



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Desarrollo de biosensores
electroquímicos voltamétricos
basados en películas
nanoestructuradas para el
análisis de productos lácteos**

Autora:

Martín Bartolomé, Patricia

Tutoras:

Rodríguez Méndez, María Luz

Salvo Comino, Coral

**Departamento de Química Física y
Química Inorgánica**

Valladolid, junio 2022.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar tengo que dar las gracias a mi tutora María Luz Rodríguez Méndez, por darme la oportunidad de trabajar con ella y su equipo durante todo este tiempo. He aprendido mucho más de lo que podía imaginar, a nivel personal y profesional, y todo ha sido gracias a la oportunidad que me ha brindado.

En segundo lugar tengo que mencionar a mi cotutora Coral Salvo Comino. Gracias por regañarme cuando hacía falta, por alentarme en los momentos de bajón y por dedicar hasta el tiempo que no tenías en ayudarme. Me quedo con tu eterna sonrisa, esa energía imparables todos los días y con algo que no tiene precio, una amiga.

Tampoco puedo olvidarme del resto de mis compañeros del laboratorio, no sé qué habría hecho sin vuestra ayuda y vuestros consejos. Pero más allá de eso, quiero agradecer las risas en los peores días y la desesperación cuando no salía ni la multiplicación más sencilla.

Dentro de estas líneas no podáis faltar vosotros, mis amigos. Los de toda la vida, los del colegio, los de la carrera y los que se han ido cruzando en mi vida por otras circunstancias y se ha quedado para hacerme absolutamente feliz. Traspinedo, Combustión espontánea, Petit Comité, Grupo hábil, Las UVas y todos los que formáis parte de mí, gracias por aguantar mis audios eternos y mis dramas, no sé qué habría hecho sin vosotros, sois los mejores.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia. A mi madre, por celebrar mis éxitos como si fueran los suyos y por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación. A mi padre, por tener siempre una palabra de aliento y un abrazo de oso preparado. Gracias a los dos por tener una paciencia infinita conmigo en todos los sentidos, por enseñarme que el esfuerzo tiene su recompensa, por susurrarme la parábola de los talentos hasta en sueños y por no haberme matado de un susto de los vuestros antes de finalizar mis estudios. Y como no, a mi hermano Manuel, por pasar de ser mi niño pequeño a ser un amigo y un confidente, gracias por esas risas que asfixian y por esa complicidad que sólo entendemos nosotros.

Muchas gracias a todos



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



RESUMEN

En este trabajo se han desarrollado dos lenguas bioelectrónicas voltamperométricas para el análisis de muestras de leche de diferente contenido nutricional y graso. Dichas lenguas electrónicas están formadas por redes de biosensores basadas en la combinación de enzimas con nanohilos (AgNWs) o nanopartículas (AgNPs) de plata. Estas enzimas son específicas para la detección de azúcares presentes en la leche (β -galactosidasa, glucosa oxidasa y galactosa oxidasa).

El análisis quimiométrico realizado mediante PCA, ha demostrado que la lengua bioelectrónica basada en AgNWs puede discriminar 9 clases de leche con diferente contenido de grasa (desnatada, semidesnatada y entera), así como con diferentes composiciones nutricionales (clásica, enriquecida con calcio y sin lactosa), con mejores resultados que los AgNPs. Asimismo, la PLS demuestra que las señales de la red de AgNWs muestra mejores parámetros de correlación con los parámetros fisicoquímicos comúnmente utilizados para evaluar la calidad de la leche.

Palabras clave

Lengua bioelectrónica (bioLE), biosensores electroquímicos, nanohilos de plata (AgNWs), nanopartículas de plata (AgNPs), análisis quimiométrico



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



ABSTRACT

In this work, two voltammetric bioelectronic tongues (bioET) have been developed in order to analyse milk samples with different nutritional and fat content. These electronic tongues are made up of biosensor arrays based on the combination of enzymes with silver nanowires (AgNWs) or nanoparticles (AgNPs). These enzymes are specific for the detection of sugars present in milk (β -galactosidase, glucose oxidase and galactose oxidase).

The chemometric analysis performed by Principal Component Analysis (PCA), has shown that the bioelectronic tongue based on AgNWs can discriminate 9 classes of milk with different fat content (skimmed, semi-skimmed and whole), as well as different nutritional compositions (classic, calcium-enriched and lactose-free), with better results than with AgNPs. Likewise, PLS (Partial Least Square) demonstrates that AgNWs array signals show better correlation parameters with physicochemical parameters commonly used to assess milk quality.

Keywords

Bioelectronic tongues (bioETs), electrochemical biosensors, silver nanowires (AgNWs), silver nanoparticles (AgNPs), chemometric analysis



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



ÍNDICE

1. Introducción y objetivos.....	25
1.1. Introducción y justificación	25
1.2. Objetivos	26
2. Fundamento teórico	33
2.1. Industria láctea.....	33
2.1.1. Tipos de leche	34
2.1.2. Composición de la leche.....	34
2.1.3. Propiedades físico-químicas.....	37
2.2. Sensores	39
2.2.1. Biosensores electroquímicos	40
2.3. Nanociencia y nanotecnología en la industria alimentaria	49
2.3.1. Nanomateriales metálicos. Nanopartículas y nanohilos.....	50
2.4. Lenguas electrónicas	51
2.4.1. Análisis estadístico multivariante	53
2.5. Técnicas espectroscópicas.....	55
2.5.1. Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis).....	56
2.5.2. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)	58
2.6. Microscopio de fuerza atómica (AFM).....	59
3. Reactivos, materiales y equipos empleados	65
3.1. Reactivos.....	65
3.2. Materiales	66
3.3. Muestras de leche.....	67
3.4. Equipos.....	67

4. Metodología y desarrollo experimental	73
4.1. Muestras de leche	73
4.2. Caracterización muestras de leche	73
4.2.2. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)....	74
4.2.3. Condicionamiento de leche para medidas electroquímicas	76
4.3. Preparación de los biosensores nanoestructurados.....	77
4.3.1. Preparación de disoluciones	77
4.3.2. Síntesis de nanohilos de plata (AgNWs)	78
4.3.3. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)	80
4.3.4. Preparación de las enzimas.....	81
4.3.5. Preparación de sensores y biosensores	81
4.4. Caracterización de los sensores y biosensores basados en nanoestructuras.....	83
4.5. Caracterización electroquímica	83
5. Resultados experimentales y discusión	91
5.1. Análisis espectroscópico de las leches UHT	91
5.1.1. Análisis de leche en UV-Visible	92
5.1.2. Análisis de muestras de leche mediante FTIR	95
5.2. Desarrollo de una lengua bioelectrónica para análisis de leche	100
5.2.1. Preparación y caracterización de los sensores	100
5.2.2. Lengua bioelectrónica	110
6. Conclusiones	123
7. Bibliografía.....	129
8. Anexos.....	145



LISTA DE ABREVIATURAS

AFM: microscopía de fuerza atómica
AgNPs: nanopartículas de plata
AgNWs: nanohilos de plata
BDD: diamante dopado con boro
bioLE: lengua bioelectrónica
CaD: leche enriquecida en calcio desnatada
CaE: leche enriquecida en calcio entera
CaS: leche enriquecida en calcio semidesnatada
CD: leche clásica desnatada
CE: leche clásica entera
CPE: sensores de pasta de carbono
CS: leche clásica semidesnatada
CV: voltimetría cíclica
FTIR: espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier
GaOx: galactosa oxidasa
GOx: glucosa oxidasa
ITO: óxido de indio y estaño
LD: leche sin lactosa desnatada
LDA: análisis discriminante lineal
LE: leche sin lactosa entera
LE: lengua electrónica
LS: leche sin lactosa semidesnatada
naf: Nafion®
NPs: nanopartículas
°D: grados Dornic
PCA: análisis de componentes principales
PLS: regresión de mínimos cuadrados parciales
Pt: platino
UV-Vis: espectroscopía ultravioleta visible
β-gal: β- galactosidasa



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca	35
Tabla 2. Picos característicos de la leche en espectroscopía FTIR.....	76
Tabla 3. Parámetros físico-químicos de las leches de estudio.....	92
Tabla 4. Coeficientes de variación (CV (%)) de las dos réplicas de los sensores y biosensores.....	108
Tabla 5. Valor corregido de la intensidad del pico anódico para cada tipo de leche incluida en el estudio para cada sensor en la lengua electrónica de AgNPs.....	111
Tabla 6. Valor corregido de la intensidad del pico anódico para cada tipo de leche incluida en el estudio para cada sensor en la lengua electrónica de AgNWs.....	111
Tabla 7. Resultados de la calibración y validación de los modelos de clasificación LDA para ambas bioLE.....	114
Tabla 8. Resultados de la calibración y la validación por PLS de las lenguas bioelectrónicas	117



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cifras de negocios de los subsectores industriales en millones de euros en el año 2021 [3].....	25
Figura 2. Esquema de la estructura de un sensor	39
Figura 3. Sustratos BDD	44
Figura 4. Espectro electromagnético [93].....	55
Figura 5. Técnicas espectroscópicas clasificadas en función del método de medida y de si hay o no ruptura de enlaces.	56
Figura 6. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	60
Figura 7. Espectrofotómetro UV-Visible	73
Figura 8. Montaje del complemento ATR para la medida de leche con la técnica FTIR	74
Figura 9. Espectrofotómetro FTIR con el complemento ATR y un controlador de temperatura.....	75
Figura 10. Producto final después del proceso de destilación.....	79
Figura 11. Nanohilos de plata después del proceso de purificación	80
Figura 12. Resultado de la síntesis de AgNPs	81
Figura 13. Preparación de biosensores	82
Figura 14. Montaje celda electroquímica.....	84
Figura 15. Potenciostato/Galvanostato multicanal utilizado para el estudio electroquímico.....	85
Figura 16. Espectro UV-Vis de la leche en distintos porcentajes de dilución, a) sin diluir, b) dilución con un 66% de agua, c) dilución con un 90% de agua, d) dilución con un 99% de agua.....	93
Figura 17. Espectro UV-Vis de una leche de diferente contenido graso diluida con un 99% de agua. En negro leche desnatada, en rojo leche semidesnatada y en azul leche entera.....	94

- Figura 18. Espectro UV-Vis de leches semidesnatadas, pero composición nutricional diferente. En negro leche clásica, en rojo leche sin lactosa y en azul leche enriquecida calcio y vitamina D..... 95
- Figura 19. Espectros FTIR con diferentes scans de una muestra leche con diferente contenido graso: desnatada (negro), semidesnatada (rojo) y entera (azul). a) 32 scans, b) 250 scans, c) 500 scans, d) 1000 scans, e) 1500 scans y f) 2000 scans..... 96
- Figura 20. Espectro FTIR en una leche medida a distintas temperaturas. En negro 30°C, en rojo 45°C, en azul 60°C y en rosa 80°C..... 97
- Figura 21. Espectro FTIR de leches con el mismo contenido nutricional (leche enriquecida con calcio), pero diferente proporción de grasa. En negro la leche desnatada, en rojo la leche semidesnatada y en azul la leche entera. 98
- Figura 22. Espectro FTIR de leches enteras, pero composición nutricional diferente. En negro leche clásica, en rojo leche sin lactosa y en azul leche con adición de calcio y vitamina D. 99
- Figura 23. Espectro UV-Vis de la caracterización de los AgNWs. En rojo los AgNWs sin purificar y en azul los AgNWs purificados. 100
- Figura 24. Caracterización AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis. En negro, AgNPs sin diluir. En rojo AgNPs diluidas (67% de agua). En azul AgNPs diluidas (70% de agua). En rosa AgNPs diluidas (80% de agua). 101
- Figura 25. Espectro UV-Vis de un sensor modificado con AgNWs (negro) y uno modificado con AgNWs/ β -gal (rojo)..... 102
- Figura 26. Espectro FTIR de un sensor modificado con AgNWs (negro) y uno modificado con AgNWs/ β -gal (rojo)..... 103
- Figura 27. Topografía AFM de a) AgNP, b) AgNP+ β -Gal, d) AgNW, e) AgNW+ β -Gal. Perfil AFM de c) AgNP (línea punteada azul) y AgNP+ β -Gal (línea discontinua roja) f) AgNW (línea discontinua negra) y AgNW+ β - Gal (línea verde continua). 104
- Figura 28. Voltamograma dos BDDs sin modificar analizados en buffer fosfato 0,01 M. En negro réplica 1 y en rojo réplica 2. 105
- Figura 29. Estudio de la repetitividad del biosensor de AgNPs + β -Gal + naf en voltimetría en leche clásica desnatada diluida al 50% con KCl 0,01M. 106

Figura 30. Voltamogramas de la reproducibilidad de pares de biosensors basados en a) AgNWs+GaOx+naf (rojo) y AgNPs+GaOx+naf (negro), b) AgNWs+β-Gal+naf (rojo) y AgNPs+ β-Gal+naf (negro) y AgNWs+GOx+naf (rojo) y AgNPs+GOx+naf (negro) en leche desnatada clásica diluida al 50% en KCl 0,01M. 107

Figura 31. Voltamogramas de los biosensores modificados con AgNPs+GaOx+naf (negro) y AgNWs+GaOx+naf (rojo) en a) leche desnatada clásica y b) leche desnatada sin lactosa diluidas al 50% en KCl 0,01M..... 109

Figura 32. Voltamogramas del biosensor de AgNPs+β-Gal+naf en leche clásica desnatada (negro) y en leche sin lactosa desnatada (azul punteado) diluidas en KCl 0,01M al 50%. 110

Figura 33. A la izquierda, PCA de a) LE de AgNWs y b) LE de AgNPs. A la derecha, gráficos loadings de c) LE de AgNWs y d) LE de AgNPs. Resultados de las PCAs de leches de diferente contenido graso: desnatada (tonos rosas), semidesnatada (tonos azules) y entera (tonos verdes); y de diferente contenido nutricional; leche clásica (círculos), leche sin lactosa (cuadrados) y leche enriquecida con calcio (triángulos). En los loadings las redes de biosensores están representadas por AgNWs+ β-Gal o AgNPs+ β-Gal (cuadrados negros), AgNWs+ GaOx o AgNPs+ GaOx (círculos rojos) y AgNWs+ GOx o AgNPs+ GOx (triángulos azules)..... 112

Figura 34. PLS de de las 9 leches UHT analizadas con la bioLE de AgNPs. Leches de diferente contenido graso con adición de calcio (óvalo rojo), leches desnatadas clásica y sin lactosa (óvalo rosa), leches semidesnatadas clásicas y sin lactosa (óvalo verde) y leches enteras clásicas y sin lactosa (óvalo azul). 116

Figura 35. PLS de las 9 leches UHT analizadas con la bioLE de AgNWs..... 116



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de Nernst	45
Ecuación 2. Ecuación de Nernst para pares electroquímicamente reversibles en condiciones normales de temperatura	48
Ecuación 3. Ecuación de transmitancia en función de la intensidad	57
Ecuación 4. Ecuación de relación de absorbancia y transmitancia	57
Ecuación 5. Ecuación de absorbancia en función de la intensidad	57
Ecuación 6. Ecuación de transmitancia en función de la intensidad	58



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid





ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

1. Introducción y objetivos

1.1. Introducción y justificación

La industria de alimentación y bebidas es la primera rama manufacturera del sector industrial en España. Según los últimos datos del INE (Estadística Estructural de Empresas sector Industrial y Directorio Central de Empresas), España factura 130.795,8 M€ de cifra de negocios, lo que representa el 23,3% del sector industrial [1], [2].



Figura 1. Cifras de negocios de los subsectores industriales en millones de euros en el año 2021 [3].

