidad: 10 mA

A continuación, se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos del estudio de las 9 muestras de leche agrupados según el tipo de leche estudiada, utilizando como ejemplo el sensor que contiene la enzima glucosa oxidasa.

En primer lugar, se muestra el resultado de la espectroscopía de impedancias de las muestras de leche clásica (Ilustración 35) en las cuales puede observarse como tal y como era de esperar la leche entera tiene un módulo de impedancias más alto respecto a la leche semidesnatada y desnatada. Por otra parte, se observa que la leche semidesnatada y la leche desnatada

tienen un comportamiento mucho más parecido entre sí, lo cual concuerda con su composición nutricional, la leche entera es claramente la que tiene un contenido nutricional más diferente. Hay que señalar que en los diagramas de Bode tanto de módulo como de desfase las diferencias son menores.

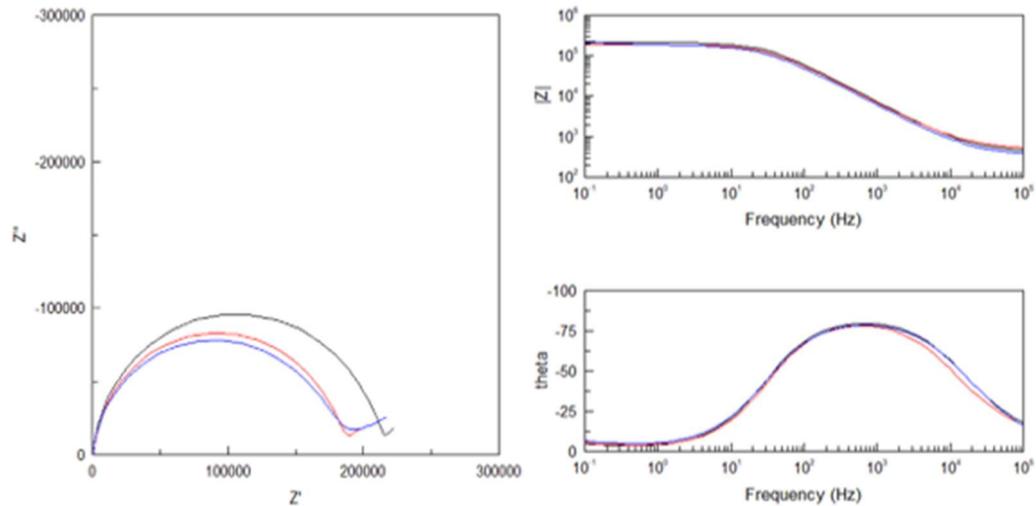


Ilustración 35: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Azul: Leche clásica desnatada. Rojo: Leche clásica semidesnatada. Negro: Leche clásica entera.

A continuación se muestra la respuesta del sensor para el conjunto de las leches sin lactosa (Ilustración 36). En este caso se observa que es la leche desnatada la que muestra un módulo de impedancias mayor, por encima de la respuesta de la leche entera y la semidesnatada, en principio se pensó que pudiera existir un error en la toma de medidas, no obstante se repite el valor obtenido a lo largo de las cinco repeticiones realizadas, lo que parece indicar que en el caso de las leches sin lactosa la leche desnatada es la que presenta un comportamiento más distinto.

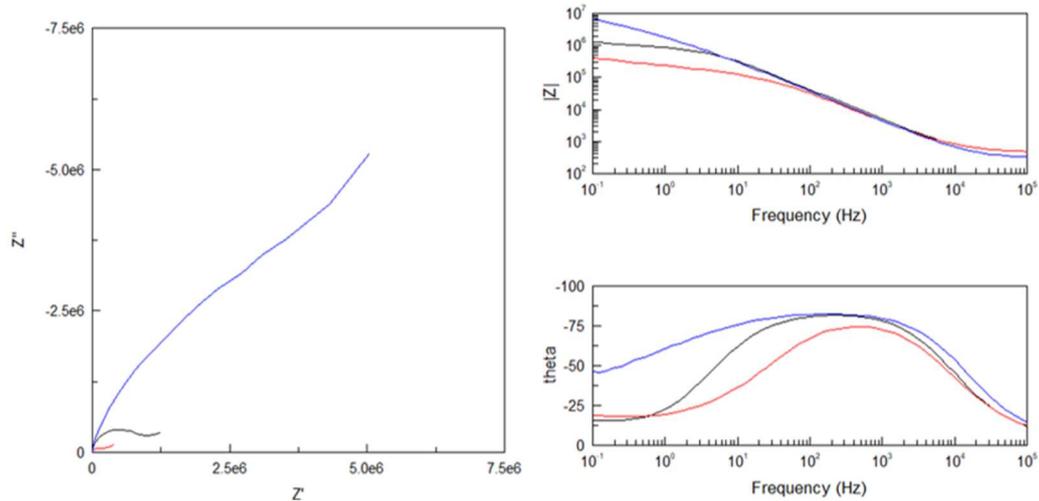


Ilustración 36: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Azul: Leche sin lactosa desnatada. Rojo: Leche sin lactosa semidesnatada. Negro: Leche sin lactosa entera.

Por último, al estudiar las respuestas del sensor a las muestras de leche enriquecidas en calcio (Ilustración 37) se aprecia que, aunque en este caso la leche entera si tiene el módulo de impedancia más alto como ocurre con las leches clásicas, la leche semidesnatada presenta un comportamiento muy similar al de la entera, mientras que la leche desnatada presenta una impedancia claramente menor.

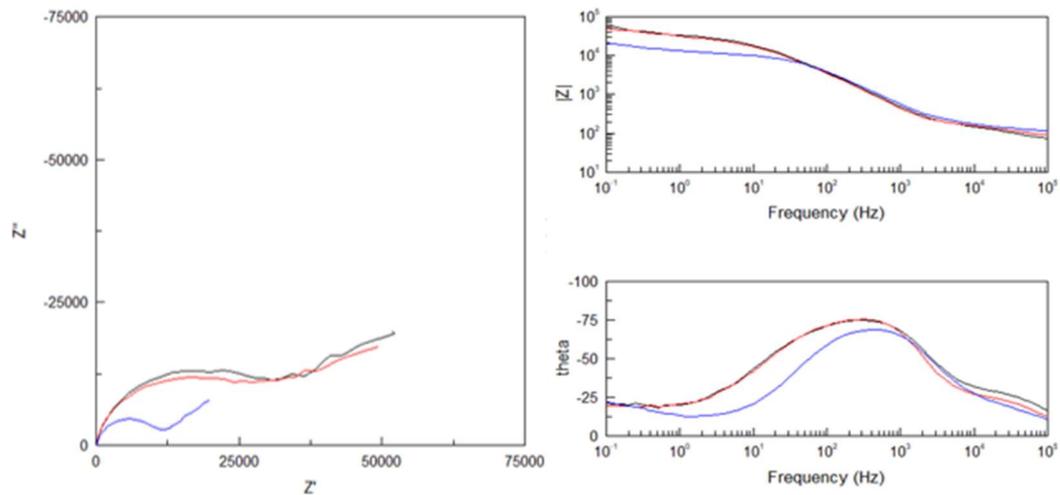


Ilustración 37: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro + 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Azul: Leche con Ca desnatada. Rojo: Leche con Ca semidesnatada. Negro: Leche con Ca entera.



El resultado que se esperaba observar en los diagramas de Nyquist es un módulo de impedancias más alto, y por consiguiente el semicírculo de mayor diámetro, en el caso de las leches enteras, ya que es la de mayor contenido graso, que dificulta la transferencia electrónica. Del mismo modo, el menor módulo de impedancias con un diámetro menor en el semicírculo del diagrama de Nyquist, lo debería ocupar la leche desnatada por tener un menor contenido en grasa y ofreciendo así una menor resistencia a la transferencia de electrones.

El comportamiento de las leches clásicas y de las leches con calcio, reflejan lo esperado, apareciendo la leche entera, semidesnatada y desnatada en orden. No obstante, tal y como se ha descrito anteriormente, cuando se trata de leche sin lactosa este comportamiento no ocurre.

Una posible explicación para este comportamiento, una vez descartado que se trate de un error experimental, son las alteraciones que hubiera podido sufrir la muestra durante el proceso de rotura del azúcar. Para conseguir leche sin lactosa se añade lactasa a la leche durante el procesado, esta enzima es la encargada de romper las moléculas de lactosa en galactosa y glucosa. Puede ser que la muestra medida de la leche desnatada sin lactosa tuviera más contenido en glucosa que la leche entera, y por ello el módulo de impedancias y la resistencia a la transferencia electrónica sean superiores a los de la leche semidesnatada y entera.