Tal y como se muestra en la Figura 1, el sector lácteo supone casi 10.000 millones de euros al año de volumen de negocio. Asimismo, factura en torno a 13.000 millones de euros al año y produce el 8,5% del empleo del sector agroalimentario, del orden de 60.000 empleos directos. A lo largo de los últimos años, el sector ha experimentado un incremento constante de las cifras de producción y exportación de productos lácteos. Concretamente, durante el año 2021, se estimó que 19.800 ganaderos realizaron entregas de leche, donde se incluye la de vaca (59,6%), la de cabra (24,24%) y la de oveja (16,16%) [3].

Dado el alcance del sector, la industria alimentaria experimenta cambios constantes, en particular en los que se refiere al control de proceso y de producto, haciendo que esté en continuo crecimiento que requieren una estricta supervisión, lo que ha dado lugar a una nueva era industrial conocida como Industria 4.0. Esta cuarta revolución industrial tiene como objeto satisfacer las estrictas necesidades del sector con el propósito de comercializar

productos que no solo sean aptos para el consumo, sino que además implementen procesos de producción rápidos, seguros y que permitan un control digitalizado del mismo a través del desarrollo de sistemas inteligentes. Para ello se acude a instrumentos y recursos como la automatización, Big Data o la Inteligencia Artificial, de forma que se controle de forma precisa todas las etapas de producción de cualquier proceso [4], [5].

Con esta demanda por parte de la industria y la población, surgen nuevos grupos de investigación que estudian posibles mejoras en este sector.

El grupo UVaSens se fundó en 1992 y es dirigido por la profesora y catedrática de Química Inorgánica María Luz Rodríguez Méndez del departamento de Química Física y Química Inorgánica, situado en la Escuela de Ingenierías Industriales. Es un equipo multidisciplinar formado por físicos, químicos e ingenieros, que trabaja en el desarrollo de sensores y biosensores nanoestructurados y en el diseño de narices y lenguas bioelectrónicas para el análisis y control de calidad en alimentación [6].

Este trabajo se encuadra en el marco de una colaboración con la empresa Calidad Pascual, cuyo objetivo es desarrollar sensores y lenguas electrónicas para el análisis de leche.

1.2. Objetivos

Este trabajo ha tenido como **objetivo principal** el desarrollo de dos lenguas bioelectrónicas avanzadas basadas en nanomateriales metálicos para analizar muestras de leche de diferentes contenido nutricional y graso. Una de ellas diseñada a partir de nanohilos de plata (AgNWs) y la otra a partir de nanopartículas de plata (AgNPs).

No existen trabajos previos en los que se hayan utilizado nanohilos de plata para la fabricación de biosensores destinados al análisis de alimentos, por lo que este trabajo de investigación resulta novedoso.

Con esta finalidad de trabajo se pretendieron cumplir los siguientes **objetivos específicos**:

- a) Síntesis de AgNWs y AgNPs a partir del método poliol modificado y el método Creighton respectivamente. Caracterización espectroscópica de los mismos mediante UV-Visible y FTIR.
- b) Diseño de sensores y biosensores basados en ambos nanomateriales y en diferentes enzimas, dos oxidoreductasas (glucosa oxidasa y galactosa oxidasa) y una hidrolasa (β -galactosidasa).



- c) Caracterización de los sensores y biosensores desarrollados mediante UV-Visible, FTIR y AFM para garantizar la adsorción de las enzimas sobre la superficie de los electrodos modificados, así como demostrar las diferencias entre la superficie activa de ambos nanomateriales de plata.
- d) Análisis de la respuesta electroquímica mediante voltamperometría cíclica de las redes de sensores y biosensores en las diferentes muestras de leche UHT.
- e) Estudio del comportamiento analítico mediante parámetros como la reproducibilidad o la repetitividad de los sensores y biosensores desarrollados.
- f) Estudio de la influencia en la relación de aspecto entre los nanohilos y las nanopartículas de plata en la respuesta voltamétrica de sus respectivos sensores y biosensores.
- g) Estudio de las capacidades para discriminar, predecir y clasificar de ambas lenguas bioelectrónicas entre distintas muestras de leche UHT con distintas propiedades nutricionales.

El otro objetivo de este trabajo es el análisis de la leche mediante técnicas espectroscópicas (FTIR y UV-Visible), de forma que se puedan comparar los resultados de las distintas leches y evaluar así su contenido nutricional y graso.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



CAPÍTULO 2

ESTADO DEL ARTE



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



2. Fundamento teórico

2.1. Industria láctea

Según el Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprobó el texto del Código Alimentario Español, se define a la leche natural como “el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas”. Asimismo, se especifica que la denominación genérica de leche comprende única y exclusivamente la leche natural de vaca. Las leches producidas por hembras de otros animales domésticos se designarán indicando además el nombre de la especie correspondiente: leche de cabra, leche de oveja, de búfala, etc. [7].

La leche es un líquido de composición y estructura compleja, blanca opaca, de sabor suave, olor característico y con un pH cercano a la neutralidad. La materia grasa se encuentra en emulsión, las proteínas constituyen una suspensión, mientras que los restantes componentes (lactosa, otras sustancias nitrogenadas, minerales,...) están disueltos [8].

Actualmente existe una necesidad de desarrollar nuevos métodos más fiables, más sensibles y baratos para analizar leche [9]. Una opción son los sensores electroquímicos, muy utilizados en el análisis de alimentos [10]. Este tipo de dispositivos destacan por ser económicos y reutilizables, así como fáciles de preparar y modificar. El empleo de nanomateriales para modificar la superficie de los electrodos está siendo una de las técnicas más exitosas en el desarrollo de sensores electroquímicos dadas sus excelentes propiedades electrocatalíticas, el incremento en el área superficial activa, su conductividad y biocompatibilidad, etc. Con el objetivo de obtener dispositivos más específicos y sensibles [11], se puede incorporar material biológico en su fabricación obteniendo los denominados biosensores [9].

Finalmente, una adecuada combinación de sensores inespecíficos con biosensores junto con diferentes técnicas de análisis quimiométrico, da lugar a las lenguas electrónicas. Son dispositivos que en los últimos años se han desarrollado realizando grandes avances el análisis de alimentos y bebidas [12]–[14], y son capaces de analizar, clasificar, predecir entre muestras leche [12], [15].

2.1.1. Tipos de leche

Según el tratamiento que se aplique a las leches naturales se clasifican en leches higienizadas, certificadas, especiales (concentradas, desnatadas, fermentadas o acidificadas, enriquecidas, adicionadas de aromas y/o estimulantes) o conservadas (esterilizadas, evaporadas, condensadas y en polvo) [7].

La leche higienizada es la leche natural sometida a un proceso tecnológico autorizado que asegure la total destrucción de los gérmenes patógenos y la casi totalidad de la flora banal (flora microbiana), sin modificación sensible de su naturaleza físico-química, características biológicas y cualidades nutritivas. En función del tratamiento térmico que se le aplique se puede distinguir entre [7]:

- Leche cruda: leche que no se ha sometido a ningún tratamiento térmico.
- Leche UHT: son las leches comerciales envasadas y conservadas a temperatura ambiente hasta su apertura. Se calientan hasta 140°C durante un período de tiempo muy breve (25 segundos) para a continuación enfriar rápidamente hasta 30°C.
- Leche pasteurizada: en este caso también se calienta la leche, pero sólo hasta 70°C durante 15 segundos, de forma que se eliminan únicamente los microorganismos patógenos. Por lo tanto, es una leche también comercial, pero con una vida útil mucho más corta y que requiere conservación en frío.

2.1.2. Composición de la leche

La composición de la leche varía considerablemente con la raza de la vaca, el estado de lactancia, alimento, época del año y muchos otros tratamientos. Aun así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizados para indicar si ha ocurrido alguna variación en la composición de la leche [16].

La composición general de la leche de vaca muestra los siguientes valores [8]:

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca

Componentes	Promedios generales g/kg
Agua	881,5
Materia seca	119,5
Lactosa	46,1
Grasa	35,1
Proteína total	31,7
Caseína	25
Albúminas	4,15
Cenizas	6,6
Calcio	1,24
Fósforo	0,94
Magnesio	0,12
Potasio	1,5
Sodio	0,6
Cloro	1,44

- Agua: el 80-90 % de la leche es agua y su cantidad es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria y por las fluctuaciones en el contenido graso que experimenta la leche a lo largo de su ciclo de lactación. Es el componente mayoritario y el medio en el cual coexisten el resto de componentes, por lo que la adecuada cantidad de agua en leche refleja un correcto balance nutricional [16], [17].
- Lactosa: es el principal hidrato de carbono de la leche. Su concentración es relativamente constante y promedia alrededor del 5 %. Es un disacárido formado por la unión de dos azúcares, la galactosa (12 mg/100 g) y la glucosa (14 mg/100 g), con un característico sabor dulce, que en la leche, se ve enmascarado por la caseína. Este azúcar puede ser fermentado por determinados microorganismos para producir ácido láctico, gas carbónico y otros compuestos importantes como el diacetilo. El ácido láctico origina una disminución de pH necesaria para lograr la coagulación en la elaboración de leches fermentadas y quesos [16], [17].

- Proteínas: la mayor parte del contenido en nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteínas, concretamente el 95% de la fracción nitrogenada, y constituyen el componente más importante desde el punto de vista nutritivo. La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 g/L). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche. Existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la cantidad de proteína en la leche, cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína. Es posible diferenciar dos grandes grupos proteicos en la leche, que aparecen de manera diferenciada, las caseínas (80%) y las proteínas séricas o solubles (20%) [8], [16], [17].
 - Caseínas: son fosfoproteínas que debido a sus propiedades físico-químicas, precipitan a un pH de 4,6 a una temperatura de 20 °C. Las caseínas se encuentran asociadas con componentes salinos, como sales de calcio y fosfatos, dando lugar a una estructura compleja llamada micela. Dentro de las caseínas, existen cuatro tipos, alfa (α), beta (β), kappa (κ) y gamma (γ) en proporciones variables, en función de su localización dentro de la micela.
 - Proteínas séricas: llamadas proteínas del suero o proteínas solubles, son el conjunto de sustancias nitrogenadas que se mantienen en disolución cuando las caseínas precipitan. Están formadas principalmente por α -lactoalbúminas, β -lactoglobulinas, seroalbúminas e inmunoglobulinas. Estas proteínas solubles se diferencian de las caseínas por su contenido equilibrado en aminoácidos esenciales que les confieren un excelente valor nutricional, su estructura más compacta y su sensibilidad al calor ya que se desnaturalizan a 90-100 °C formando flóculos.
- Grasas: comúnmente, la grasa constituye desde el 3,5% hasta el 6,0% de la leche, variando su cantidad en función de la raza de la vaca, la alimentación, la estación del año, el estado de lactancia o el número de partos del animal. La grasa se encuentra en la leche en suspensión acuosa en forma de pequeños glóbulos dispersos de mayor o menor tamaño recubiertos de una membrana que la protege de su degradación y en cuyo interior se encuentran los triglicéridos. Esta membrana se puede alterar fácilmente, pudiendo dar lugar a sabores y olores desagradables, que son más acentuados cuanto mayor sea el contenido en materia grasa de la misma. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que se aglutinen entre sí repeliendo



otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. De esta forma, siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión [16], [17].

- Triglicéridos: se tratan de ésteres de ácidos grasos y glicerol. Conforman el mayor componente de la grasa láctea (98%), por lo que de ellos dependen sus características físico-químicas y su composición nutricional.
- Fosfolípidos: se presentan en la grasa en menor proporción, tan solo un 0,8%. Se distribuyen en la membrana de los glóbulos de grasa y en la fase acuosa.
- Minerales y vitaminas: los minerales forman parte de la leche en una proporción muy pequeña, como se puede observar en la Tabla 1. Sin embargo, su presencia eleva el valor nutricional de la leche, además de mejorar la estabilidad entre los componentes solubles y los que se encuentran en estado coloidal como el calcio, el magnesio o los fosfatos. Las vitaminas son partículas orgánicas de pequeño tamaño que no se producen en el organismo de forma natural, por lo que la principal fuente de suministro se encuentra en alimentos, como es el caso de la leche, donde se encuentran vitaminas liposolubles (A, D, E y K) e hidrosolubles (B1, B2, B6, B12 y C) [16], [17].

2.1.3. Propiedades físico-químicas

Los parámetros físico-químicos que se utilizan habitualmente para establecer la calidad de la leche son los siguientes [17], [18]:

- Punto de congelación: es la temperatura a la cual se solidifica el producto. En el caso de la leche se obtiene por debajo de los 0°C, ya que, a pesar de estar formada en su mayor parte de agua, las sustancias disueltas que la componen hacen que disminuya dicho valor. Concretamente la leche de vaca suele tener un punto de congelación entre -0,53°C y -0,57°C.
- Punto de ebullición: temperatura a la cual un elemento pasa de estado líquido a gaseoso. Su valor es un poco superior al agua, por el mismo motivo por el que el punto de congelación es ligeramente inferior. En el caso de la leche, su valor es del orden de 100,17°C.

- Densidad: es un parámetro que no se mantiene constante, sino que varía en función de la temperatura, la concentración de sólidos disueltos y en suspensión y la producción de materia grasa. El valor de la densidad de la leche de vaca a 15°C se encuentra entre $1.0231 \frac{kg}{L}$ y $1.0398 \frac{kg}{L}$.
- Viscosidad: se trata de la resistencia que el líquido opone al fluir. La leche es más viscosa que el agua debido a la materia grasa en estado globular y las macromoléculas proteicas que la componen. La viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura hasta los 70°C, a temperaturas superiores su relación es directamente proporcional. Asimismo, el pH influye en la viscosidad, ya que para valores de pH menores a 6, dicho valor aumenta.
- Acidez y pH: el valor de pH determina la acidez o la alcalinidad de una sustancia. La leche tiene un valor ácido, entre 6.65 y 6.71 en el caso de la vaca, aunque es un parámetro muy dependiente de la temperatura. La acidez de la leche es la suma de la acidez debida a la presencia de caseínas, minerales, ácidos orgánicos y fosfatos, lo que se llama acidez natural, y la debida al ácido láctico y otros ácidos procedentes de la degradación microbiana de la lactosa, llamada acidez desarrollada. La leche de vaca tiene un valor de acidez entre 14°D y 18°D.
- Índice de refracción: en el caso de la leche, es un método determinante para el cálculo de la concentración de proteínas. Las diferentes proteínas de la leche no tienen el mismo índice de refracción, es más elevado cuando menor es el volumen específico.
- Extracto seco total (EST): son los sólidos totales en la leche, es decir, los componentes de la leche a excepción del agua. Tiene un valor medio del 12% en masa.
- Extracto seco magro (ESM): se calcula a partir del valor de extracto seco total y el porcentaje de materia grasa, representando los sólidos totales pero sin la grasa. Tiene un valor medio del 9% en masa.
- Proteínas, lactosa y grasa son también parámetros físico-químicos que caracterizan las leches.

2.2. Sensores

Un sensor es un dispositivo capaz de detectar un cambio en el medio en el que se encuentra (puede ser físico, químico o biológico) y transmitir una señal eléctrica como respuesta a dicho estímulo [19]. A lo largo de los años se ha ido reduciendo su tamaño, facilitando así su transporte y su manipulación [20].

Se puede estructurar un sensor por sus elementos básicos: un receptor, que recibe la información; un transductor, que transforma la señal analítica en una señal eléctrica; un amplificador, ya que, en ocasiones las señales son muy pequeñas y es necesario amplificarlas y finalmente, un procesador analógico que recibe la señal proporcionando una respuesta digital que permite registrar y procesar los datos [21], [22].

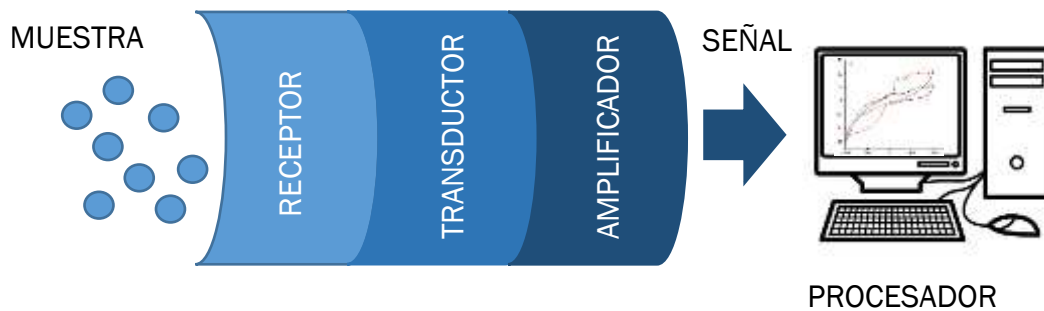


Figura 2. Esquema de la estructura de un sensor

Según la naturaleza de la medida se emplean distintos tipos de receptores, concretamente se distinguen dos [23]:

- Físicos: cuando la información es de carácter físico, es decir, no intervienen reacciones químicas, se contemplan parámetros como la presión, el nivel o la temperatura.
- Químicos: cuando el detector del sensor recibe información a partir de una reacción química. Dentro de éstos se encuentran los biosensores, que como su propio nombre indica, son aquellos en los que el receptor es de origen biológico. Los más comunes son enzimas, anticuerpos o ADN.

A su vez los sensores químicos se pueden clasificar según diferentes categorías según el tipo de transductor utilizado. Algunos de ellos son [11], [23], [24]:

- Ópticos: se basan en la detección de un haz de luz u onda electromagnética durante la interacción con las especies químicas que se desean determinar. Es un método de análisis no destructivo, ya que se basa en el cambio de una característica espectroscópica.
- Térmicos: son aquellos sensores capaces de medir un cambio de temperatura en la superficie del mismo.
- Piezoeléctricos: este tipo de sensores se basan en la microgravimetría, es decir, utilizan los cambios de masa que tiene lugar como una característica de la interacción de las especies químicas con el sensor.
- Electroquímicos: estos sensores se fundamentan en un proceso electroquímico. Las técnicas electroquímicas se caracterizan por ser sencillas, tener un tiempo de análisis corto, ser sensibles a multitud de compuestos químicos y por no requerir procesadores muy complejos. Hay diversos métodos de detección electroquímica en función de la propiedad eléctrica que se vaya a utilizar.
- Resistivos: se mide la variación de conductividad que se produce tras la interacción entre el analito y la película sensible

2.2.1. Biosensores electroquímicos

Los biosensores son aquellos sensores en los que el receptor se modifica con material biológico como enzimas, anticuerpos o ADN. Se aprovecha la especificidad de la relación enzima-sustrato o anticuerpo-antígeno entre dos cadenas de ADN de forma que se eleva su sensibilidad [11].

En este trabajo se han desarrollado biosensores electroquímicos en los que se han combinado enzimas específicas para detectar compuestos en la leche con nanomateriales electrocatalíticos de plata (nanohilos y nanopartículas de plata).

A continuación se describen los materiales sensibles usados en este trabajo.

2.2.1.1. Enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas de forma eficaz, sin alterar el producto final, manteniendo constante la energía de activación y aumentando la velocidad de la reacción [25]. Son moléculas grandes, frágiles,



y estables en condiciones muy concretas de operación, por lo que se caracterizan por tener un alto nivel de fragilidad que hace que la inmovilización enzimática sea un paso crucial en el diseño de biosensores enzimáticos [26].

Como catalizadores, presentan características cruciales que hacen que sean más eficaces que otros catalizadores orgánicos e inorgánicos más tradicionales. Entre ellas destacan su alta especificidad, que está determinada por el centro activo de la enzima, y su eficacia [23], [25]. Las enzimas se pueden clasificar en función de la reacción que catalicen. En el desarrollo de biosensores las más empleadas son las oxidorreductasas, liasas o hidrolasas; aunque también existen las transferasas, isomerasas y ligasas [27].

Las enzimas oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidación/reducción. Al inmovilizarse sobre un electrodo su actividad redox se ve reflejada gracias al análisis electroquímico del mismo. La respuesta de este proceso varía en función del centro activo de la enzima y de la transferencia electrónica. En los sensores de primera generación se inmoviliza la enzima directamente en el sustrato, produciéndose la transferencia de electrones del sustrato y oxidando así la enzima. Los biosensores de segunda generación, utilizan mediadores redox para mejorar la transferencia de electrones que se ve desfavorecida en los de primera generación. Por último, los sensores de tercera generación se basan en la transferencia directa de electrones entre los sitios activos redox de la enzima y la superficie del electrodo en ausencia de mediador electrónico [27], [28].

Al focalizar el trabajo en la industria láctea es necesario implementar enzimas involucradas en la catálisis de las reacciones que suceden en la obtención de procesos lácteos.

- Galactosa oxidasa (GaOx)

La galactosa oxidasa es una enzima oxidorreductasa, es decir, cataliza reacciones redox [27] procedente del hongo *Dactylium dendroides* [29]. Se trata de una metaloenzima de cobre que combina la reactividad de un ligando radical libre con un centro activo metálico. Su centro de cobre adopta geometría de coordinación plana cuadrada o piramidal basada en cuadrados, así mismo tiene cinco ligandos coordinadores: dos tirosinas, dos histidinas y una molécula de disolvente que suele ser agua [30].

La GaOx cataliza la oxidación de alcoholes primarios a sus correspondientes aldehídos, acoplado la oxidación del sustrato en la

reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno. La oxidación del alcohol es regioselectiva y no oxida los alcoholes secundarios [30].

En los productos lácteos, esta enzima se encarga de catalizar la oxidación de la D-galactosa presente en la leche para formar D-Galacto-hexo-dialosa y peróxido de hidrógeno [29].

- Glucosa Oxidasa (GOx)

La glucosa oxidasa es también un tipo de enzima oxidorreductasa que se extrae del hongo *Penicillium amagasakiense* o *Aspergillus niger* [31]. Se trata de una glicoproteína dimérica que consta de dos cadenas idénticas de polipeptídica que están unidas covalentemente mediante enlaces disulfuro. Para actuar como catalizador, la GOx requiere un cofactor, el flavín adenín dinucleótido (FAD). Este último actúa como el aceptor inicial de electrones y es reducido a FADH₂ [32].

Se encarga de catalizar la oxidación de la β -D-glucosa para formar D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno, usando oxígeno molecular como aceptor de electrones. Esta reacción puede dividirse en un paso reductor y otro oxidativo. En la media reacción reductora, la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona, que se hidroliza no enzimáticamente a ácido glucónico [32].

- β -galactosidasa (β -gal)

Esta última enzima es hidrolasa, es decir, que catalizan la ruptura de los enlaces carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno, carbono-azufre y oxígeno-fósforo mediante hidrólisis [27]. Su estructura es un tetrámero de cuatro cadenas idénticas formadas por aminoácidos. Cada cadena consta de cinco dominios, el tercero de los cuales es un conjunto α/β de ocho cadenas que comprende gran parte del sitio activo. Sin embargo, éste incluye elementos de otros dominios y otras subunidades como la región N-terminal de las cadenas polipeptídicas [33].

En este caso la β -gal cataliza la hidrólisis de β -D-galactósidos a monosacáridos. Es decir, se encarga de la ruptura de la lactosa en glucosa y galactosa [34].



2.2.1.2. *Métodos de inmovilización enzimática*

La elección del método de inmovilización enzimática afecta directamente al funcionamiento del biosensor, principalmente a la sensibilidad, la selectividad y la estabilidad, ya que influye en la orientación, la carga, la movilidad, la estabilidad, la estructura y la actividad biológica de la enzima [25].

Los métodos de inmovilización pueden variar desde interacciones débiles basadas en la absorción, atrapamiento, la reticulación o la inmovilización por afinidad hasta su inmovilización mediante enlaces covalentes [26].

Un método muy utilizado en el desarrollo de biosensores es el cross linking (entrecruzamiento), utilizando para ello compuestos como el glutaraldehído. Se trata de un potente reticulante, capaz de reaccionar consigo mismo pero no con la enzima, de forma que mantiene la enzima fija y estable [35]. El glutaraldehído destaca por su simplicidad y la fuerte unión química que se forma entre las moléculas. Su principal inconveniente es que puede producir pérdidas de la actividad enzimática debido a la desnaturalización del sitio activo de la enzima durante el proceso [26].

La técnica de atrapamiento se lleva a cabo enlazando la enzima con un gel o fibra, es fácil de realizar y no requiere ninguna modificación del material biológico, por lo que la actividad enzimática se conserva durante el proceso de inmovilización. La inmovilización que atrapa físicamente la enzima se caracteriza por aportar estabilidad; sin embargo, puede producir barreras en la difusión que disminuyan el rendimiento biosensor [26].

En la década de 1970 la compañía Du Pont desarrolló un ácido perfluorosulfónico por copolimerización de éter de vinilo perfluorado con tetrafluoroetileno llamado Nafion® [36]. Éste no sólo duplica la conductividad específica de la membrana utilizada para la inmovilización, sino que también prolonga la vida útil del biosensor [37].

2.2.1.3. *Tipos de los electrodos y sustratos*

El desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos se realiza utilizando diferentes materiales que se escogen en función de las necesidades que requiera el experimento: en primer lugar, se realiza la selección del sustrato que actuará como electrodo de trabajo y posteriormente, se escogerán los materiales sensibles o nanomateriales para modificarlo y de esta manera amplificar sus propiedades y mejorar su respuesta electroquímica.

Existe una gran variedad de opciones válidas para la fabricación y modificación de sensores y biosensores electroquímicos. Algunos de los sustratos a emplear

son los sensores serigrafados comerciales [38], donde el electrodo de auxiliar y el de referencia están ya incorporados.

De la misma forma, existe la opción de crear y estructurar un sensor o biosensor a partir de un sustrato de elección y modificarlo posteriormente con el material o compuesto de elección. Hay multitud de opciones posibles: sustratos fabricados a partir de un material conductor, como óxido de indio y estaño (ITO) [39], matrices poliméricas [40], sensores de pasta de carbono (CPE) [41] o diamante dopado con boro (BDD) [42]. Este trabajo se centra en el uso del BDD (Figura 3) como sustrato base que actuará como electrodo de trabajo para el estudio electroquímico.

Desde la década de 1950 ha sido posible la producción sintética del diamante a partir de métodos físicos de alta presión y alta temperatura. Posteriormente se han ido modernizando las técnicas de síntesis hasta obtener una red tetraédrica de carbón que aporta dureza, alta conductividad térmica y una elevada resistividad eléctrica; por lo que crea un semiconductor de banda ancha. Aunque a simple vista parezca inútil para el estudio electroquímico, a ambos lados del carbono se encuentran el boro (a la izquierda de la tabla periódica con dopante de tipo p) y el nitrógeno (a la derecha de la tabla periódica con dopante tipo n). El boro ocupa la misma posición que la de los átomos de carbono desplazados con una energía de activación menor a la del nitrógeno y al ser el boro muy favorable para el estudio electroquímico se crea un sustrato de trabajo ideal de diamante dopado con boro [42]–[44].

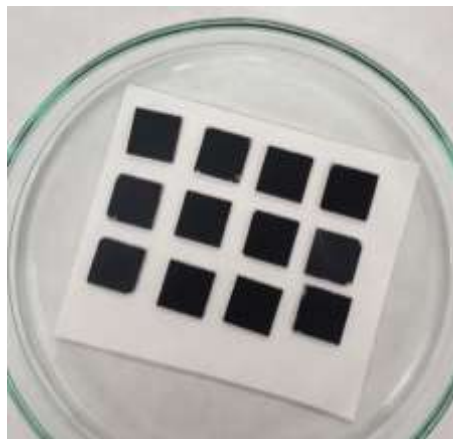


Figura 3. Sustratos BDD

Finalmente, destaca que son capaces de trabajar con multitud de disolventes sin resultar afectados por ellos, no se corroen a elevadas temperaturas o presiones, tienen baja capacitancia, un menor ensuciamiento que otros sustratos, alta estabilidad y biocompatibilidad [42], [45].



2.2.1.4. Métodos de detección electroquímica

Hay diversas técnicas de detección electroquímica que se pueden emplear en función del tipo de analito, se puede medir el potencial eléctrico y/o la corriente eléctrica a partir de una celda electroquímica. Los límites de detección de estas técnicas son menores que los espectroscópicos, pero son medidas más rápidas y baratas [21]. A continuación, se exponen algunas de ellas.

Espectroscopía de impedancias

Esta técnica se basa en aplicar una perturbación sinusoidal, de un potencial eléctrico determinado, a un electrodo y medir la respuesta obtenida en corriente dentro de una celda electroquímica, es decir, se representa el módulo de impedancia frente a la frecuencia. Por ello, la impedancia se define como el cociente entre el potencial aplicado y la intensidad medida a la salida [46].

Este método asume que la celda es un sistema equivalente adecuado capaz de responder a una excitación de corriente alterna que ocurre entre dos electrodos, el de trabajo y el auxiliar. La impedancia varía con la frecuencia, variable, del potencial aplicado, de forma que se representa el módulo de impedancia frente a la frecuencia para obtener el espectro de impedancia [47].

Potenciometría

Este método electroquímico se basa en medir la diferencia de potencial en la superficie del sensor en función de la carga iónica presente en la disolución. Es decir, se crea un potencial de membrana debido a la diferencia de carga entre la superficie del sensor y una disolución patrón interna. El potencial asociado a un equilibrio químico que involucra iones se puede describir de forma cuantitativa por la ecuación de Nernst [22]:

$$E = E^{\circ} - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln K_{act}$$

Ecuación 1. Ecuación de Nernst

Donde:

E: potencial electroquímico

E° : potencial estándar

R: constante de los gases (8,3145 J/K·mol)

T: temperatura (K)

n: número de moles de electrones transferidos en la reacción por mol de reactivo

F: constante de Faraday (96485 C/mol)

K_{act} : constante de equilibrio termodinámica correspondiente al potencial específico de la ecuación

En la fabricación de sensores potenciométricos se utilizan membranas que actúan como material sensible, midiendo el potencial de membrana frente a un electrodo de referencia. Dichas membranas son semipermeables y específicas a la migración de determinados iones [21].

La más utilizada es la membrana de vidrio, concretamente se emplea en los indicadores de pH. Utilizando esta membrana en un electrodo indicador junto con uno de referencia, se establece una cadena de potenciales donde todos son constantes excepto el de la disolución del analito y la superficie externa de la membrana [21].

Asimismo, existen otros tipos de membranas: para detectar gases en aplicaciones ambientales como el CO_2 o el H^+ , o para detectar una variedad de cationes [21].

Son sencillos, económicos y aportan una elevada sensibilidad. Sin embargo, no tienen una elevada vida útil; la saturación de las membranas es un problema recurrente y son muy sensibles a los cambios de temperatura [21].

De la misma forma hay otros tipos de sensores potenciométricos como los de estado sólido, en los que la membrana no está expuesta a un líquido en la parte interior, sino que la membrana está adherida a un material conductor y es posible detectar los cambios de potencial en la superficie, cuando se adhieren diferentes compuestos sobre ella. Estos dispositivos son rápidos, sensibles y permiten analizar gran variedad de sustancias [48].



Amperometría

La amperometría utiliza las medidas de la corriente eléctrica que pasa a través de una disolución para producir una oxidación o reducción del analito. Por lo tanto, esta técnica relaciona directamente la corriente con la concentración de analito [22].