Comparando estos resultados con los obtenidos con los otros sensores, se puede observar que no en todos los casos se cumple la hipótesis de partida. Esto podría indicar que existen otros factores a parte el contenido en materia grasa que estén afectando directamente a la espectroscopía de impedancias los cuales se desconocen.

Las siguientes ilustraciones corresponden a la respuesta de los diferentes sensores para todos los tipos de leche. Las ilustraciones 38, 39 y 40 muestran el estudio de las diferentes leches clásicas (desnatada, semidesnatada y entera).

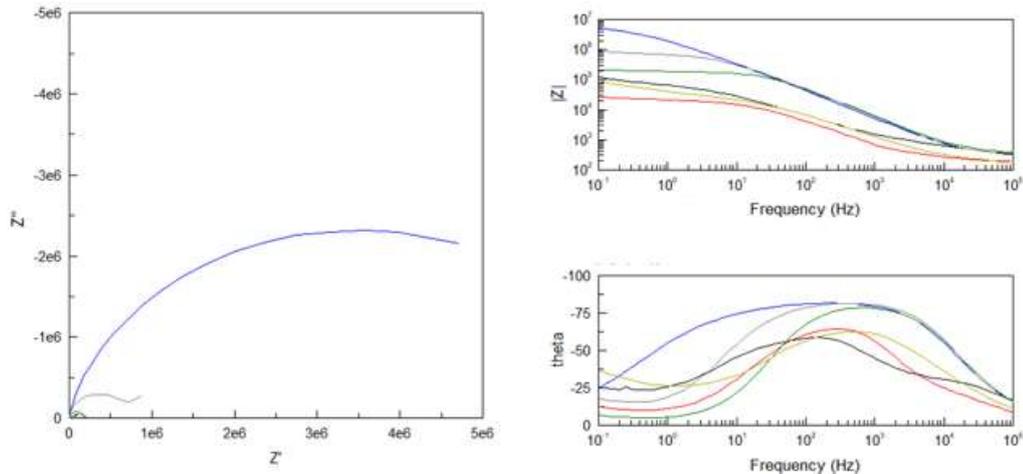


Ilustración 38: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche clásica desnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata.

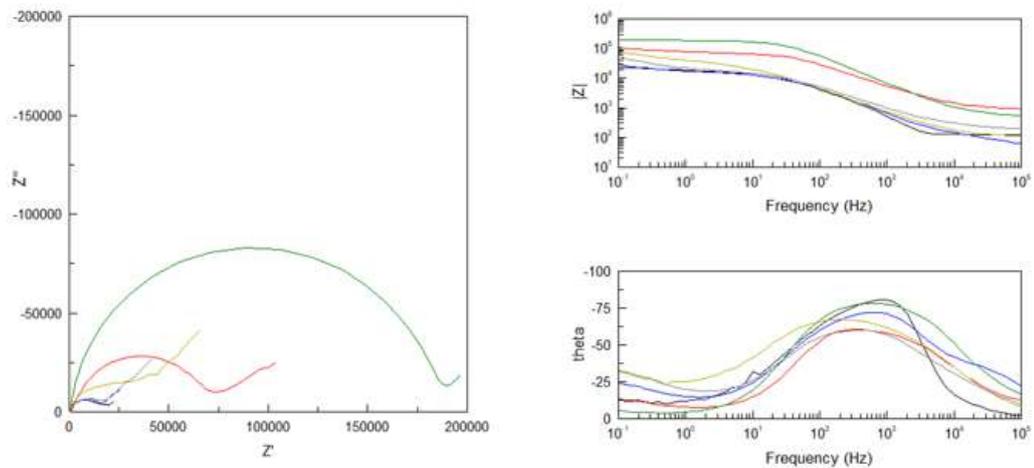


Ilustración 39: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche clásica semidesnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata.

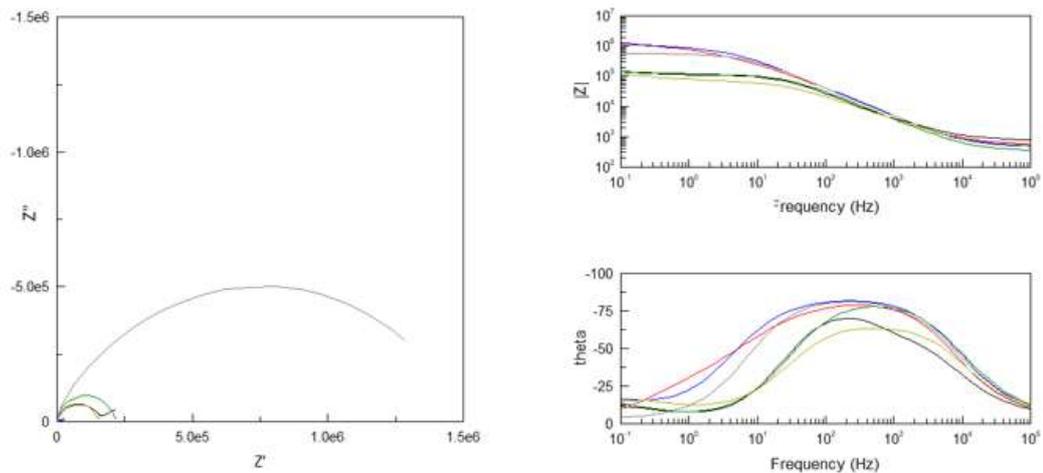


Ilustración 40: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche clásica entera en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa.

En primer lugar, se puede afirmar que los sensores están funcionando correctamente ya que no se observan interferencias en los espectros. Además, se puede ver que en todos los casos las señales de cada uno de los sensores son diferentes para cada tipo de leche y que, a su vez, cada sensor genera una respuesta diferente a los otros sensores para un mismo tipo de leche. Este hecho es muy importante, ya que asegura que los sensores presentaran selectividad cruzada frente a las muestras analizadas, condición indispensable para construir una lengua bioelectrónica.

Las siguientes ilustraciones 41,42 y 43 muestran las medidas realizadas en los diferentes sensores de la leche enriquecida con calcio.

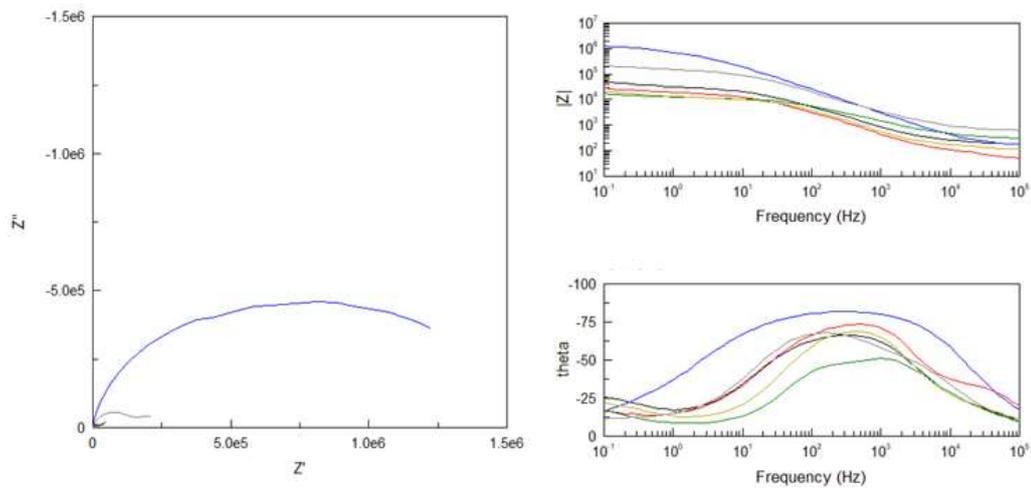


Ilustración 41: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche con Ca desnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa.

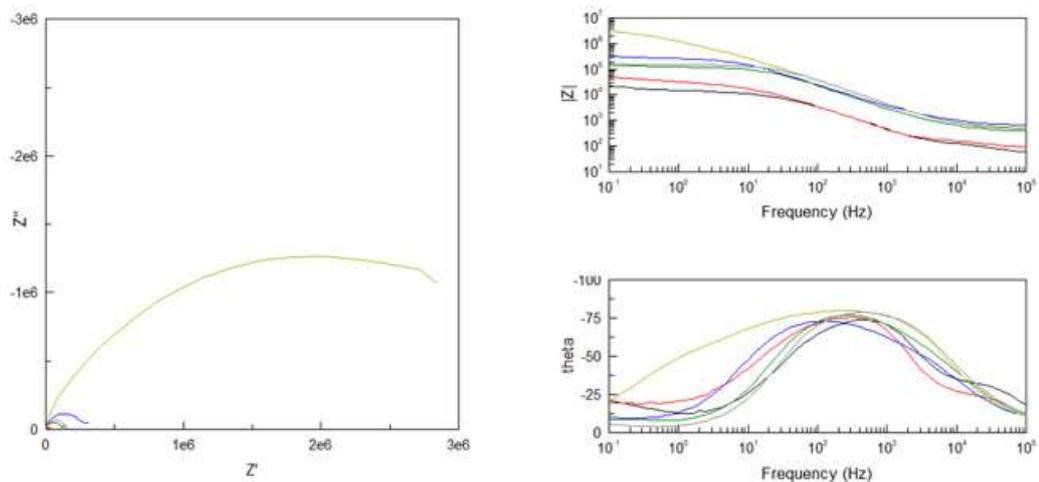


Ilustración 42: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche con Ca semidesnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa.

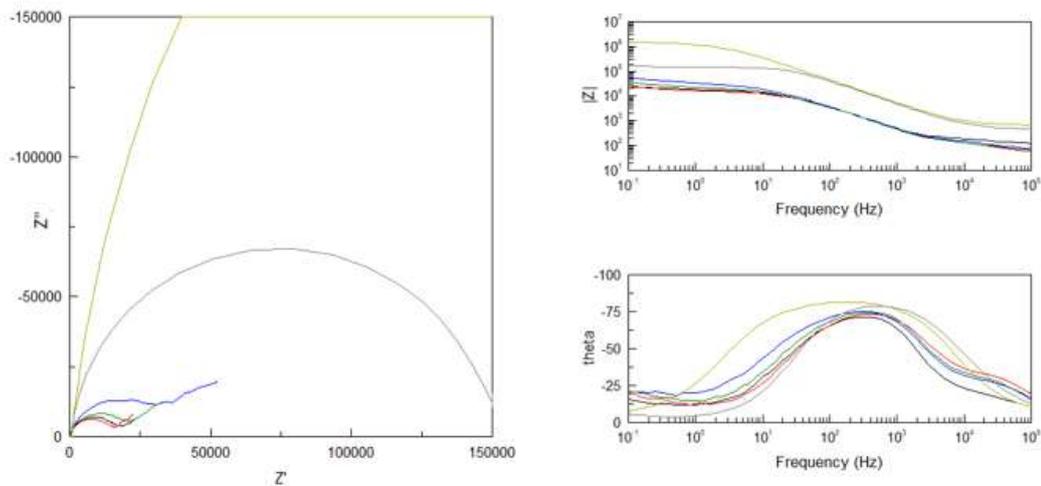


Ilustración 43: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche con Ca entera en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa.

En el caso de las ilustraciones 40, 41 y 42 se puede comprobar que los sensores tienen un correcto funcionamiento puesto que no se observa ninguna interferencia entre los espectros y cada sensor produce una respuesta diferente a los otros sensores utilizando el mismo tipo de leche.

Por último, se muestran las ilustraciones 44, 45 y 46 las cuales muestran la señal que produce la leche sin lactosa en los diferentes sensores.

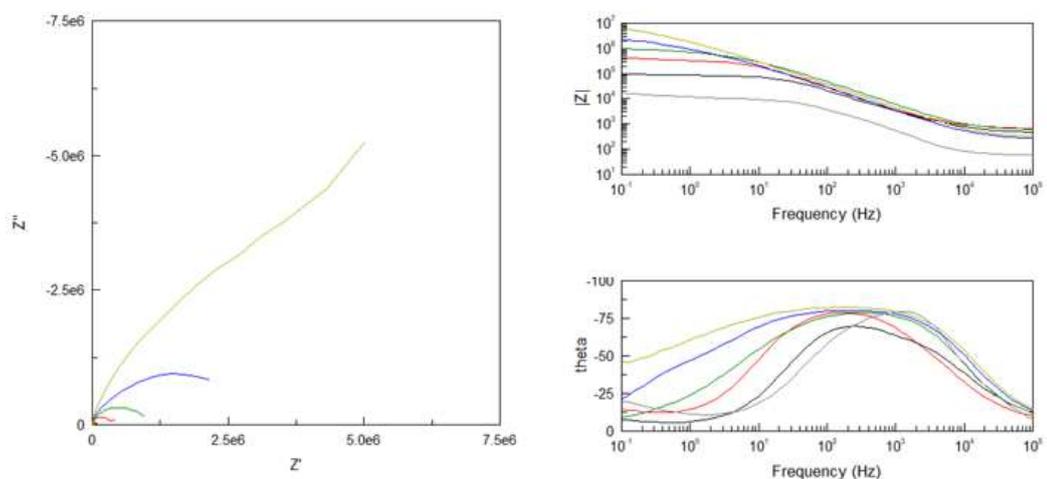


Ilustración 44: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche sin lactosa desnatada en los diferentes sensores

IDA 6 de oro. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa.

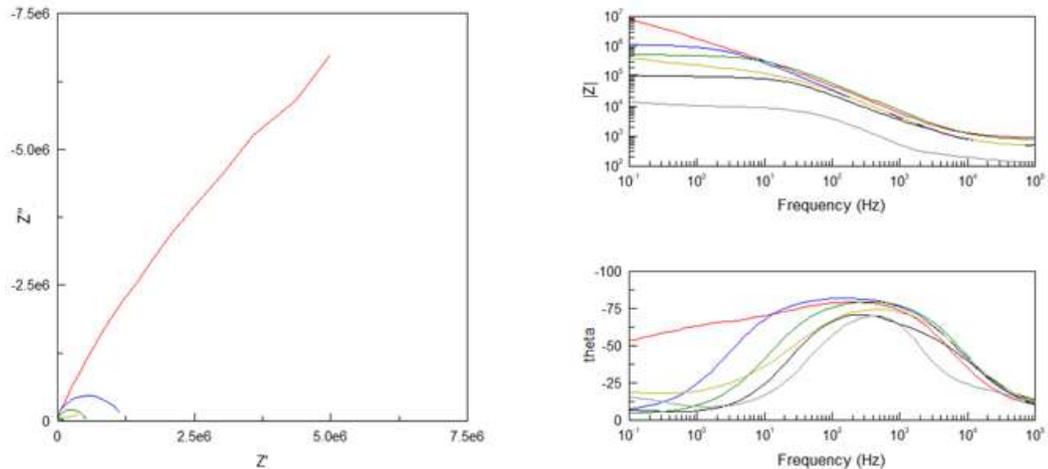


Ilustración 45: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche sin lactosa semidesnatada en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Negro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa.

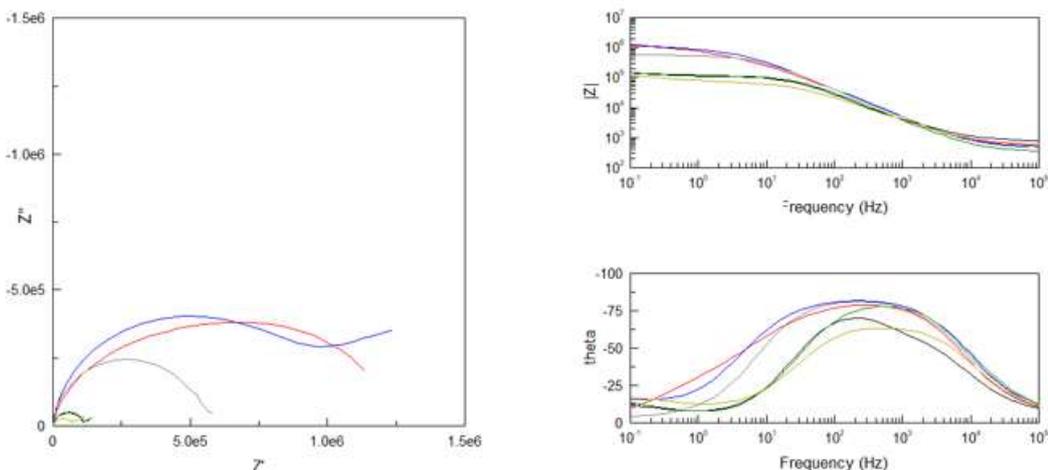


Ilustración 46: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Muestra analizada leche sin lactosa entera en los diferentes sensores IDA 6 de oro. Azul: 40 μ L nanopartículas de plata + glucosa oxidasa. Rojo: 40 μ L nanopartículas de plata + galactosa oxidasa. Gris: 40 μ L nanopartículas de plata + lactasa. Verde oscuro: 40 μ L nanopartículas de plata + lipasa. Negro:



40 μ L nanopartículas de plata. Verde claro: 40 μ L nanopartículas de plata + ureasa.