Existen dos tipos de métodos amperométricos [22]:

- Potencial fijo: miden los cambios de la intensidad de corriente manteniendo fijo el potencial en el electrodo de trabajo. Es una técnica no específica y permite determinar masas inferiores a nanogramos de especies electroactivas.
- Potencial variable: este método de amperometría de potencial variable, también llamado voltamperométrico, utiliza la corriente como una función del potencial del electrodo de trabajo de una célula de tres electrodos. Se utiliza para medir las concentraciones de especies electroactivas en las disoluciones como metales y compuestos orgánicos.

Voltamperometría

Como se acaba de indicar, en esta técnica se aplica un barrido lineal de potencial, al que la reacción responderá haciendo circular una corriente. Dicha corriente se origina por la oxidación/reducción del analito en el electrodo [21].

Para poder decir que el proceso electroquímico es reversible la reacción redox se produce fácilmente en un sentido o en otro, por lo que la reversibilidad electroquímica requiere que tanto las especies oxidadas como las reducidas sean químicamente estables [22].

Según la señal de excitación aplicada se distinguen distintos tipos de voltamperometría:

- Voltamperometría lineal: realiza una variación lineal de la señal entre el electrodo de trabajo y el de referencia, permitiendo llevar a cabo polarografías y voltamperometrías hidrodinámicas [21], [22].
- Voltamperometría de pulso diferencial: en este caso cada pulso potencial es fijo y de valor constante, minimizando así los efectos de las corrientes faradaicas, aquellas debidas a la transferencia de electrones [22], [49].

- Voltamperometría de onda cuadrada: consiste en la medida de corriente durante intervalos de tiempo muy cortos en la parte final de la onda positiva y en la parte final de la onda negativa de cada onda cuadrada. En este caso la diferencia entre las intensidades de corriente se registra en función del potencial en escalón. Este método es más sensible y más rápido que el de pulso diferencial debido a que la intensidad de la corriente final es la combinación de corriente anódica y catódica, permitiendo discriminar mejor la corriente faradaica de la corriente capacitiva [50], [51].
- Voltamperometría cíclica: nuevo método cualitativo y cuantitativo que ha eliminado de la primera posición a la polarografía como técnica análisis electroquímica. En esta técnica se aplica un barrido de potencial más rápido, lo que facilita la detección de especies electroactivas, destacando su uso para el estudio de procesos redox y en la caracterización de procesos de transferencia electrónica en bioquímica y química macromolecular [52], [53].

En este tipo de voltametría se emplean electrodos de trabajo de platino, carbono, mercurio o cualquier otro material conductor que sea electroquímicamente inerte en el tramo de potencial de barrido. Otra de sus diferencias respecto a otras técnicas es que el barrido de potencial no es unidireccional, sino que el barrido suele comenzar en 0 V, se dirige a potenciales positivos provocando la oxidación (pico anódico, i_a) y a continuación se invierte el barrido para originar la reducción de la especie oxidada (pico catódico, i_c) [22].

La intensidad de corriente se relaciona con la intensidad de los picos del voltamograma y se relaciona de forma directa con la concentración del analito. De la misma forma, la diferencia de potencial entre los picos es inversamente proporcional al número de electrones transferidos [22]:

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n}$$

Ecuación 2. Ecuación de Nernst para pares electroquímicamente reversibles en condiciones normales de temperatura

E_{pa} : potencial del pico anódico

E_{pc} : potencial del pico catódico

n : número de moles de electrones transferidos en la reacción por mol de reactivo



Para el correcto funcionamiento de los métodos electroquímicos se deben emplear, generalmente, tres tipos de electrodos: un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

Uno de los electrodos de referencia más usados y comunes es el electrodo de plata/cloruro de plata. Su funcionamiento se basa en la medida del potencial de oxidación, de valor conocido, de un hilo de plata sumergido en una disolución diluida de ácido clorhídrico, formándose una capa de cloruro de plata en el hilo para posteriormente introducirlo en una disolución saturada de cloruro de potasio [21].

Por otro lado, se encuentra el contraelectrodo, que permite el paso de corriente a través del electrolito sin interferir en la medida. Normalmente se utilizan hilos o placas de plata.

2.3. Nanociencia y nanotecnología en la industria alimentaria

La nanociencia es la ciencia que estudia y trabaja con estructuras y materiales de tamaño entre 1 nm y 100 nm cuyo interés se basa en las propiedades físicas y químicas que adquiere el compuesto al trabajar a una escala mucho menor a la habitual [54].

Desde los años 70, la nanociencia no ha dejado de crecer y de ramificarse a multitud de campos de aplicación [55]. De esta manera se ha desarrollado de forma paralela la nanotecnología, definida como la técnica para el desarrollo de máquinas, productos o procesos basados en componentes de escala nanométrica. Algunos de los principales sectores de aplicación basados en el uso de materiales nanoestructurados, centran la nanociencia en el procesamiento de la información, la nanobiotecnología, la medicina, la electrónica, entre otros. Otro campo muy activo es el de los sensores, que, gracias a la nanociencia y a la utilización de nanomateriales como materiales sensibles, han logrado mejorar sus prestaciones de forma drástica. De la misma forma, establecen sinergias con la combinación de diferentes tipos de nanomaterial [54], [56].

Actualmente, la industria alimentaria se enfrenta a la necesidad de controlar de forma rigurosa y metódica el proceso de producción, conservación y manipulación de los alimentos. Concretamente, el desarrollo de sensores modificados con nanomateriales ha demostrado ser uno de los grandes avances para llevar a cabo este tipo de análisis en la industria alimentaria. Con la ayuda de estas nuevas técnicas se han impulsado métodos de análisis aplicados al control de calidad de los productos, estudio y eliminación de sustancias tóxicas o contaminantes, detección y neutralización de

microorganismos, control de proceso y al estudio composicional de los alimentos. El empleo de la nanociencia y de la nanotecnología en forma de nanomateriales permite por tanto elaborar productos de mejor calidad, más resistentes, mejor identificados y clasificados y con una mayor durabilidad [56], [57].

Los nanomateriales destacan por su actividad electrocatalítica, su elevada relación superficie/volumen y su gran capacidad de ser modificados en función de las necesidades requeridas, lo que haría mejorar de forma significativa el funcionamiento de los sensores convencionales al aumentar su sensibilidad y su selectividad [9]. Algunos ejemplos de estos materiales son las nanopartículas (NPs) o diferentes nanoestructuras metálicas como las nanofibras o nanoplacas, los nanomateriales con base de carbono como el fullereno o el grafeno, nanopolímeros, dendrímeros, puntos cuánticos o nanoarcillas, entre otros [58], [59].

2.3.1. Nanomateriales metálicos. Nanopartículas y nanohilos

Recientemente, la utilización de nanoestructuras de metales de transición, óxidos metálicos o aleaciones, en diversos campos, incluidos los sensores, se ha convertido en un campo muy activo de investigación [60]. Estos nanomateriales poseen propiedades ópticas, eléctricas, térmicas y catalíticas excepcionales, muy interesantes para implementaren el desarrollo de biosensores electroquímicos. Una de las características principales es la gran variedad de tamaños, estructuras y composiciones disponibles para modificar la superficie del electrodo y con ello, mejorar la transferencia electrónica [58], [59].

Además, cabe destacar sus propiedades biocompatibles, lo que les dota con la capacidad de actuar como catalizadores en reacciones de transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo [61].

Dentro de su gran variedad, los nanohilos y las nanopartículas metálicas destacan por su alta densidad de enlaces insaturados, lo que proporciona grandes áreas de superficie activa donde tienen lugar las reacciones electroquímicas. Además, su implementación aporta estabilidad del sensor y favorece la transferencia acelerada de electrones debido a su elevada conductividad eléctrica y su elevada actividad catalítica en la oxidación/reducción electroquímica [62].

A pesar de proporcionar grandes ventajas frente al resto de materiales, hay una gran diferencia entre los nanohilos y las nanopartículas y es la relación de aspecto. Al aumentar la superficie de contacto se favorece la transferencia de



electrones entre la enzima y la superficie del electrodo. Eso se consigue gracias a la distribución homogénea de la enzima a lo largo de la superficie del nanohilo, obteniendo límites de detección inferiores a los obtenidos con nanopartículas [63].

Los nanohilos de plata son muy demandados debido a su excelente conductividad eléctrica y térmica, su alta relación de aspecto, sus propiedades mecánicas, su flexibilidad y su resistencia. Todas estas cualidades hacen que los AgNWs sean muy prometedores en el campo de los sensores y las películas nanoestructuradas [64].

Ha diversos métodos para la síntesis de AgNWs [65]. Existe el método poliol [66], el método hidrotérmico [67], la síntesis química húmeda [68] o la técnica de fotorreducción por radiación ultravioleta [69]. Este trabajo se ha basado en el método poliol para la síntesis de los nanohilos de plata. El método poliol ha sido el más exitoso para la producción de AgNWs a gran escala y de alta calidad. Se basa en la reducción química de una sal metálica con un disolvente de poliol, como la polivinilpirrolidona (PVP), que evita la agregación de nanopartículas [66].

Los principales factores que influyen en la formación de AgNWs son: la temperatura y el tiempo de reacción, ya que se ha demostrado que el poder reductor aumenta con la temperatura creando así nanohilos de mayor longitud y en menos tiempo; la concentración de PVP, debido a que cuando las cadenas de PVP son más largas se producen AgNWs con una relación longitud-diámetro mayor; la concentración de AgNO_3 , es importante alcanzar un equilibrio en su concentración porque un exceso de la misma implicaría un nanohilo más corto y mayor número de nanopartículas agregadas; y la presencia de iones cloruro, que facilitan el crecimiento de los AgNWs [66].

2.4. Lenguas electrónicas

Una forma de mejorar el análisis de alimentos y bebidas es la combinación de los sensores anteriormente descritos a través de una lengua electrónica.

Según dicta la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC, el término lengua electrónica (LE), se define como un instrumento analítico que incluye una red de sensores químicos no selectivos con especificidad parcial para diferentes componentes de la solución, combinada con un software de reconocimiento de patrones apropiado, capaz de reconocer composiciones cuantitativas y cualitativas de soluciones simples y complejas [70]. Es decir, las lenguas electrónicas combinan una red de sensores inespecíficos, que envían una señal a un software de reconocimiento de patrones que realiza tratamiento

estadístico apropiado para el reconocimiento, discriminación y clasificación de las muestras. Es decir, actúan de manera análoga a como lo hace el sentido del gusto humano, cuando la señal enviada por las papilas gustativas llega al cerebro [15], [71].

Así, las LEs son capaces de distinguir entre muestras dependiendo de sus propiedades y composición. En todos los casos, los sensores deben tener una especificidad parcial para poder responder a diferentes matrices líquidas, en lugar de a un compuesto químico específico y, por ende, ser capaces de dar información global de la muestra [15].

Las lenguas electrónicas por tanto permiten discriminar, analizar, identificar y clasificar muestras complejas, lo que las hace ideales para el control de calidad de procesos y productos del sector de la alimentación [12], [13], [15].

Este estudio se ha centrado en el desarrollo de LEs para el análisis de muestras de leche, ya que, la industria láctea también requiere de estrictos protocolos para garantizar la calidad del alimento.

La caracterización de los productos lácteos, es una tarea difícil debido a la complejidad y variabilidad inherente de la composición de estos productos. Además, el uso de procesos tecnológicos, como el tratamiento térmico para reducir la cantidad de microorganismos entre otros, incide directamente en las propiedades de la leche, así como cambios físicos y químicos que pueden alterar la funcionalidad de las proteínas y la biodisponibilidad de los nutrientes. En consecuencia, el desempeño exitoso de las LEs en el reconocimiento de tipos de leche puede atribuirse a las diferencias en la composición de la leche cruda según el origen animal, las tecnologías de procesamiento aplicadas durante la producción de leche [72], la marca [14], [73], el contenido graso [74]–[76] o el tiempo de almacenamiento [74]. Otros estudios han demostrado la posibilidad de aplicar LEs para detectar y distinguir sustancias nocivas en la leche, que se utilizan como adulterantes en la industria con el fin de elevar su vida útil o aumentar el contenido de proteínas [77], [78]. Los resultados obtenidos en todos los casos muestran que, a pesar de la complejidad de los productos lácteos, es posible categorizar y analizar muestras de manera muy eficiente en todos los casos en los que se utilizan LEs, basándose en diferentes métodos electroquímicos.

En el caso concreto de las lenguas electrónicas voltamétricas, uno de los primeros trabajos desarrollados en el campo de la industria láctea consistió en el desarrollo de una LE basada en técnicas voltamétricas para el análisis del proceso de envejecimiento en jugos de frutas y leche [79]. Continuando con la misma línea de trabajo, un estudio subsiguiente permitió desarrollar una lengua electrónica voltamétrica para la determinación de bacterias en leche fresca durante su almacenamiento [80]. Posteriormente, fue posible la



combinación de las señales obtenidas mediante distintas técnicas electroquímicas como la potenciometría, voltamperometría y conductividad en el desarrollo de una LE para el análisis de leche fermentada [81]. En otro trabajo, se desarrolló una LE basada en sensores serigrafiados, consiguiendo discriminar entre diferentes muestras de productos lácteos en presencia y ausencia de colonias bacterianas [82].

Como resumen decir que, a pesar de los numerosos trabajos realizados en el campo, el análisis de leche mediante lenguas electrónicas no es un problema totalmente resuelto ya que es necesario desarrollar nuevas redes de sensores especialmente dedicadas a este campo y que además sean capaces de tomar datos en un medio tan complejo, como es la leche, de manera eficiente y reproducible.

2.4.1. Análisis estadístico multivariante

Para llevar a cabo el procesamiento de los datos, en primer lugar, se realiza un preprocesado con el fin de seleccionar la matriz de datos adecuada. En segundo lugar, se realiza una reducción dimensional para reducir el altísimo número de variables a un número menor.

Una vez los datos se han procesado se han de tratar estadísticamente con técnicas multivariantes que permiten discriminar entre muestras, (utilizando técnicas como el Análisis de Componentes Principales, PCA, o el Análisis Lineal discriminante, LDA), clasificar entre clases (utilizando por ejemplo SIMCA o Support Vector Machines, SVMC) o relacionar los parámetros químicos obtenidos con los datos obtenidos mediante los sensores utilizando Partial Least Squares (PLS) [83], [84].

2.4.1.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales es un método no supervisado de estadística descriptiva que utiliza la reducción dimensional para discriminar entre muestras de características diferentes. Para estudiar las relaciones que se presentan, se puede transformar el conjunto original de variables en otro conjunto de nuevas variables correlacionadas entre sí, de forma que no tenga repetición o redundancia en la información, se le llama conjunto de componentes principales [85], [86].

Las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra [87].

2.4.1.2. *Análisis discriminante lineal (LDA)*

El análisis discriminante lineal es un sistema muy utilizado para la extracción de elementos y reducción de dimensiones de la matriz de datos de estudio. Los datos se proyectan en un espacio vectorial de menor dimensión de forma que se maximiza la relación entre las clases de muestras, logrando así la máxima discriminación [88].

Para interpretar correctamente la matriz de datos se recurren a métodos de interpolación como la validación cruzada dejando uno fuera (Leave One Out cross-validation). Consiste en dividir la matriz de datos de forma aleatoria entre datos de entrenamiento (todos los grupos de estudio menos uno) y datos de validación (un único grupo), generando tantos grupos como número de muestras se tengan. Este proceso se repite tantas veces como números de muestras haya, dejando un conjunto de muestreo diferente como grupo de validación cada vez. Finalmente, se puede comparar el valor que estima el modelo frente el valor verdadero [89], [90].

2.4.1.3. *Mínimos cuadrados parciales (PLS)*

La regresión de mínimos cuadrados parciales es una técnica supervisada de análisis multivariante orientada a la creación de modelos de predicción a partir de los datos reales, de forma que se utilice para modelar las variables de respuesta de la forma más óptima posible [91], [85].

Se desarrolla para evitar el efecto de la multicolinealidad en las estimaciones de los parámetros de una regresión, hay otros métodos que consiguen este objetivo como la regresión de componentes principales (PCR), pero la PLS es se caracteriza por ser un método predictivo y por modelar y relacionar simultáneamente las variables X e Y [92].

2.5. Técnicas espectroscópicas

Con el fin de evaluar el funcionamiento de la lengua electrónica, las muestras de leche han sido evaluadas también con técnicas espectroscópicas clásicas.

Las técnicas espectroscópicas se basan en el estudio de la interacción materia-radiación electromagnética, de la cual se obtienen espectros que son la representación de la luz absorbida a diferentes longitudes de onda (λ). La radiación electromagnética está formada por fotones que pueden tener diferentes energías que se representan en la Figura 4. La zona de la izquierda se caracteriza por ser la zona de menor longitud de onda, pero de mayor energía, mientras que al avanzar hacia la derecha la energía disminuye al aumentar la longitud de onda [22].

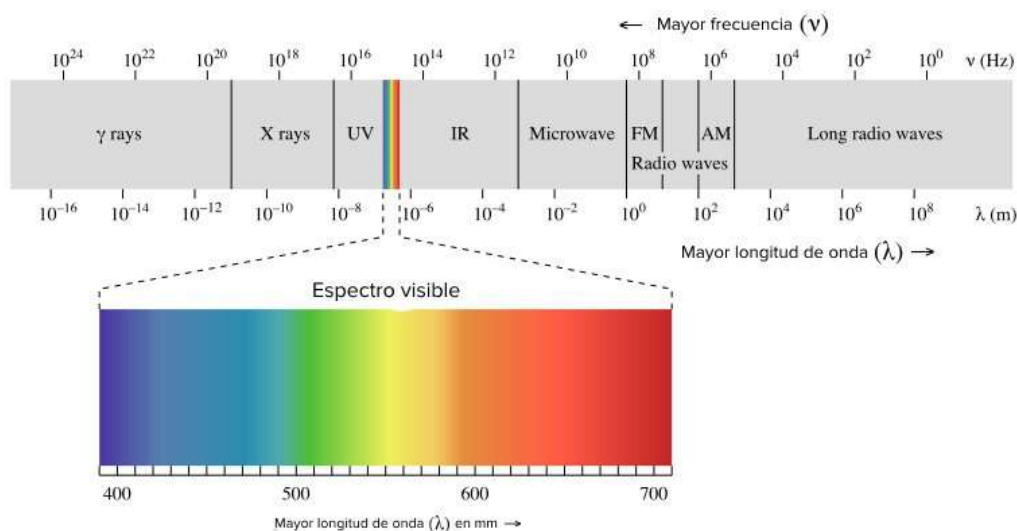


Figura 4. Espectro electromagnético [93]

Cuando la radiación incide sobre una muestra los electrones se excitan y para estudiar este fenómeno se emplean diferentes métodos. Dichos métodos pueden ser de emisión o de absorción, y estos a su vez pueden realizarse a nivel atómico o a nivel molecular [22].

Según el tipo de radiación usada, existen distintos tipos de espectroscopía (Figura 5).

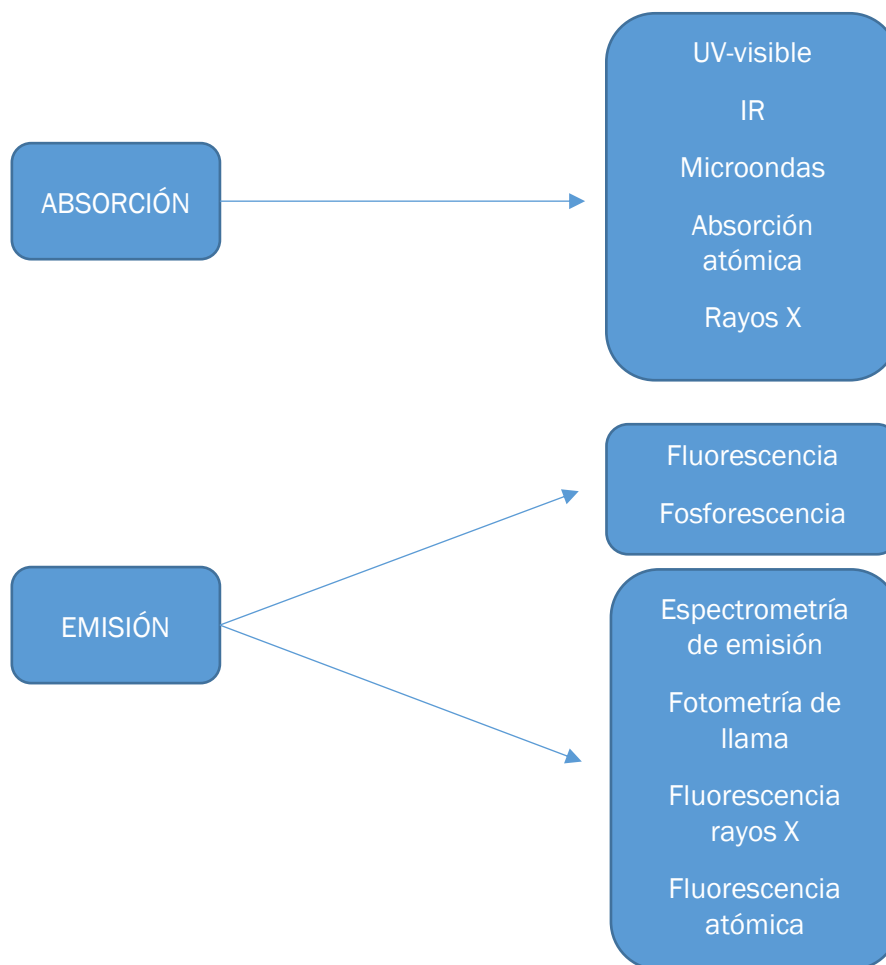


Figura 5. Técnicas espectroscópicas clasificadas en función del método de medida y de si hay o no ruptura de enlaces.

A lo largo de este trabajo se han empleado diferentes técnicas espectroscópicas tanto para la caracterización de los sensores como para el estudio de la leche.

2.5.1. Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)

La espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) es una técnica espectroscópica de absorción molecular que estudia la absorción de un haz de luz al atravesar una muestra. Es una técnica empleada para identificar grupos funcionales y resulta muy útil en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos cromóforos. La radiación ultravioleta provoca una excitación, dando lugar a un cambio de nivel electrónico de los electrones al promocionarse a un

orbital superior. Cuando mayor sea dicho salto, mayor es la energía que necesita el electrón y por lo tanto los fotones tienen mayor frecuencia y una longitud de onda menor [22].

Se puede conocer el espectro de absorción de una especie representando gráficamente la intensidad de la radiación absorbida (absorbancia) o la transmitida (transmitancia) frente a la longitud de onda (λ), la frecuencia (ν), la energía de los fotones o el número de onda (Ecuaciones 3, 4 y 5) [21].

Al medir la transmitancia se puede medir la absorbancia y viceversa a partir de la Ecuación 5 [21].

$$T = \frac{I_t}{I_o}$$

Ecuación 3. Ecuación de transmitancia en función de la intensidad

$$A = -\log\left(\frac{I_t}{I_o}\right)$$

Ecuación 4. Ecuación de absorbancia en función de la intensidad

$$A = -\log(T)$$

Ecuación 5. Ecuación de relación de absorbancia y transmitancia

Donde:

I_o : intensidad de la luz que pasa a través de la celda de referencia

I_t : intensidad de la luz para cada longitud de onda

A: absorbancia de la muestra

T: transmitancia de la muestra

Así mismo, la ley de Lambert-Beer permite relacionar la absorción de la luz con el paso óptico y la concentración de la muestra. Por ello, se pueden cuantificar la presencia de ciertos componentes presentes en una muestra (Ecuación 6) [21].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Ecuación 6. Ecuación de transmitancia en función de la intensidad

Donde:

l: longitud del paso óptico, dimensión de la cubeta (cm)

ε : absortividad (L/mol·cm)

c: concentración (mol/L)

2.5.2. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja se utiliza para analizar las características vibracionales de moléculas, estructuras cristalinas y cristales, utilizando para ello diferentes tipos de instrumentaciones, donde la mayoría están equipados con sistemas de análisis que utilizan transformadas de Fourier [22].

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 1000 μm^{-1} [21]. Se distinguen tres regiones características:

- Infrarrojo cercano: su intervalo de longitud de onda es entre 0,78 y 2,5 μm , lo que corresponde a un intervalo de número de onda de 12800 a 4000 cm^{-1} [21]. Destaca por presentar pocas bandas de absorción, por lo que no es muy usado en la determinación cuantitativa. Sin embargo, no requiere preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la misma [94].
- Infrarrojo medio: el intervalo de longitud de onda recorre desde 2,5 hasta 50 μm , que es equivalente a un intervalo de número de onda de 4000 a 200 cm^{-1} [21]. Permite una fácil identificación de las bandas específicas del compuesto a analizar, por lo que es donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales. Finalmente, el infrarrojo medio es el que aporta más información acerca de la estructura de los compuestos examinados, utilizándose en la identificación de moléculas orgánicas [94].
- Infrarrojo lejano: tiene un intervalo de longitud de onda entre 50 y 1000 μm y un intervalo de número de onda de 200 a 10 cm^{-1} . La región del infrarrojo lejano es especialmente útil en la determinación de compuestos inorgánicos, aunque es una región bastante limitada por las dificultades experimentales que conlleva [21].



En el momento de realizar el análisis es importante la selección correcta del portamuestras. Su material debe ser transparente al paso de la radiación infrarroja, no provocar pérdidas por reflexión o dispersión y alterar la muestra a medir. Los materiales que se utilizan suelen ser fluoruro de calcio (CaF_2), fluoruro de bario (BaF_2), seleniuro de zinc (ZnSe) y sulfuro de zinc (ZnS) [95].

En el FTIR se pueden utilizar distintos accesorios de reflexión especular, de reflexión difusa y de reflexión total atenuada. Se basa en que cuando un haz luminoso llega a la interfase de un segundo medio cuyo índice de refracción es distinto, puede sufrir una reflexión total atenuada. El principio de reflexión total atenuada, ATR, consiste en someter al haz óptico a una o varias reflexiones en la interfase entre el aire y un material transparente el IR de índice de refracción elevado, como el germanio, sobre el que se deposita la muestra [94]. Permite analizar muestras sólidas insolubles, muestras líquidas, o aquellas que no pueden ser colocadas en los soportes habituales para el método de transmisión. Además, requiere poca o ninguna preparación para la mayoría de las muestras y es una de las técnicas de muestreo más versátiles [96].

2.6. Microscopio de fuerza atómica (AFM)

La técnica del microscopio de fuerza atómica, AFM, fue desarrollada por primera vez en 1986 [97]. A través de la interacción de la punta con la muestra, es decir, por la superficie de contacto, se puede estudiar la superficie de la muestra según su rugosidad, sus propiedades eléctricas, magnéticas y mecánicas [98].

En este modelo microscópico la punta, normalmente de silicio, se coloca en un vástago (cantilever) de forma que se produce una deflexión del mismo cuya posición se mide por métodos ópticos. La punta se acerca a la superficie estableciéndose una interacción de Van der Waals que depende de la dinámica punta-muestra. La punta se desplaza sobre la superficie, manteniendo la fuerza constante, de esta forma, se obtiene la topografía de la superficie [21], [99]. En la Figura 6 se muestra el equipo empleado en el desarrollo de este trabajo.



Figura 6. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

Esta técnica requiere superficies muy lisas, de forma que no interfiera la rugosidad del sustrato. El material ideal es la mica, un cristal natural cargado negativamente con una estructura química variable y una alta humectabilidad. Tiene la gran ventaja de que se puede descomponer fácilmente, creando láminas lisas y flexibles. Ha sido muy empleada para la visualización individual de moléculas, concretamente de ácidos nucleicos y proteínas [100], [101].

En este trabajo se han empleado BDDs, que a pesar de ser más rugosos que la mica, aporta un estudio de la superficie mejor que otros materiales.

Una gran ventaja que ha proporcionado esta técnica ha sido la capacidad de caracterizar y estudiar muestras a escala nanométrica. Así mismo, permite medir muestras no conductoras. Es una técnica muy aplicada en el campo de los semiconductores para encontrar defectos en las superficies o para obtener imágenes de dominios magnéticos en los materiales o en biotecnología, logrando imágenes del ADN o de enzimas [21].



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



CAPÍTULO 3

REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



3. Reactivos, materiales y equipos empleados

3.1. Reactivos

Los reactivos empleados en este trabajo son los descritos a continuación:

- Acetona, C_3H_6O (pureza mínima 99 %, QUALITY CHEMICALS, CAS Number: 67-64-1).
- Agua desionizada Milli-Q de conductividad 18,2 $M\Omega \cdot cm$.
- Borohidruro de sodio, $NaBH_4$ (pureza mínima 98%, Alfa Aesar, CAS Number: 16940-66-2).
- Cloruro potásico, KCl (pureza mínima 99,5%, PanReac AppliChem, CAS Number: 7447-40-7).
- Cloruro de cobre (II) dihidratado, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Panreac, Código: 141264).
- Dihidrogenofosfato sódico, NaH_2PO_4 (pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-79-4).
- Etanol, C_2H_6O (alcohol absoluto sin aditivos, pureza mínima 99,8 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 64-17-5).
- Etilenglicol, $C_2H_6O_2$ (anhidro al 99,8 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 107-21-1).
- Galactosa oxidasa, $GalOx$, (obtenida de *Dactylium dendroides*, actividad enzimática mínima 3000 ud/g sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9028-79-9).
- Glucosa oxidasa, GOx , (tipo X-S, obtenida de *Aspergillus niger* liofilizada aproximadamente 75% proteína, actividad enzimática mínima 147000 ud/g sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9001-37-0).
- Hidrogenofosfato sódico, Na_2HPO_4 (pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-80-7).

- Lactato deshidrogenasa, LDH, (obtenida de *rabbit muscle*, actividad enzimática mínima 600 ud/mg proteína, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9001-60-9).
- Nafion® solución de resina perfluorada, (5 % w/w en alcoholes alifáticos inferiores y agua, contiene entre un 15 y un 20% de agua, Sigma-Aldrich, CAS Number: 31175-20-9).
- Nitrato de plata, AgNO₃ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 7761-88-8).
- Polivinilpirrolidona, PVP, (C₆H₉NO)_n, (Sigma-Aldrich, CAS Number: 9003-39-8).
- Ureasa (obtenida de *Canavalia ensiformis* (*Jack bean*), actividad enzimática mínima 63163 ud/g sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9002-13-5).
- β-galactosidasa, βgal, (obtenida de *Aspergillus oryzae*, actividad enzimática mínima 10,9 ud/mg sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9031-11-2).

3.2. Materiales

Los materiales empleados son los siguientes:

- Celda electroquímica de tres electrodos de 3,7 mL: verrerie seule F14 / TUB3 / TUB6, VERRE EQUIPEMENTS (0,19 cm² de área)
- Contraelectrodo placa de platino (2cm x 1 cm).
- Cubeta de cuarzo (10 mm x 10 mm)
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl, 3M Nesslab).
- Sustrato de diamante dopado con boro, BDD (NEOCOAT company (La Chaux-de-Fonds, Switzerland)).



3.3. Muestras de leche

En el desarrollo de este trabajo se han estudiado 9 muestras de leche de diferentes cualidades proporcionadas por Calidad Pascual.