Observando la respuesta de la red a los tres tipos de leche sin lactosa (desnatada, semidesnatada y entera) en las ilustraciones 44, 45 y 46 los sensores que dan una señal con un valor más elevado del módulo de impedancias son los que han sido modificados con las enzimas galactosa oxidasa y glucosa oxidasa. En la leche sin lactosa, tal y como se ha mencionado anteriormente, las moléculas de lactosa se han hidrolizado en galactosa y glucosa, por lo que serán leches con un contenido elevado de ambos azúcares. Por este motivo los sensores que llevan enzimas para detectar estas sustancias muestran ese comportamiento característico, ello es una prueba más del correcto funcionamiento de la modificación del sensor con la enzima.

En general se pueden extraer las siguientes conclusiones al examinar la respuesta de la red de sensores:

- El sensor modificado con la enzima ureasa en casi todos los tipos de leche da señales muy poco significativas, manteniéndose prácticamente constante en todos los casos. Esto puede ser debido a que el contenido de urea en las muestras estudiadas es muy similar, de forma que la respuesta enzimática del biosensor será muy similar en todos los casos.
- El sensor que no lleva ninguna enzima, es decir, el sensor que únicamente se ha modificado con nanopartículas presenta diferencias más pequeñas entre tipos de leche que los diferentes biosensores modificados con enzimas. Este resultado es esperable ya que las enzimas se colocan para aumentar la sensibilidad y en su ausencia esta lógicamente es menor.
- En la mayoría de las muestras analizadas los sensores modificados con glucosa oxidasa y galactosa oxidasa presentan respuestas similares entre sí. La razón de este comportamiento podría deberse a que se trata de enzimas con una actividad catalítica similar.



5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Pese a que las diferencias observadas parecen indicar que los sensores son capaces de diferenciar entre las diferentes muestras de leche según su composición nutricional, es necesario realizar un estudio estadístico para confirmarlo que además nos permita amplificar estas diferencias. Para ello se realiza un análisis por componentes principales (PCA) utilizando como variables los diferentes sensores impedimétricos ensayados mediante espectroscopía de impedancias. En el análisis por PCA se realizarán dos aproximaciones:

- En la primera aproximación, se aproximarán los resultados obtenidos a circuitos equivalentes, de esta forma se utilizarán como variables de cada sensor aquellos valores correspondientes a los parámetros de resistencia, capacitancia, etc. Que permitan un mejor ajuste al circuito equivalente.
- En la segunda aproximación se seleccionarán los valores de Z' y Z'' representados en el diagrama de Nyquist a frecuencias determinadas. Las frecuencias que se seleccionaron fueron: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 100, 10, 1 y 0.1 Hz. En este caso, el módulo de impedancias no se utilizó como variable del estudio ya que se trata de una combinación de los valores Z' y Z'' lo que en pasos posteriores puede dar lugar a que el modelo matemático no converja.

El objetivo principal de realizar este estudio es confirmar la capacidad de la red de sensores para discriminar entre muestras de leche y determinar que aproximación permite obtener mejores modelos matemáticos. De esta forma, se puede obtener información sobre que aproximación sería mejor opción para futuros trabajos.

5.2.1 Análisis estadístico mediante la aproximación de circuitos equivalentes

La dificultad de realizar una aproximación a circuitos equivalentes recae en establecer un mismo modelo para todas las muestras analizadas sin aumentar el error del modelo por encima de 10^{-4} . En el caso de este trabajo, las respuestas obtenidas por los diferentes sensores eran muy diferentes entre sí tal y como se ha podido observar en el apartado anterior de este trabajo, por lo tanto, establecer un modelo que se ajuste a todas ellas es una tarea compleja que requiere probar diferentes combinaciones.

Tras llevar a cabo diferentes ajustes, el circuito equivalente que se utiliza es el siguiente (Ilustración 47):

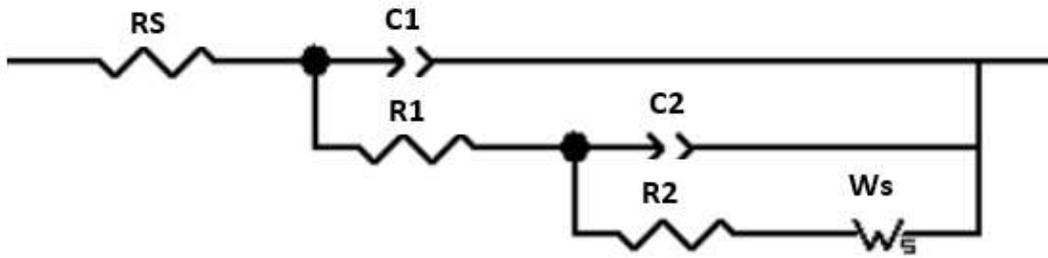


Ilustración 47: Circuito equivalente utilizado.

La resistencia a la solución (R_s) equivale a la intersección del semicírculo con el eje de abscisas del semicírculo del diagrama de Nyquist; la transferencia electrónica se ve controlada por las resistencias R_1 y R_2 junto con dos elementos de fase. En este modelo aparecen dos elementos de fase ya que algunas muestras mostraban claramente dos semicírculos lo que indica la existencia de dos constantes de tiempo (dos elementos de fase y dos resistencias). Los elementos de fase constante (CPE) representan una respuesta capacitiva no ideal del material de la interfaz-solución. El elemento W_s es un elemento de Warburg, el cual tiene un papel importante en las muestras que han presentado un proceso de difusión. La siguiente ilustración (Ilustración 48) muestra un ejemplo de esta aproximación a circuitos equivalentes en el caso del sensor IDA 6 Au modificado con nanopartículas de plata en una muestra de leche enriquecida en calcio.

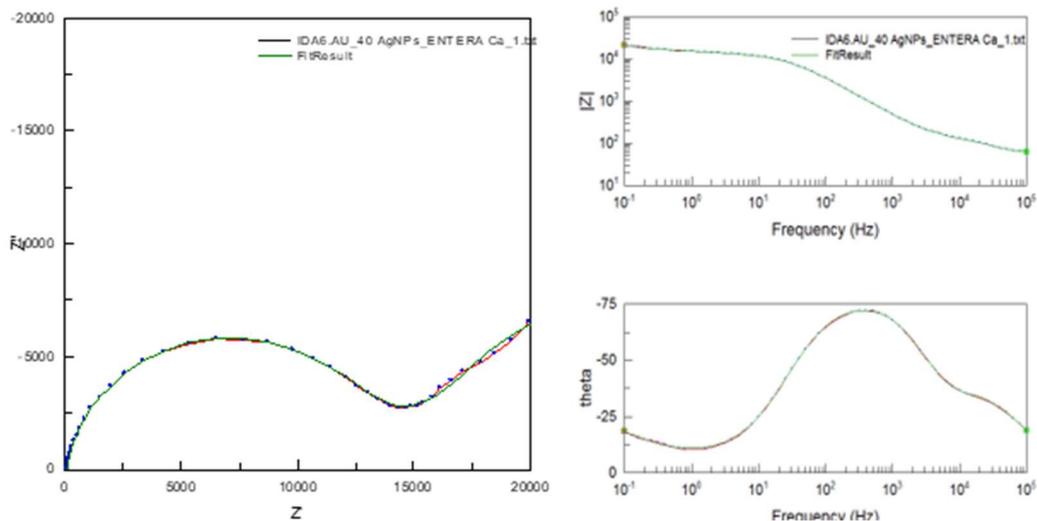


Ilustración 48: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Rojo: Medida real. Verde: aproximación con el circuito equivalente.

En el diagrama de Nyquist de la Ilustración 48 se puede apreciar la presencia de un proceso de difusión en la última región donde podemos observar que se produce una linealización del diagrama a un ángulo de 45°, que indica la presencia de un proceso de difusión. Por otro lado, en el diagrama de fase se pueden observar el comportamiento de doble cinética al presentar dos curvas, una más pequeña entre 10⁵ y 10⁴ Hz y una mucho más marcada entre 10³ y 10² Hz. La siguiente tabla (Tabla 7) recoge los valores de los parámetros que componen el circuito equivalente para este caso concreto:

Tabla 7: Valores de los diferentes elementos en la aproximación con el circuito equivalente utilizado.

R_s (Ω)	49,86
$CPE1-T\left(\frac{s^n}{\Omega^{-1}\cdot Cm^{-2}}\right)$	6,62E-07
$CPE1-P$	0,83412
$R1$ (Ω)	191,3
$CPE2-T\left(\frac{s^n}{\Omega^{-1}\cdot Cm^{-2}}\right)$	2,23E-07
$CPE2-P$	0,98185
$R2$ (Ω)	13016
$Ws1-R$ (Ω)	18043
$Ws1-T\left(\frac{s^n}{\Omega^{-1}\cdot Cm^{-2}}\right)$	7,459
$Ws1-P$	0,47739
<i>chi-squared</i>	6,45E-05

Los elementos de fase (CPE) tienen una variable adimensional (CPE1-P y CPE2-P) lo que nos indica cuanto se aleja el modelo del comportamiento ideal. Cuanto más cercano a “1” se encuentre más se aproxima a un condensador mientras que si es un valor cercano a “0” se comportará como una resistencia. CPE1-T y CPE2-T hacen referencia por tanto a la capacitancia de estos elementos de fase constante. Las resistencias 1 y 2 reflejan la transferencia electrónica, es decir estarán directamente relacionadas con el diámetro del diagrama de Nyquist. El ajuste al circuito equivalente se da por

valido cuando se obtiene un error de 10^{-4} como mínimo, en este caso obtenemos un valor de chi cuadrado de 10^{-5} .

El procedimiento de ajuste se repite para cada una de las medidas realizadas en leche con cada uno de los seis sensores que componen la lengua electrónica. Una vez que se tienen ajustadas todas las medidas se realiza la matriz de datos en la cual las columnas corresponderán a los diferentes parámetros del circuito equivalente de cada uno de los sensores y las filas a las diferentes muestras de cada tipo de leche analizadas.

A partir de esta matriz de datos se realiza el análisis por componentes principales. La siguiente imagen (Ilustración 49) muestra el diagrama de scores de los resultados obtenidos de la PCA aplicada a la aproximación de circuitos equivalentes (PC1 frente a PC2 y PC3). La primera componente PC1 contiene el 18 % de la información aportada, la segunda componente PC2 aporta el 15 % de la varianza y la tercera componente un 9% de la varianza del modelo, lo que supone un 42% en las tres primeras componentes del modelo.

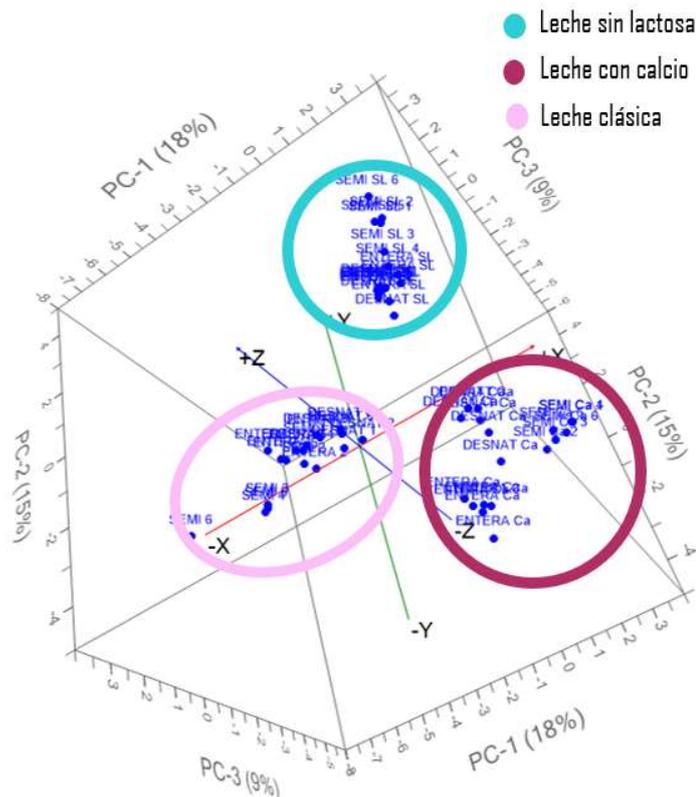


Ilustración 49: Diagrama en 3D del gráfico de Scores.

Al estudiar el resultado del diagrama de scores se puede decir que la lengua electrónica es capaz de discriminar los diferentes tipos de leche estudiados.

Se observan las leches agrupadas en función de composición nutricional: leches clásicas, leches sin lactosa figurando cada una de ellas en una cuadrante del diagrama. Las leches clásicas aparecen en la región negativa de la primera y segunda componente, mientras que las leches sin lactosa aparecen en la región positiva de la primera y segunda componente. Por su parte, las leches enriquecidas en calcio aparecen en la región negativa de la primera componente y positiva de la segunda componente.

Además, si se observa dentro de cada tipo de leche se puede observar que en algunos casos es posible observar diferencias entre muestras dependiendo de su contenido en materia grasa. Por ejemplo, en el caso de las leches enriquecidas en calcio se pueden observar tres grupos que corresponden a leches desnatadas, leches semidesnatadas y leches enteras.

Si bien se pueden observar diferencias entre los diferentes tipos de leches, estas diferencias no son las que se esperaban originalmente. Teniendo en cuenta que la materia grasa es el factor que se suponía que más debería afectar a la transferencia electrónica, lo lógico era esperar que las mayores diferencias se encontrasen entre muestras de leche desnatadas, semidesnatadas y enteras, hecho no observable.

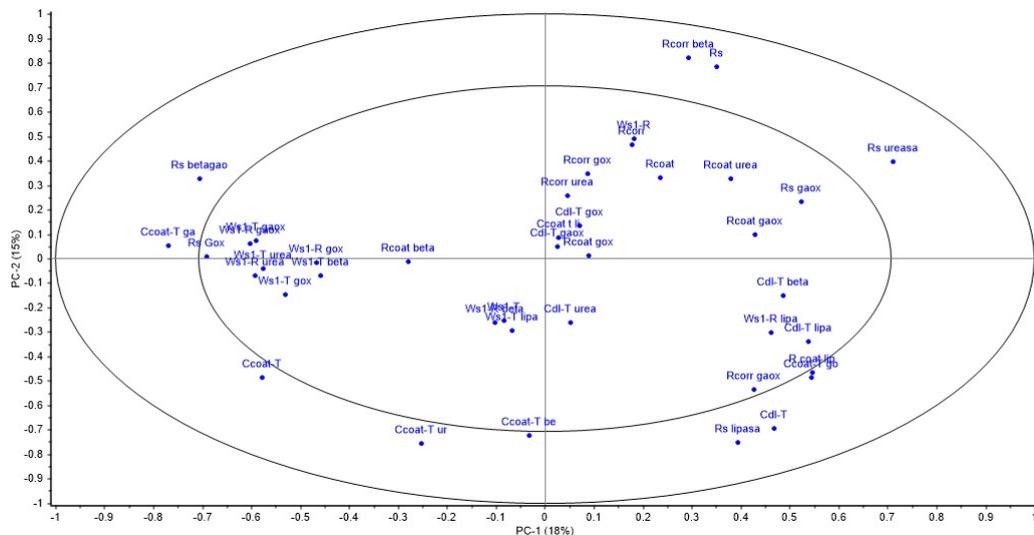


Ilustración 50: Diagrama de loadings.

Si se estudian las correlaciones del diagrama de loadings (Ilustración 50) resultante del análisis por PCA, se observa que el número de variables que se encuentran dentro del círculo de confianza es muy pequeño respecto del número total de variables. Este resultado tiene sentido respecto del porcentaje de varianza explicado por las tres primeras componentes que únicamente alcanza un 42% de la varianza del conjunto original de los datos. Este resultado puede ser debido a que para realizar el análisis multivariante se han utilizado muchas variables respecto de un número reducido de



muestras, lo que podría suponer un sobre entrenamiento del sistema, el cual impide la obtención de un buen modelo.

Una posible solución a este problema sería la simplificación del circuito equivalente mediante la agrupación de las diferentes resistencias y capacitancias, de forma que la matriz de datos que se utilizaría en el cálculo de la PCA presentaría un número de variables más pequeño respecto del número de muestras.

Otra conclusión que se extrae del estudio del resultado de la PCA es que al haber aproximado todas las medidas realizadas al mismo circuito equivalente se pierde información relevante a las características del electrodo y su interacción con la muestra. Este hecho también explicaría, el valor tan bajo de información que aporta el modelo. Por ello se pensó en utilizar como datos para el análisis los valores de impedancia real e imaginaria a unas determinadas frecuencias

5.2.2 Análisis estadístico mediante datos de impedancias a diferentes frecuencias

Para realizar este análisis se seleccionaron los valores de Z' y Z'' extraídos del diagrama de Nyquist del espectro de impedancias a unas determinadas frecuencias. La combinación de estos valores da lugar al módulo de impedancias motivo por el cual se puede prescindir de utilizar este valor dado que es la combinación de los anteriores. Por otra parte, los valores del ángulo de fase máximo eran muy similar en la mayoría de las muestras analizadas con variaciones mínimas que en intentos previos no aportaron información en el desarrollo de modelos para el análisis por componentes principales.

En el modelo propuesto, la región alta de frecuencia 10^5 - 10^2 Hz está principalmente controlado por la resistencia a la solución, la cual dependerá directamente de la muestra analizada. El segundo tramo de 10^2 Hz-0.1 Hz está relacionado con la transferencia electrónica, la cual se verá afectada por las diferentes modificaciones realizadas a los sensores desarrollados (presencia de nanopartículas y tipo de enzima inmovilizada) y su interacción con el medio. Las frecuencias con las que se trabajan son 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 y 0.1 Hz.