- CD: leche clásica desnatada
- CS: leche clásica semidesnatada
- CE: leche clásica entera
- LD: leche sin lactosa desnatada
- LS: leche sin lactosa semidesnatada
- LE: leche sin lactosa entera
- CaD: leche enriquecida en calcio desnatada
- CaS: leche enriquecida en calcio semidesnatada
- CaE: leche enriquecida en calcio entera

3.4. Equipos

Los equipos que se han utilizado para la realización de este trabajo son:

- Baño de ultrasonidos (Ficher chemical, Thermo Fisher Scientific).
- Bomba peristáltica Perimax de Spetec.
- Centrífuga modelo Sorvall Centrifuge ST 8 (Thermo Scientific, USA).
- Espectrofotómetro infrarrojo modelo FT/IR 6600 (Jasco Corporation, Japón).
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japón).



- Microscopio de Fuerza Atómica Molecular (Cypher, asylum Research AFM)
- Potenciostato/Galvanostato modelo Autolab PGSTAT128N (Metrohm).
- Ultrasonidos Vortex 3 (IKA, USA).





ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



CAPÍTULO 4

DESARROLLO EXPERIMENTAL



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

4. Metodología y desarrollo experimental

4.1. Muestras de leche

Se trabajaron con 9 muestras de leche UHT de diferente composición nutricional y contenido graso. La selección incluye leches clásicas, leches sin lactosa y leches con calcio y vitamina D; a su vez éstas se dividen en desnatada, semidesnatada y entera en función de su contenido graso.

4.2. Caracterización muestras de leche

Con el fin de caracterizar las diferentes muestras de leche, y evaluar su contenido nutricional y graso, se han estudiado mediante las técnicas espectroscópicas UV-Visible y FTIR.

4.2.1. Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis)

Se han utilizado cubetas de cuarzo donde se deposita la muestra de leche. Se realizaron las medidas en absorbancia en el rango visible, es decir, con una longitud de onda de entre 200 nm – 800 nm, en el espectrofotómetro mostrado en la Figura 7.



Figura 7. Espectrofotómetro UV-Visible

Con la técnica UV-Visible se relacionaron bandas de absorción características de la leche con la cantidad de grasa de la misma. La grasa de la leche absorbe la luz ultravioleta a aproximadamente 205, 230 y 270 nm. La absorción a 205

nm se debe a la presencia de dobles enlaces en los grupos de ácidos grasos, mientras que la absorción a 230 y 270 nm se debe a dienos y trienos conjugados respectivamente [102].

4.2.2. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Para caracterizar las muestras de leche se ha empleado el accesorio ATR y por lo tanto no se ha necesitado ningún sustrato para la realización de las medidas. Como se muestra en la Figura 8 se ha colocado un soporte de forma que el método de análisis esté lo más regulado posible y así asegurar que las condiciones de medida sean las mismas para todas las muestras estudiadas.



Figura 8. Montaje del complemento ATR para la medida de leche con la técnica FTIR

Para ello, se ha trabajado en absorbancia con infrarrojo medio. De forma genérica se relaciona FTIR con transmitancia, sin embargo en este trabajo se ha escogido la absorbancia, ya que es un término actualmente mucho más utilizado que la transmitancia [103].

De la misma forma, se ha trabajado con diferente número de barridos hasta optimizar el proceso en 1000, valor para el cual se consigue una buena resolución del espectro sin excederse en el tiempo de medida. Al mismo tiempo, se estudiaron las diferencias en la leche en función de la temperatura, utilizando para ello un controlador de temperatura programable (Figura 9)

incrementando la temperatura desde una temperatura ambiente hasta 80°C, optimizando el proceso finalmente a ésta última.

En el proceso de acondicionamiento es crucial no producir grandes choques de temperatura entre la superficie de la muestra y la del ATR, por lo que antes de la medida se acondiciona la muestra de leche a la temperatura deseada.



Figura 9. Espectrofotómetro FTIR con el complemento ATR y un controlador de temperatura

Para la correcta identificación de los compuestos de la leche es crucial conocer su composición, sus tipos de enlaces y las longitudes de onda donde se ven reflejadas dichas moléculas. Dichos valores se ven reflejados en la Tabla 2 [103]-[105].

Tabla 2. Picos característicos de la leche en espectroscopía FTIR

Componente	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de enlace	Modo de vibración
Proteínas	3300	N-H	Tensión
	1660-1650	C=O	Tensión
	1541-1547	N-H	Flexión
	1241-1251	C-N	Tensión
Grasas	3005	=CH	Tensión
	2925-2927	-CH ₃ , -CH ₂ , -CH	Tensión antisimétrica
	2854-2855	-CH ₃ , -CH ₂ , -CH	Tensión
	1747	C=O	Tensión
	1463	-CH ₂	Flexión
	1160	C-O	Tensión
	960	-HC=CH-(<i>trans</i>)	Flexión fuera del plano
	715	-HC=CH-(<i>cis</i>)	Flexión fuera del plano
Carbohidratos	1150-1030	C-O, C-C, C-O-C	Tensión
	1000	Anillo carbohidratos	Anillo de vibración

4.2.3. Condicionamiento de leche para medidas electroquímicas

Para favorecer la conductividad de las muestras de leche se emplea KCl 0,1M actuando como electrolito en el estudio voltamétrico. La proporción de leche y KCl es 1:1, de forma que, si se necesitan 5mL totales (ya que es la capacidad aproximada de la celda electroquímica) se mezclaron 2,5 mL de la leche de interés con 2,5 mL de KCl 0,1M.



4.3. Preparación de los biosensores nanoestructurados

4.3.1. Preparación de disoluciones

Para la realización de los sensores y medidas electroquímicas ha sido necesaria la preparación de distintas disoluciones.

4.3.1.1. *Borohidruro de sodio, NaBH₄*

Su uso ha sido necesario en la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs). Se preparó una disolución 2mM de NaBH₄, para ello se pesan 8 mg de la muestra sólida y se enrasa en un matraz de 100 mL con agua desionizada Milli-Q hasta completar el volumen.

4.3.1.2. *Cloruro de cobre (II), CuCl₂*

Esta disolución se ha empleado en el procedimiento de síntesis de los nanohilos de plata (AgNWs). Para la obtención de una disolución de concentración $1,5 \cdot 10^{-4}$ M, como ha sido este caso, se debió pesar 0,1 mg y se disolvió en un matraz de 5 mL con etilenglicol hasta enrasar.

4.3.1.3. *Cloruro potásico, KCl*

Para preparar una disolución de 500 mL se pesaron 3,728 g del compuesto y se enrasó con agua desionizada Milli-Q.

4.3.1.4. *Buffer Fosfato*

La disolución de buffer fosfato se emplea tanto para la preparación de las enzimas, como para el estudio de la respuesta electroquímica de los BDDs. Se realiza una disolución de pH 7 0,01M, para preparar 1 L, se pesan 0,732 g de NaH₂PO₄ junto con 0,539 g de Na₂HPO₄ y se lleva a un matraz aforado de 1L y se completa con agua desionizada Milli-Q.

4.3.1.5. Nitrato de plata, AgNO_3

El nitrato de plata ha sido necesario en dos síntesis distintas, la de los nanohilos de plata (AgNWs) y la de las nanopartículas de plata (AgNPs), por lo que se han preparado dos disoluciones diferentes.

Para la síntesis de AgNWs se prepara una disolución una disolución 0,12M de AgNO_3 . Para ello, se pesaron 102 mg del producto en un vidrio de reloj y se añadieron a un matraz aforado de 5 mL para enrasar posteriormente con etilenglicol.

Por otro lado, para la síntesis de AgNPs, se preparó una disolución 1mM de AgNO_3 , pesando para ello 16,8 mg y enrasando en un matraz de 100 mL agua desionizada Milli-Q hasta completar el volumen.

4.3.1.6. Polivinilpirrolidona, PVP

Una de las disoluciones principales de la síntesis de AgNWs es la PVP. Se necesita una disolución 0,36 mM, para ello se pesaron 0,099 g de PVP y se disueltó con etilenglicol en un matraz de 5mL hasta enrasar.

4.3.2. Síntesis de nanohilos de plata (AgNWs)

Para la preparación de los nanohilos de plata se ha seguido una modificación del método del poliol [106].

Este método se basa en la reducción de un precursor de plata, AgNO_3 , en presencia de etilenglicol como agente reductor. Además, se utiliza polivinilpirrolidona, PVP, como surfactante, lo que permiten reducir la tensión superficial en el fluido [106] y facilitar la dispersión de los AgNWs. También se añade cloruro de cobre (II), CuCl_2 , para promover el crecimiento de los AgNWs y evitar la presencia de iones libres de Ag^+ en la solución mediante la formación de AgCl [63].

EL primer paso en este proceso de síntesis es calentar 5mL de etilenglicol en un baño de agua a 160°C con agitación constante a 400 rpm en un matraz redondo de dos bocas, una de ellas conectada a reflujo y la otra tapada con un tapón para evitar la evaporación del etilenglicol. Después de 5 minutos, en los cuales se ha homogeneizado la temperatura y las condiciones de trabajo, se adicionan 50 μL de la disolución de CuCl_2 preparada con antelación y se deja reaccionar en las mismas condiciones durante 5 minutos. A continuación, se

añaden gota a gota 2,5mL de AgNO_3 y 5mL de PVP de forma simultánea con una bomba peristáltica y se deja reaccionar en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante una hora. Durante este tiempo la disolución toma inicialmente un color amarillo característico, debido a la presencia de iones de plata, para posteriormente adquirir un tono grisáceo (Figura 10) que refleja la presencia de plata metálica. Una vez concluida la reacción, se deja enfriar a temperatura ambiente [63].

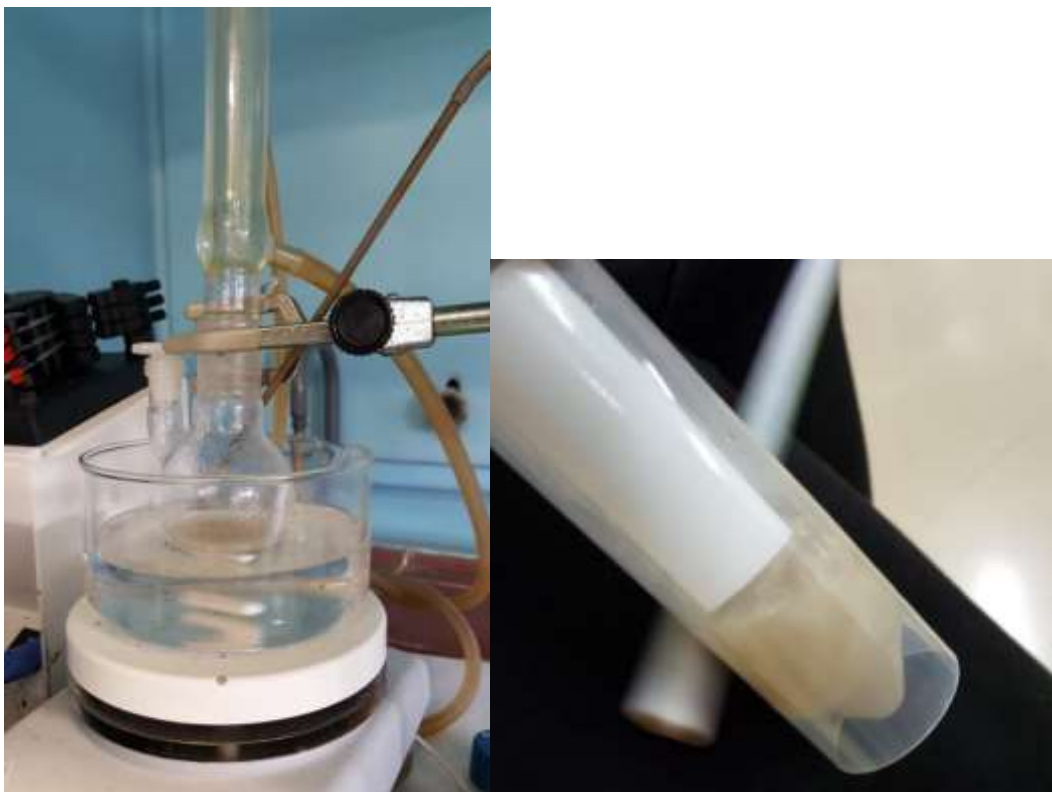


Figura 10. Producto final después del proceso de destilación

Como última parte del proceso, es necesario purificar el producto realizando varios lavados. En primer lugar, se añade etanol y se centrifuga a 2000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente se elimina el sobrenadante que contiene los subproductos de la reacción y otros nanomateriales de menor tamaño que los AgNWs (normalmente nanoclusters o nanopartículas de plata) y se vuelve a añadir etanol para un nuevo lavado. Este proceso se realiza tantas veces como se crea necesario hasta obtener un sobrenadante transparente, lo que implica que ya no hay impurezas que eliminar [63]. En la Figura 11 se muestran los nanohilos purificados y almacenados en tubos Eppendorf.

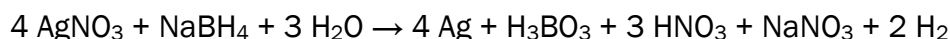


Figura 11. Nanohilos de plata después del proceso de purificación

4.3.3. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

Para la obtención de las nanopartículas de plata se empleó el método Creighton [107], uno de los más comunes actualmente ya que permite obtener nanopartículas de aproximadamente 10 nm, con una distribución pequeña de tamaños.

La reacción que tiene lugar para la formación de las nanopartículas es la siguiente:



Donde se utiliza el NaBH_4 como agente reductor y AgNO_3 como precursor metálico.

Se prepara una disolución 2mM de NaBH_4 y una disolución 1mM de AgNO_3 . Con los reactivos listos se prepara un baño de hielo, añadiendo 30 mL de NaBH_4 en un matraz Erlenmeyer y dejando agitar a 400 rpm hasta que la temperatura sea uniforme, posteriormente se añade gota a gota, aproximadamente una gota por segundo, 10 mL de AgNO_3 con pipeta de vidrio. Una vez finalizado se obtiene una solución de color amarillo (Figura 12), que indica la presencia de nanopartículas de plata. Debido a su alta fotosensibilidad es necesario guardar el producto en la nevera cubierto con papel de aluminio.

Las condiciones de reacción deben ser controladas cuidadosamente para obtener soluciones estables. Si la agitación es continuada una vez que la adición de la sal de plata se concluye, comienza la agregación de partículas y la solución amarillo claro se vuelve amarillo oscuro, violeta, verde o gris, después de lo cual ocurre la precipitación. También ocurre agregación si la reacción es interrumpida antes de terminar la adición de AgNO_3 .

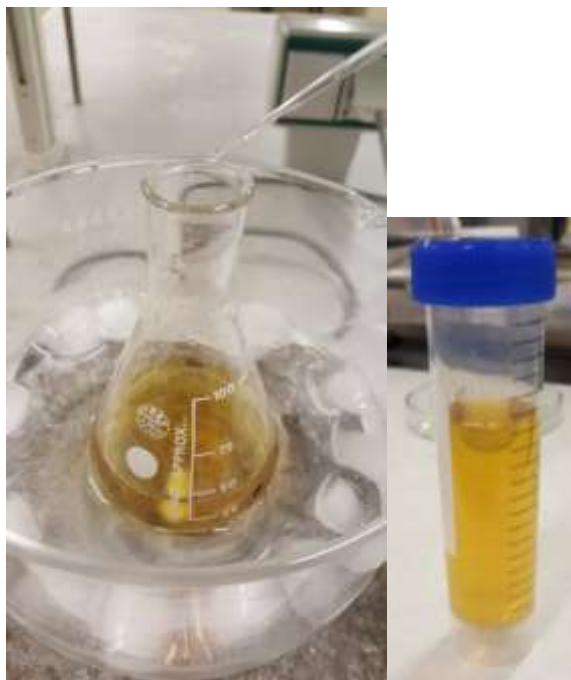


Figura 12. Resultado de la síntesis de AgNPs

4.3.4. Preparación de las enzimas

En este caso se prepararon alícuotas, en disolución buffer fosfato 0,01 M, de concentración 5mg/mL para cada una de las enzimas utilizadas. Para ello se pesan 5 mg de la enzima y se disuelven 1 mL de buffer fosfato. Finalmente, se conservan en congelador a -18°C muestras de 55 μL en tubos Eppendorf.