La siguiente tabla (Tabla 8) muestra un ejemplo de los valores utilizados para uno de los sensores utilizados:

Tabla 8: Valores de Z' y Z'' a diferentes frecuencias de un sensor IDA 6 de oro modificado con 40 μL nanopartículas de plata analizando una muestra de leche entera enriquecida con calcio.

FRECUENCIAS (Hz)	Z' (Ω)	Z'' (Ω)
100000	372.4410443	-109.0000242
10000	486.2711397	-729.1024774
1000	1265.928563	-6001.071494
100	19110.26788	-45308.51755
1	188043.811	-18384.16968
0.1	217182.1157	-25673.98328

La matriz de datos por tanto estará compuesta por las variables de los sensores correspondientes a los valores de Z' y Z'' para cada una de las muestras de leche analizadas. A continuación, se realiza el análisis por componentes principales para comprobar si mediante esta segunda aproximación los sensores son capaces de discriminar entre muestras de leche según su contenido nutricional. La siguiente imagen (Ilustración 51) muestra el diagrama de scores en tres dimensiones:

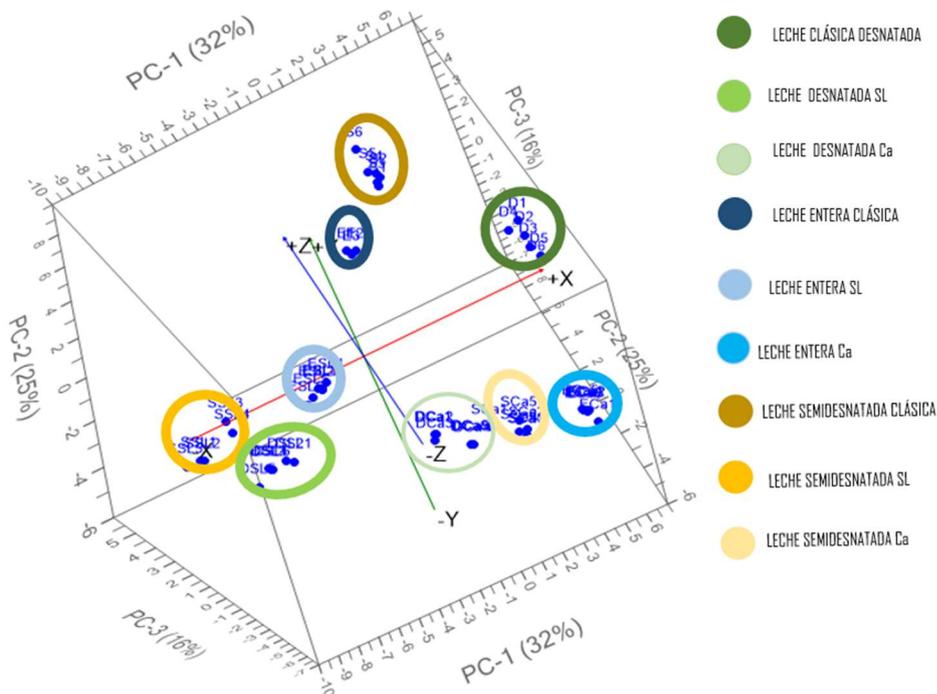


Ilustración 51: Gráfico 3D del diagrama de Scores.



En primer lugar, se estudia la varianza del modelo. La primera componente (PC1) representa un 32% de la varianza del conjunto original de datos, mientras que la segunda componente (PC2) aporta un 25% de la varianza. Por último, la tercera componente (PC3) contiene un 16% de varianza. De este modo, entre las tres primeras componentes se explica el 73% de la varianza del conjunto original de datos para los diferentes tipos de leche.

En este caso podemos observar como las leches clásicas aparecen en la región positiva de la primera y segunda componente, mientras que las leches sin lactosa aparecen en la región negativa de la primera y segunda componente; por su parte las leches enriquecidas en calcio aparecen en la región positiva de la primera componente y negativa de la segunda. Los tres tipos de leche aparecen claramente diferenciados en función de su composición por lo que podemos decir la lengua electrónica es capaz de discriminar entre muestras de leche.

Además, en este caso dentro de cada tipo de leche (clásica, sin lactosa y con calcio) podemos distinguir tres subgrupos que corresponden a las leches desnatadas, semidesnatadas y enteras. En este caso, la materia grasa no es la principal fuente de varianza en el sistema, pero si puede apreciarse su efecto dentro de cada uno de los tipos de leche.

Teniendo en cuenta el porcentaje de varianza explicada y la capacidad de discriminación de los modelos de PCA desarrollados mediante las dos aproximaciones, podríamos decir que el análisis de componentes principales a partir de los valores de Z' y Z'' a frecuencias determinadas permite obtener mejores resultados que el modelo propuesto a partir de los resultados del análisis por circuitos equivalentes.

5.2.3 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

Una vez que se ha comprobado la capacidad de discriminación de la lengua electrónica se procede a intentar establecer correlaciones con algunos parámetros fisicoquímicos de la leche determinados mediante técnicas de análisis tradicionales. Los parámetros estudiados son: la acidez, la densidad, el contenido en materia grasa, el contenido en lactosa, el contenido en proteína, el extracto seco magro (ESM) y extracto seco total (E.S.T).

Los resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de leche aportados por un laboratorio de calidad fueron los siguientes (Tabla 9):

Tabla 9: Resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de leche.

	Acidez	Densidad	MG (%m)	Prot (%m)	Lact (%m)	E.S.M (%m)	E.S.T (%m)
D1	12,65	1033,55	0,32	3,3	5	9,02	9,33
S1	12,55	1031,6	1,56	3,27	4,91	8,91	10,47
E1	12,17	1029,38	3,56	3,21	4,85	8,78	12,33
DSL1	12,67	1033,57	0,31	3,29	0,36	9,02	9,33
SSL1	12,19	1032,09	1,59	3,31	0,42	8,99	10,57
ESL1	11,98	1029,4	3,59	3,23	0,31	8,82	12,41
DCa1	15,82	1039,47	0,29	3,93	5,59	10,51	10,8
SCa1	16,06	1037,29	1,55	3,9	5,49	10,4	11,95
ECa6	15,86	1035,71	3,55	3,91	5,54	10,45	14

Con la intención de desarrollar un modelo capaz de llevar a cabo la clasificación de los diferentes tipos de leche, así como la posible predicción de características de interés de futuras muestras, se realizó un análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS) en el cual se utilizarán los datos obtenidos por la lengua electrónica y los datos fisicoquímicos. De esta forma se va a establecer un modelo predictivo mediante correlaciones lineales para la recta de calibración y recta de predicción (validación).

La validación utilizada en este trabajo es una validación cruzada, conocida como “full-cross validation” el cual garantiza que los resultados obtenidos para la predicción serán independientes de los datos que se utilizan en el cálculo de la calibración.

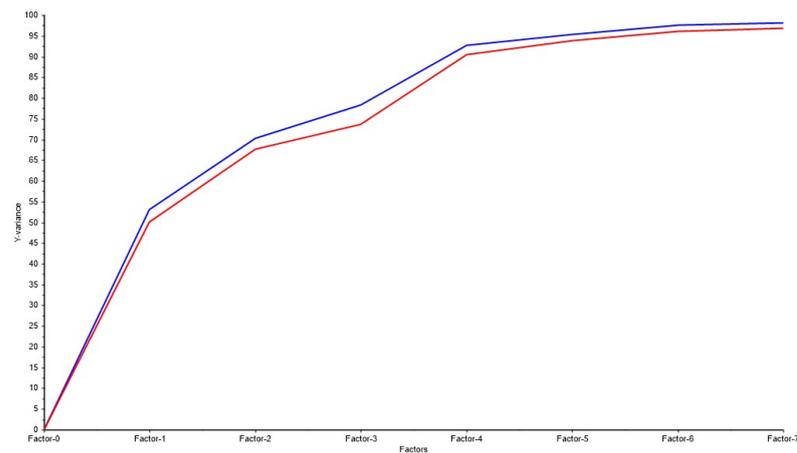


Ilustración 52: proporción de varianza explicada acumulada en función del número de componentes mínimo a partir del cual el incremento deja de ser sustancial.

Otro de los parámetros a determinar es el número de factores utilizados en el cálculo de las correlaciones. Si se observa la Ilustración 52 puede verse como aumenta la varianza contenida en el modelo a medida que aumenta el número de factores estudiados. Si bien el modelo alcanza el máximo en su séptima componente, la estabilización de la curva entre la cuarta componente y la quinta puede indicar que la información aportada por las últimas dos componentes podría deberse a que se esté modelando parte del error del sistema. Es por ello que consideraremos el número óptimo de componentes como cuatro.

La Tabla 10 recoge los resultados obtenidos en el modelo de regresión (PLS) que correlacionan los datos de espectroscopía de impedancias de la lengua electrónica con los parámetros químicos de las muestras de leche. En la tabla se muestran los siguientes parámetros: error cuadrático medio (RMSE) y el coeficiente de correlación (R^2), obtenidos en la calibración ($RMSE_c$ y R_c^2) y en la validación ($RMSE_v$ y R_v^2).

Tabla 10: Resultados obtenidos en el modelo de regresión PLS.

	Acidez	Densidad	MG	Prot	Lact	E.S.M	E.S. T
RMSE_c	0.1685	0.4077	0.3301	0.0329	0.3866	0.0701	0.3407
R_c²	0.9900	0.9841	0.9395	0.9883	0.9719	0.9907	0.9456
RMSE_v	0.1983	0.5545	0.4557	0.0389	0.4298	0.1424	0.4608
R_v²	0.9886	0.9726	0.8951	0.9842	0.9666	0.9872	0.9111

Observando los resultados de la PLS se puede decir que, en el caso de acidez, densidad, contenido en proteínas, contenido en lactosa, densidad y extracto seco magro los modelos desarrollados alcanzaron valores de correlación superiores a 0,94 tanto para calibración como para predicción, con errores cuadráticos medios bajos que oscilan entre 0,0701 y 0,5545. Siendo las proteínas el parámetro con errores más bajos, mientras que el extracto seco magro presentó las correlaciones más altas.

Por otra parte, el contenido en materia grasa y el extracto seco total presentan correlaciones ligeramente inferiores. La materia grasa presenta valores de correlación de 0.93 para la calibración y 0.89 para la predicción, mientras que el EST presenta correlaciones de 0.94 y 0.91 para la calibración y predicción respectivamente.

Estos resultados tienen sentido si tenemos en cuenta que la materia grasa es el parámetro que más afecta a la toma de medidas y por tanto el que puede suponer una fuente mayor de error.

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

Finalmente, la Ilustración 53 muestra un ejemplo de la reproducibilidad de los sensores empleados en la lengua electrónica. En las siguientes ilustraciones ponemos observar como a lo largo de las cinco repeticiones, entre las cuales los sensores fueron extraídos de la muestra de leche y lavados, el valor de la impedancia que registran no sufre apenas variación, aportando una gran reproducibilidad al sistema.

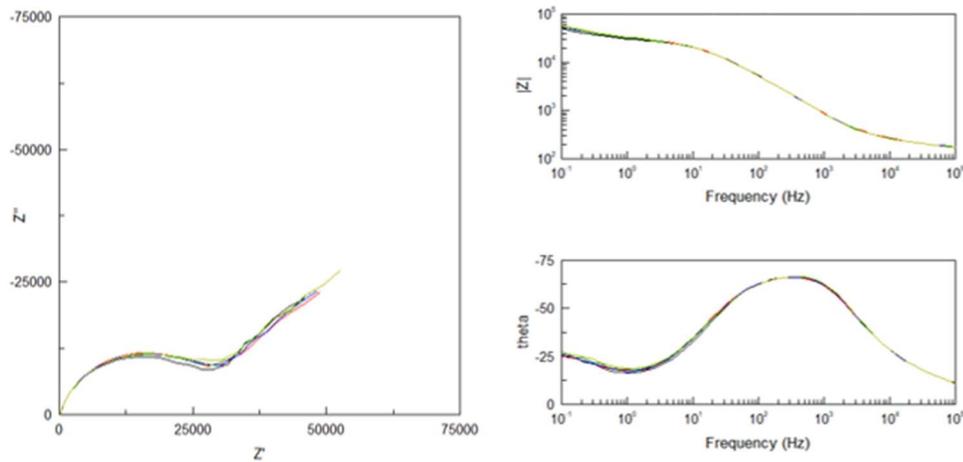


Ilustración 53: Izquierda Diagrama de Nyquist; derecha Diagrama de Bode. Sensor IDA 6 de oro modificado con 40 μ L nanopartículas de plata analizando una muestra de leche desnatada enriquecida con calcio. Negro: repetición 1. Rojo: repetición 2. Azul: repetición 3. Verde: repetición 4. Verde claro: repetición 5. Gris: repetición 6.





“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES



Universidad de Valladolid

“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



6. CONCLUSIONES

Tras la finalización del capítulo 4 en el que se expone el desarrollo experimental y los resultados obtenidos se puede contemplar el desempeño de los objetivos planteados en el presente trabajo. Sin embargo, se procede a exponer de forma detallada un balance global.

- Entre los sensores comerciales disponibles se ha comprobado que unos aportan mejor resultado que otros. Esto es debido principalmente al material, si se trata de oro o platino; a la manera en la que están contruidos, es decir si constan únicamente de dos electrodos o de 4 y a la separación de éstos. En este caso para la actividad que se ha llevado a cabo el que mejor respuesta daba y por tanto resultados más estables y fiables es un sensor de oro con 4 electrodos en el que la pista en este caso es de 5 μm y están separados 15 μm .
- Se demuestra que la preparación de los sensores nanoestructurados utilizando nanopartículas de plata, poseen una alta reproducibilidad y sensibilidad ante la presencia de los analitos que se desean estudiar.
- Se desarrollaron biosensores utilizando la técnica de dropcasting para la deposición de las nanopartículas de plata y nafion para la inmovilización de las diferentes enzimas. Estos sensores modificados han demostrado tener un excelente comportamiento electroquímico aportando señales diferentes dependiendo de la muestra para las distintas muestras.
- La aplicación de la aproximación de circuitos equivalentes para obtener los datos del estudio estadístico permite discriminar entre las leches en función de su contenido nutricional pero no permite discriminar las leches por su contenido graso. Esto es debido a que todas las medidas se están aproximando al mismo tipo de circuito presentando, en algunos casos, un error más elevado. no apropiado ya que se obtiene un error más elevado. Otro de los motivos de este resultado es porque las técnicas estadísticas que se utilizan son para modelos lineales y puede que estos circuitos no lo sean. En cambio, si se realiza el análisis estadístico con los valores de impedancia característicos a ciertas frecuencias se obtiene discriminación de las leches por su contenido nutricional y por su contenido graso.
- Realizando las diferentes PCA se consigue evaluar la capacidad de discriminación de la matriz. En un primer lugar se pensaba que la



discriminación se realizaría por su contenido en grasa ya que al utilizar la técnica de espectroscopía de impedancias esta mide la resistencia que se opone. En cambio, las muestras de leche no sólo se agruparon según este criterio, sino que también se ha conseguido que se clasifiquen según los componentes añadidos como se ha podido observar en los resultados expuestos anteriormente. Por todos estos motivos se puede afirmar que la red de sensores desarrollada tiene capacidad de analizar leches.

- Se demuestra que la aproximación por mínimos cuadrados (PLS) permite establecer futuras correlaciones con factores físico-químicos y se ha creado un modelo con errores muy bajos y altos coeficientes de correlación para la mayoría de los parámetros medidos en el control de calidad de los productos lácteos.

En relación con el trabajo futuro para posibles investigaciones se pueden incluir las siguientes propuestas:

- Creación de una red de sensores, en el que los sensores utilizados en cada caso sean diferentes. En este trabajo únicamente se ha utilizado un sensor IDA 6 de oro modificado con diferentes enzimas. La propuesta es utilizar diferentes tipos de sensores ya que se ha visto que hay otros que también aportaban un buen resultado y pueden aportar diferente información al ser de diferente material y estar situados en diferentes planos cuando se realiza el análisis estadístico.
- Otra de las propuestas es utilizar nanopartículas de oro en la modificación de los sensores. Las de plata han aportado un buen resultado, pero tienen menor duración y además presentan un inconveniente que es que se pueden oxidar.
- Realizar un estudio para la discriminación de la leche según otros parámetros de estudio como puede ser: la marca comercial, el envejecimiento, la adulteración, etc.



“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





“DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA IMPEDIMÉTRICA
PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS”





CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA





7. BIBLIOGRAFÍA

A continuación, aparece enumerada la bibliografía de utilizada tanto de páginas webs, artículos como libros para la realización de este Trabajo Fin de Grado.