4.3.5. Preparación de sensores y biosensores

Se desarrollaron diferentes sensores y biosensores con el objetivo de crear dos lenguas bioelectrónicas, bioLEs, en ellas se han utilizado sensores basados en AgNWs o AgNPs y biosensores formados por la combinación de AgNWs+Enzima o AgNPs+Enzima.

El proceso de preparación de los sensores ha sido el mismo en todos los casos, variando únicamente el nanomaterial y la enzima. En la Figura 13 se representa de manera esquemática el método de preparación involucrado en el desarrollo de los biosensores.

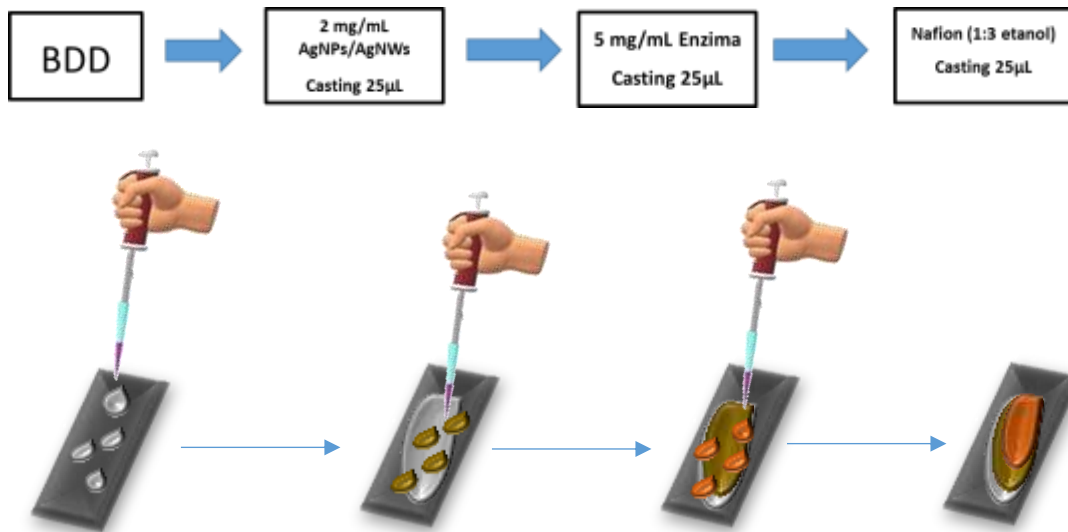


Figura 13. Preparación de biosensores

A partir del sustrato limpio, en este caso BDD, se añaden con la técnica drop casting 25µL de AgNPs/AgNWs con concentración 2mg/mL en la cara conductora del sustrato. Trascorrida una hora aproximadamente se emplea el mismo método y se depositan 25µL de la enzima en concentración 5mg/mL. Tras una hora más de secado al aire, se añade finalmente el inmovilizador enzimático, 25µL de Nafion® disuelto en etanol con una proporción 1:3 respectivamente. Este último paso únicamente necesita un secado de 20 minutos, concluido este tiempo ya se tendría el sensor preparado.

AL finalizar las medidas los sustratos se pueden lavar y reutilizar. El proceso de limpieza consiste en sumergir los sustratos en acetona y sonicarlos para un primer lavado más superficial de aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, se introducen en una disolución piraña de 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y 1 mL de agua oxigenada (H₂O₂), donde se limpian en profundidad y se elimina cualquier resto adherido a la superficie del electrodo. Finalmente, se limpian los electros de los restos de la disolución piraña en agua durante 2 minutos y se sumergen en etanol durante 1 minuto para su secado posterior al aire.



4.4. Caracterización de los sensores y biosensores basados en nanoestructuras

Como se ha comentado al inicio del trabajo, se han desarrollado dos lenguas electrónicas con dos nanomateriales de estructura diferente, una con AgNWs y otra con AgNPs.

Ambos elementos han sido sintetizados en el laboratorio para su implementación en este trabajo.

Los AgNWs son materiales extremadamente novedosos, por lo que existen diferentes formas de prepararlos. Las dimensiones y estabilidad dependen de las condiciones de preparación. Por eso, en este trabajo se ha mejorado el método con el fin de obtener una distribución homogénea de tamaños. Por su parte, aunque las AgNPs se obtienen de una forma más sencilla, también pueden tener una gran dispersión de tamaños si no se ha realizado la síntesis de una forma metódica y controlada, por lo que su optimización será igualmente de gran importancia. Una vez sintetizados, los nanomateriales se han caracterizado mediante diferentes técnicas.

Para la caracterización con UV-Visible se ha depositado el nanomaterial en un sustrato de cuarzo, uno de ellos con AgNWs o AgNPs y otro con los nanomateriales (AgNWs o AgNPs) en presencia de la enzima de interés. La preparación de éstos se ha realizado en las mismas condiciones que los sensores y biosensores.

Asimismo, se han caracterizado las mismas combinaciones de materiales mediante FTIR en un sustrato de ZnSe, cuyo fin es confirmar la correcta adsorción de la enzima sobre la superficie de los electrodos modificados.

Finalmente se realizó una caracterización estructural mediante AFM de los sensores y biosensores en el sustrato BDD. La finalidad es el estudio de la relación de aspecto entre los AgNPs y los AgNWs, la respuesta topográfica de éstos en comparación con los modificados enzimáticamente y las diferencias que se reflejan entre ellos.

4.5. Caracterización electroquímica

Para el estudio de la respuesta electroquímica de los sensores y biosensores se empleó la voltametría cíclica. Con el fin de controlar mejor el área de contacto en los electrodos, no se empleó una celda electroquímica estándar, sino que se adquirió una diseñada específicamente con este fin (0,19 cm² de área). A pesar de su estructura más novedosa, consta de los mismos elementos

que la convencional (Figura 14): un electrodo de referencia (colocado en la parte superior), un electrodo de trabajo (conectado en uno de los laterales) y un contraelectrodo (en este caso de platino, colocado en el otro lateral de la celda de frente al electrodo de estudio).

Para el montaje de la celda se deben colocar los dos electrodos laterales de forma que queden fijos y sin fugas que ocasionen alteraciones en la medida. Con los laterales bloqueados, se añaden 5 mL de la mezcla de KCl 0,1M y la leche de estudio. Finalmente, se sumerge el electrodo de referencia para cerrar el circuito.



Figura 14. Montaje celda electroquímica

Antes de realizar las medidas es crucial realizar ciertas comprobaciones. Es importante comprobar que no haya burbujas en las superficies de los electrodos, ya que, si el analito no entra en contacto con su superficie, no se realizará una medida correcta. Asimismo, las conexiones con los extremos de los electrodos deben estar fijas y sin humedades que puedan ocasionar un cortocircuito.



Figura 15. Potenciostato/Galvanostato multicanal utilizado para el estudio electroquímico

Una vez preparada la celda electroquímica, se conecta al Potenciostato/Galvanostato mostrado en la Figura 15. Se selecciona el intervalo de potencial sobre el que se realizan las medidas, concretamente, de -1V a 1V , iniciando la medida en 0V . La velocidad de barrido es de 100 mV/s y se estableció un tiempo de acondicionamiento de 5 segundos. En total se realizaron 10 ciclos en cada medida, de forma que la evolución de los ciclos permita asegurar una estabilidad en la medida. Por este motivo, se seleccionó el último ciclo como voltamograma representativo de la medida.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid





ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



CAPÍTULO 5

RESULTADOS



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



5. Resultados experimentales y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en este trabajo. Señalar que el trabajo que se muestra a continuación ha sido publicado en una revista indexada internacional con alto índice de impacto. El artículo en cuestión se encuentra adjunto como anexo al final de este trabajo.

5.1. Análisis espectroscópico de las leches UHT

El elemento de estudio de este trabajo es la leche. Concretamente leches de diferente contenido nutricional y grasa.

Los parámetros fisicoquímicos fueron proporcionados por calidad Pascual y se obtuvieron mediante métodos estándar clásicos para la determinación de acidez, densidad, grasa, proteínas, contenido de lactosa, materia seca total (EST) y materia seca no grasa (ESM). Todos estos parámetros se obtuvieron según la normativa vigente que rige el sector [108] y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos de las leches de estudio

Leches	Acidez (°D)	Densidad (g/mL)	Grasa (%m)	Proteínas (%m)	Lactosa (%m)	E.S.M (%m)	E.S.T (%m)
Clásica desnatada (CD)	12,65	1033,55	0,32	3,3	5	9,02	9,33
Clásica semidesnatada (CS)	12,55	1031,60	1,56	3,27	4,91	8,91	10,47
Clásica entera (CE)	12,17	1029,38	3,56	3,21	4,85	8,78	12,33
Calcio desnatada (CaD)	15,82	1039,47	0,29	3,93	5,59	10,51	10,8
Calcio semidesnatada (CaS)	16,06	1037,29	1,55	3,9	5,49	10,4	11,95
Calcio entera (CaE)	15,86	1035,71	3,55	3,91	5,54	10,45	14
Sin Lactosa desnatada (LD)	12,67	1033,57	0,31	3,29	0,36	9,02	9,33
Sin Lactosa semidesnatada (LS)	12,19	1032,09	1,59	3,31	0,42	8,99	10,57
Sin Lactosa entera (LE)	11,98	1029,4	3,59	3,23	0,31	8,82	12,41

5.1.1. Análisis de leche en UV-Visible

Las muestras de leche se caracterizaron con espectroscopía UV-Vis, que puede dar información sobre el contenido graso. La leche es un medio complejo con grasas y proteínas en suspensión. Por esta razón, y con el fin de garantizar el correcto análisis de las muestras de leches, en primera instancia se realizó un proceso de optimización para poder definir los parámetros de trabajo que

permitan registrar espectros reproducibles y de los que se pueda extraer información.

Por esta razón, la caracterización UV-Vis comenzó optimizando las condiciones de medida, en concreto se buscó la dilución óptima, de la leche en agua para la correcta identificación de sus componentes.

Una vez optimizado el método de análisis, se estudiaron las 9 leches UHT con esta técnica. El primer paso fue diluir la leche para disminuir la concentración de sus componentes. Para ello, se seleccionaron diferentes porcentajes de dilución: 66%, 90% y 99% de agua en leche (Figura 16).

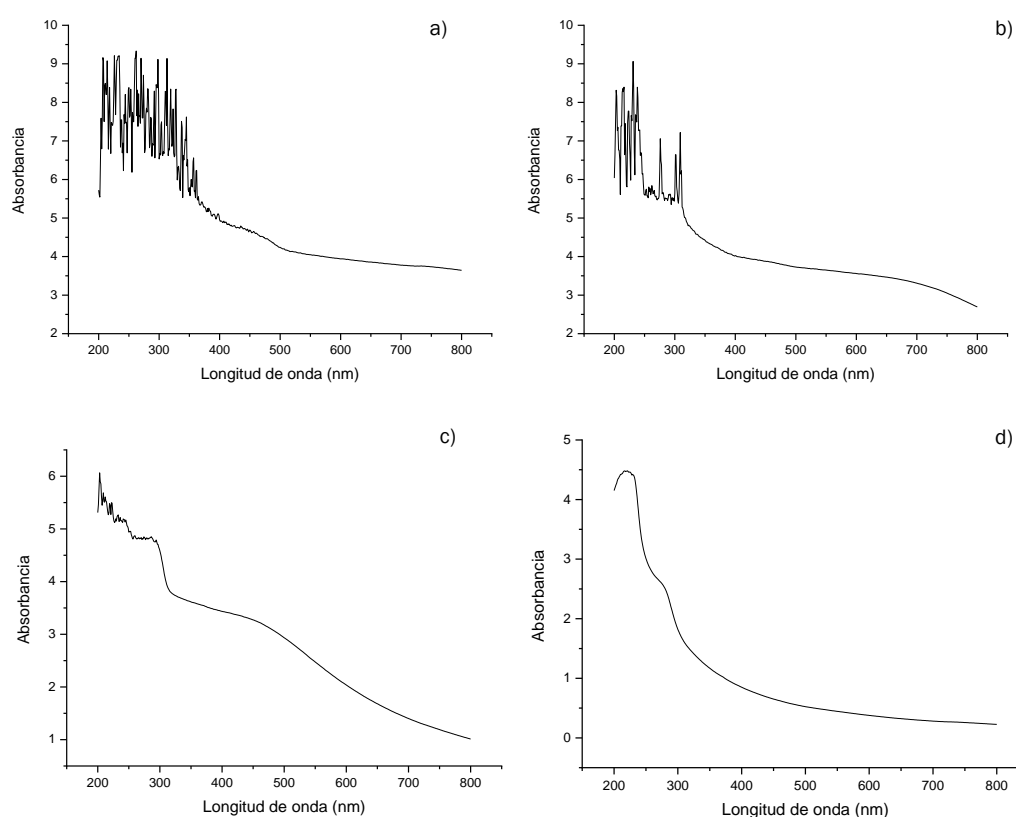


Figura 16. Espectro UV-Vis de la leche en distintos porcentajes de dilución, a) sin diluir, b) dilución con un 66% de agua, c) dilución con un 90% de agua, d) dilución con un 99% de agua.

Como se ve en la Figura 16a), los espectros UV-Visible de leche sin tratar tienen un alto nivel de ruido y no presentan la información de forma clara.

Tal y como se observa en la Figura 16d), se determinó que una dilución al 99% de agua proporciona resultados libres de interferencias y con los picos perfectamente identificados.

En la Figura 17 se recogen los espectros de la leche desnatada, semidesnatada y entera. Como era de esperar, la intensidad de absorción aumenta como lo hace el contenido de grasa (menor intensidad para la desnatada representada en color negro, y superior la entera de color azul) en las longitudes de onda de 230 nm y 270 nm, lo cual permite determinar su concentración y confirma la calidad de los espectros con ese porcentaje de dilución.

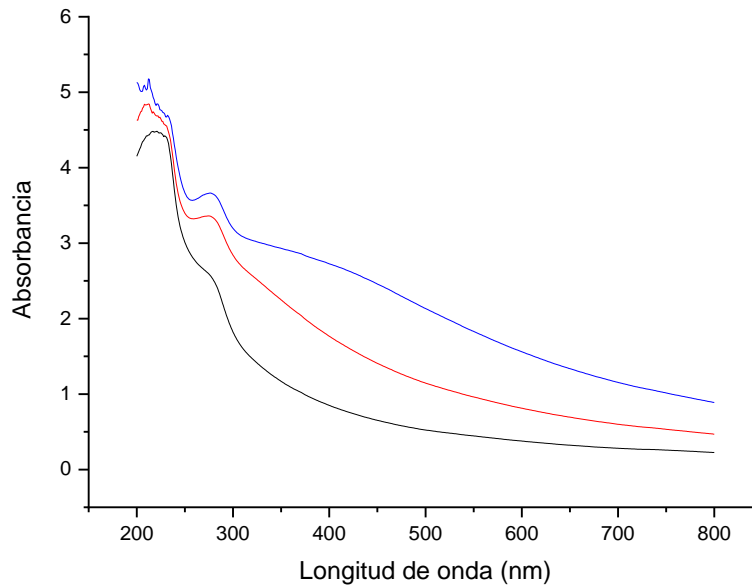


Figura 17. Espectro UV-Vis de una leche de diferente contenido graso diluida con un 99% de agua. En negro leche desnatada, en rojo leche semidesnatada y en azul leche entera.