- [1] D. E. Deborah Berkowitz, M. Malagíé, G. Jensen, and J. L. Grahamy Donald Smith, “INDUSTRIA ALIMENTARIA INDUSTRIA ALIMENTARIA Procesos de la industria alimentaria.”
- [2] “Informe anual de la industria alimentaria española periodo 2020-2021. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación dirección general de la industria alimentaria subdirección general de competitividad de la cadena alimentaria.” [Online]. Available: https://public.tableau.com/views/CCAA_4/Dashboard1?:showVizHome=no&:embed=true
- [3] “Industria Conectada 4.0 - Página Principal.” <https://www.industriaconectada40.gob.es/Paginas/index.aspx> (accessed Sep. 18, 2021).
- [4] “Datos del sector industrial lácteo en España.” <http://fenil.org/sector-industrial-lacteo/> (accessed May 18, 2021).
- [5] “(El sector lácteo en España).” <http://www.agroalimentarias.coop/ficheros/doc/05092.pdf> (accessed May 18, 2021).
- [6] “(No Title).” <https://www.boe.es/buscar/pdf/1967/BOE-A-1967-16485-consolidado.pdf> (accessed May 18, 2021).
- [7] S. Shrikrishnan and V. Lakshminarayanan, “Electron transfer studies of redox probes in bovine milk,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 370, no. 1, pp. 124–131, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.jcis.2011.12.070.
- [8] “Agricultura ganadería pesca y acuicultura formación consejería de agricultura, pesca y desarrollo rural la leche composición y características,” 2016.
- [9] L. Artica Mallqui, “Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos “ 2ª Edición: Año 2014 Editorial @ Libros y editoriales, TEIA.”
- [10] “Composición de la leche y Valor Nutritivo.” http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/prod_lechera/GA000002pr.htm (accessed May 18, 2021).



- [11] “Tecnología de Lacteos Unad - [PDF Document].” <https://vdocuments.mx/tecnologia-de-lacteos-unad.html> (accessed May 18, 2021).
- [12] Ramón Pallás-Areny and John G. Webster, *Sensors and Signal Conditioning*, 2nd Edition. 2000.
- [13] F.-Gabriel. Banica, *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons Inc, 2012.
- [14] Manuel. Cano Luna, *Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, 2009.
- [15] J. Janata, *Principles of chemical sensors*.
- [16] Concepción Pérez Conde, *Sensores ópticos*. Universitat de València, 1996.
- [17] “Análisis electroquímico.” https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732002000100005 (accessed Aug. 23, 2021).
- [18] B. F. Gutié and A. Alatorre, *Electroquímica: voltametrías sobre electrodo sólido*. Editorial Universidad de Santiago de Chile., 2009.
- [19] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*.
- [20] H. Ítalo Romero Bonilla, J. Carolina Chiriboga Cabrera, and A. Paola Siguenza Balladares resumen, “Determinación de ultratrazas de cadmio (ii) por técnicas voltamétricas con electrodo de carbón vítreo modificado con película de bismuto determination of cadmium (ii) ultratrazes by voltammetric techniques with bismuth film-modified vitreous carbon electrode,” 2018.
- [21] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, “A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry,” *Journal of Chemical Education*, vol. 95, no. 2, pp. 197–206, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [22] J. Bobacka, A. Ivaska, and A. Lewenstam, “Potentiometric ion sensors,” *Chemical Reviews*, vol. 108, no. 2. pp. 329–351, Feb. 2008. doi: 10.1021/cr068100w.
- [23] E. Bakker and Y. Qin, “Electrochemical sensors,” *Analytical Chemistry*, vol. 78, no. 12. pp. 3965–3983, Jun. 15, 2006. doi: 10.1021/ac060637m.



- [24] N. Juan Mendoza Flores, R. Durán Romero, J. Genescá Llongueras, and I. Electroquímica JMF, “ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA EN CORROSIÓN.”
- [25] Methrom Autolab, “Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Part 1-Basic Principles.” [Online]. Available: <http://www.metrohm.com/electrochemistry>.
- [26] V. F. Lvovich, *Impedance spectroscopy: applications to electrochemical and dielectric phenomena*. Wiley, 2012.
- [27] E. Barsoukov and J. R. (James R. Macdonald, *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*.
- [28] X. Z. Yuan, C. Song, H. Wang, and J. Zhang, *Electrochemical impedance spectroscopy in PEM fuel cells: Fundamentals and applications*. Springer London, 2010. doi: 10.1007/978-1-84882-846-9.
- [29] E. P. Superior, A.: Rubén, M. Saavedra, M. Asunción, and B. Arija, UNIVERSIDAD CARLOS III DE MADRID “Simulación mediante circuitos equivalentes de la impedancia electroquímica de armaduras de acero inoxidable en mortero,” 2014.
- [30] M. Á. Pérez García, “Estudio de la retención en membranas de nanofiltración mediante espectroscopía de impedancias.”
- [31] C. Garcia-Hernandez, C. Salvo Comino, F. Martín-Pedrosa, M. L. Rodriguez-Mendez, and C. Garcia-Cabazon, “Impedimetric electronic tongue based on nanocomposites for the analysis of red wines. Improving the variable selection method,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 277, pp. 365–372, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.09.023.
- [32] J. Luis Vázquez Gutiérrez and D. Dña Anna Igual Muñoz Valencia, “Empleo de la técnica de espectroscopía de impedancias electroquímicas para la caracterización de biomateriales. aplicación a una aleación biomédica de Co-Cr-Mo,” 2007.
- [33] S. Alegret, M. del Valle, and A. Merkoci, *Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores. Curso teórico práctico*. Universidad Autónoma de Barcelona, 2004.
- [34] González Rumayor V, García Iglesias E, Ruiz Galán O, and Gago Cabezas L, “Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria,” Comunidad de Madrid, 2005. [Online]. Available: www.madrimasd.org
- [35] F. J. Plou, “*Las enzimas*”. Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas., 2016.



- [36] Avilez M. J., *Enzimas*. El Cid Editor , 2009.
- [37] P. Carbonero Zalduegui, “Enzimas.”
- [38] D. M. Arroyo, “Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications,” 1998.
- [39] E. Martínez Periñán, “UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL.”
- [40] Wang J., *Nanomaterial-based electrochemical Biosensors*. . 2005.
- [41] Jaworska E, Wójcik M, Kisiel A, Mieczkowski J, and Michalska A, “Gold nanoparticles solid contact for ion-selective electrodes of highly stable potential readings,” *Talanta*, 2011, pp. 1986–1989.
- [42] Y. Tahara and K. Toko, “Electronic Tongues–A Review. ,” *IEEE Sensors Journal* , vol. 13, pp. 3001–3011, 2013.
- [43] P. Ciosek, E. Augustyniak, and W. Wróblewski, *Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitive electrode-based electronic tongue for qualitative analysis of beverages* . 2004.
- [44] D. Wilson Massó, *Desarrollo de lenguas electrónicas potenciométricas para la determinación simultánea de metales pesados en muestras ambientales* . Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Química, 2013.
- [45] C. A. Olgúin Pinatti, *APROXIMACION AL BIOMIMETISMO MEDIANTE LENGUAS Y NARICES ELECTRÓNICAS EN MEDIOS COMPLEJOS DETECCIÓN DE EXPLOSIVOS, AGENTES NERVIOSOS Y CONTROL DE ALIMENTOS*. Universitat Politècnica de València, 2017.
- [46] L. A. Dias, A. M. Peres, A. C. A. Veloso, F. S. Reis, M. Vilas-Boas, and A. A. S. C. Machado, “An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 136, no. 1, pp. 209–217, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.snb.2008.09.025.
- [47] C. Pérez-González *et al.*, “Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors,” *Frontiers in Chemistry*, vol. 9, Jul. 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.706460.
- [48] N. González García and A. Taborda Londoño, “ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES SPARSE Formulación, algoritmos e implicaciones en el análisis de datos.”



- [49] T. Kourti and J. F. Macgregor, “Chemometrics and intelligent laboratory systems Tutorial Process analysis, monitoring and diagnosis, using multivariate projection methods,” 1995.
- [50] J. Carlos, A. Pérez, D. Peluffo, and R. Therón, “Visualización y métodos kernel: Integrando inteligencia natural y artificial Modular design methodology for production plants View project PROVIDEDH: PROgressive Visual DECision-making for Digital Humanities View project.” [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/313244494>
- [51] C. E. Alciaturi, M. E. Escobar, C. de La Cruz, and Carlos. Rincón, “Partial least squares (PLS) regression and its application to coal analysis. ,” *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, pp. 197–204, 2003.
- [52] “Electrodos Interdigitados (IDE) | MicruX.” <https://www.micruxfluidic.com/es/soluciones-electroquimicas/sensores-electroquimicos-thin-film/electrodos-interdigitados-ide/> (accessed Jun. 23, 2021).
- [53] “Array Interdigitado de Microelectrodos (IDA) | MicruX.” <https://www.micruxfluidic.com/es/soluciones-electroquimicas/sensores-electroquimicos-thin-film/array-interdigitado-de-microelectrodos-ida/> (accessed Jun. 23, 2021).
- [54] M. Monge Oroz, “Nanopartículas de plata métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas,” *Universidad de la Rioja*, 2009.