Una vez optimizado el método, se ha determinado el espectro de absorción de las 9 muestras de leche. Para ello todas las muestras han sido diluidas con un 99% de agua.

A continuación, se muestra un ejemplo de estos resultados. Se ha decidido mostrar un resultado representativo seleccionando un grupo de las 9 leches UHT analizadas debido a que la respuesta obtenida con el resto es similar a la representada.

En la Figura 18 se muestra la señal proporcionada por muestras de leche con un contenido graso concreto (leche semidesnatada en este caso) pero con diferente contenido nutricional. Se puede observar que la diferencia entre muestras no es tan clara, ya que el contenido graso de las leches se asemeja más, aunque las diferencias entre muestras se pueden justificar con la presencia o ausencia de otros componentes. Por ejemplo, la leche sin lactosa (espectro rojo) sufre una adulteración en su composición al eliminar dicho azúcar, por lo que no es de extrañar que haya un desequilibrio en el contenido graso que balancee la ausencia de lactosa en su composición.

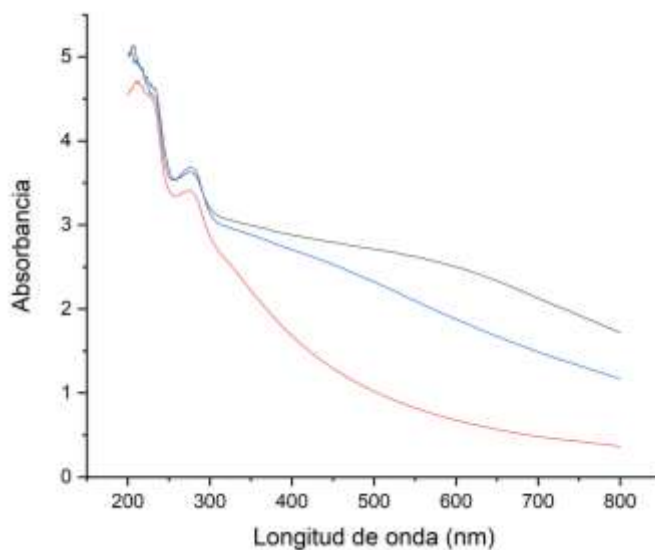


Figura 18. Espectro UV-Vis de leches semidesnatadas, pero composición nutricional diferente. En negro leche clásica, en rojo leche sin lactosa y en azul leche enriquecida calcio y vitamina D.

5.1.2. Análisis de muestras de leche mediante FTIR

Al igual que la caracterización mediante espectroscopía UV-Visible, se planteó un proceso que optimizara el análisis de las muestras de leche mediante FTIR.

En este caso se realizó un estudio que determinara el número de barridos más adecuado y las condiciones de temperatura idóneas para la correcta medida de la leche.

En primer lugar, se realizaron diversas pruebas variando el número de barridos en la medida con el fin de obtener un equilibrio entre el tiempo de medida y la relación señal/ruido del espectro. Esto se debe a que a mayor número de barridos el ruido registrado se va corrigiendo y el resultado es un espectro más limpio y con menos interferencias. Sin embargo, un mayor número de barridos implica más tiempo de análisis, lo cual obstaculiza y alarga la medida demasiado tiempo.

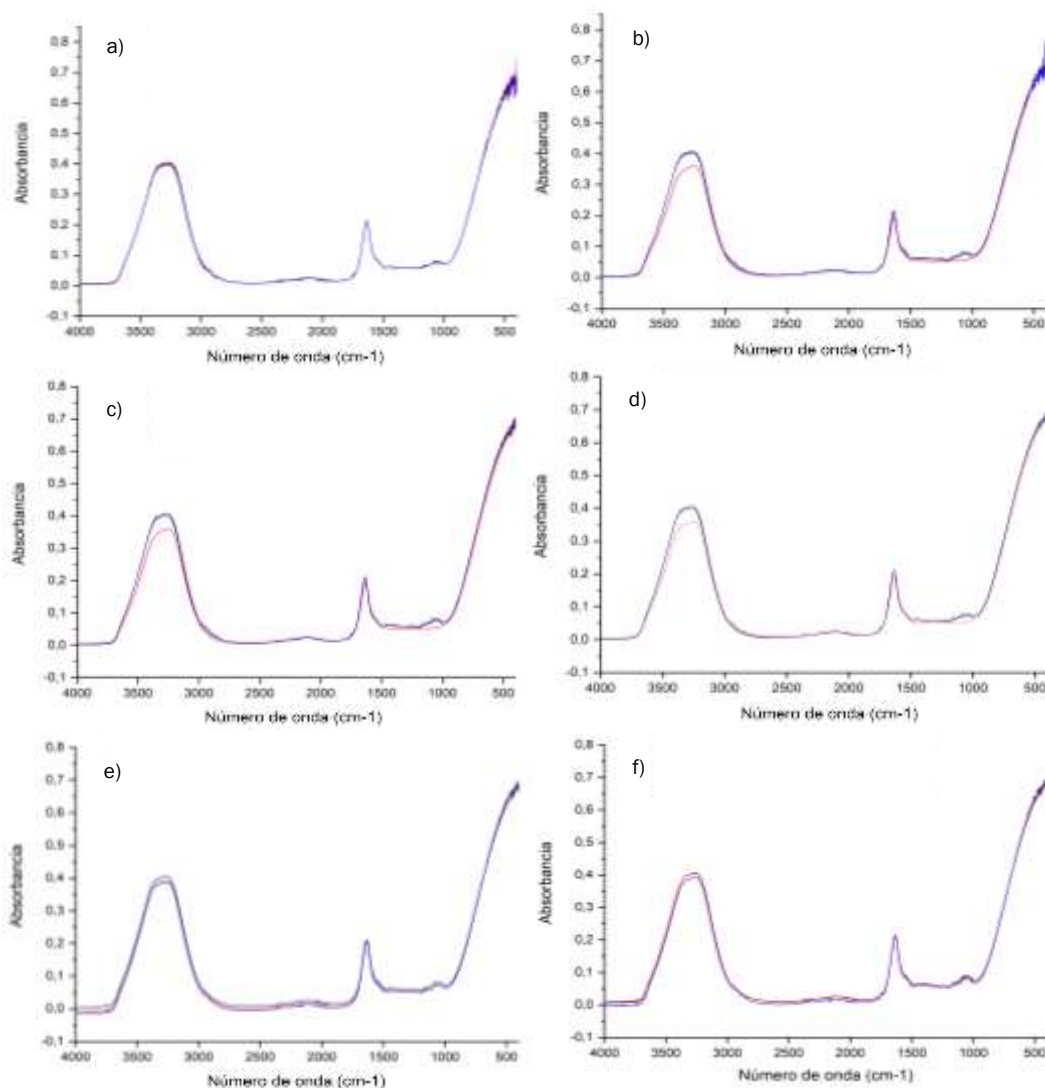


Figura 19. Espectros FTIR con diferentes scans de una muestra leche con diferente contenido graso: desnatada (negro), semidesnatada (rojo) y entera (azul). a) 32 scans, b) 250 scans, c) 500 scans, d) 1000 scans, e) 1500 scans y f) 2000 scans.

El resultado de este proceso se muestra en la Figura 19. Donde se observa que 1000 barridos es un número que implica un tiempo moderado de medida, 20 minutos, y que refleja un resultado muy similar a los obtenidos con un número de barridos más elevado.

Seguidamente se estudió la influencia de la temperatura en las medidas. Como se ha mostrado en la Figura 19 (la optimización del número de barridos) la leche no muestra picos significativos a temperatura ambiente. Por ello, se realizó un estudio de la influencia de la temperatura en los espectros que se muestra en la Figura 20.

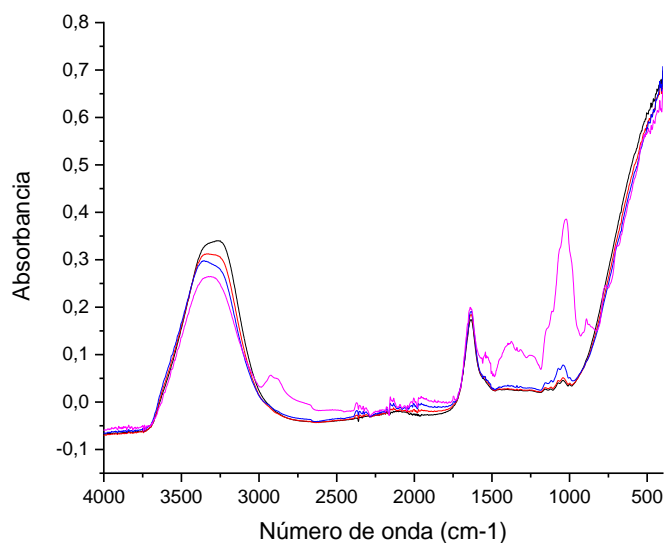


Figura 20. Espectro FTIR en una leche medida a distintas temperaturas. En negro 30°C, en rojo 45°C, en azul 60°C y en rosa 80°C.

Como resultado de la variación de temperatura, el espectro muestra diferencias muy significativas. A mayor temperatura el pico correspondiente a la presencia de agua, 3600 cm^{-1} , se ve reducido; intensificando así los picos correspondientes a las vibraciones del resto de enlaces. No se debe olvidar que la leche es en su mayor parte agua, por lo que sobrepasando los 80°C se podría llegar a quemar la muestra adulterando totalmente la medida y disminuyendo la intensidad de los picos a partir de aproximadamente 85°C [109].

Aplicando los parámetros establecidos en el proceso de optimización, se han analizado las 9 muestras de leche empleadas en este trabajo.

Al igual que en el caso anterior, debido a la similitud en la tendencia de las respuestas, sólo se muestran los resultados de un grupo de muestras para justificar los resultados obtenidos en este trabajo.

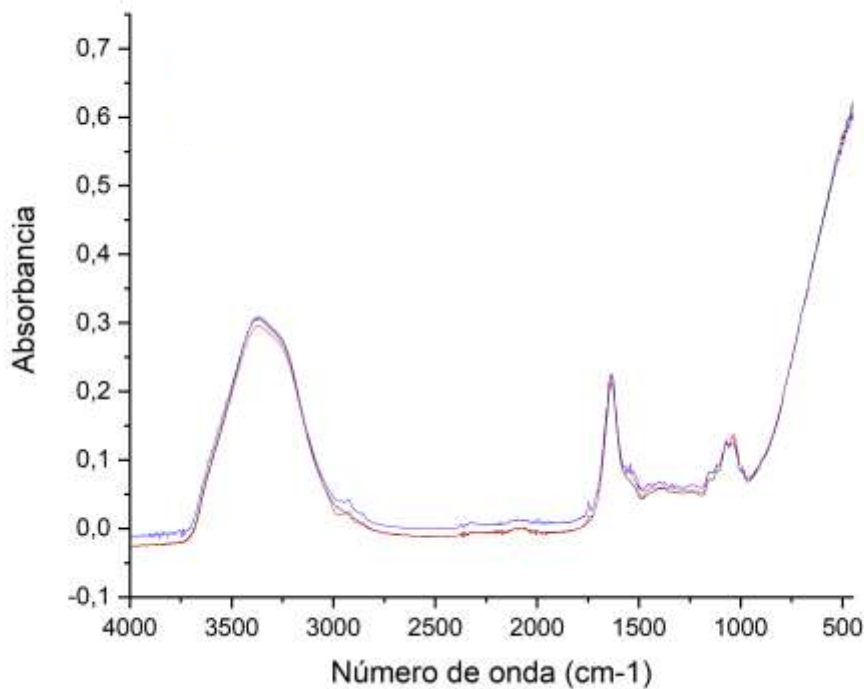


Figura 21. Espectro FTIR de leches con el mismo contenido nutricional (leche enriquecida con calcio), pero diferente proporción de grasa. En negro la leche desnatada, en rojo la leche semidesnatada y en azul la leche entera.

Observando la Figura 21 se pueden evaluar las diferencias entre las muestras de leche en función de su contenido graso. Una de las diferencias más destacadas se encuentra en los picos obtenidos a 2927 y 2854 cm^{-1} , correspondientes a la presencia de los enlaces $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}$ de las cadenas alifáticas de la grasa. En la Figura 21 se muestra que el espectro representado en color negro (leche desnatada) no refleja dichos picos, mientras que los espectros obtenidos tanto como para la leche semidesnatada como la entera, muestran la presencia de ambos picos, siendo más intensos para la muestra de leche con un mayor contenido graso.

Asimismo, la presencia de un pico a 1747 cm^{-1} , característico de la presencia del enlace $\text{C}=\text{O}$ de la grasa, resulta interesante. La intensidad de dicho pico en el espectro azul (entera) es superior a la del rojo (semidesnatada) y a su vez la azul y la roja muestran un pico más intenso que el negro (desnatada).

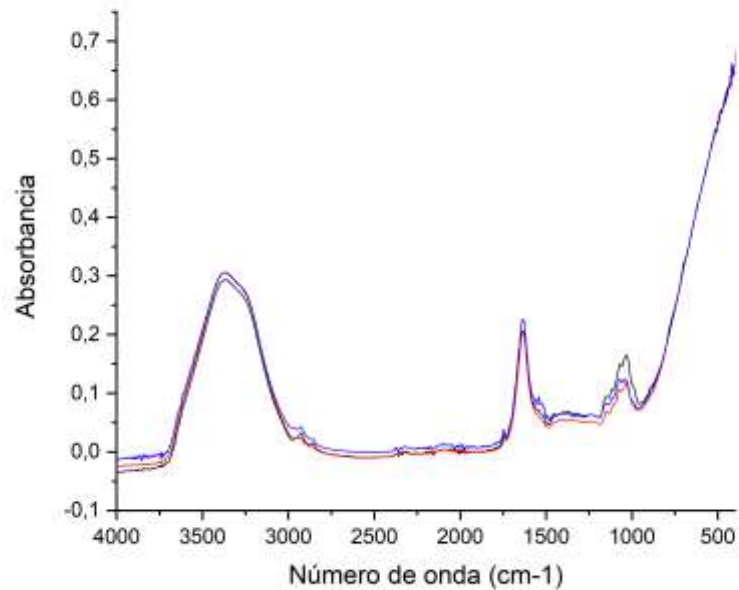


Figura 22. Espectro FTIR de leches enteras, pero composición nutricional diferente. En negro leche clásica, en rojo leche sin lactosa y en azul leche con adición de calcio y vitamina D.

La Figura 22 muestra las similitudes encontradas en relación al contenido graso y a sus picos característicos. Sin embargo, al comparar leches con un contenido graso similar se aprecian otros cambios en los espectros. En especial destaca el interés de las vibraciones correspondientes a los carbohidratos, con picos característicos en torno a 1150 y 1000 cm^{-1} . Se aprecia cómo la leche clásica (representada en color negro) muestra un pico de mayor intensidad que la leche sin lactosa o la leche enriquecida con calcio, respuesta lógica ya que es la única de las tres leches que no ha sufrido adulteraciones en su composición.

Por otro lado, la variación de la intensidad a 1750, 1660 y 1547 cm^{-1} en el espectro obtenido con la muestra de leche enriquecida en calcio se debe a la presencia de dicho metal en la composición de la leche [110].

5.2. Desarrollo de una lengua bioelectrónica para análisis de leche

En este trabajo se desarrollaron dos lenguas bioelectrónicas formadas por biosensores basadas en nanomateriales de plata (AgNWs y AgNPs) combinados con tres enzimas diferentes: galactosa oxidasa, glucosa oxidasa y β -galactosidasa; cuya inmovilización posterior se realizó con Nafion®.

La síntesis de los nanomateriales de plata se realizó en el laboratorio y la preparación de los biosensores se realizó tal y como se ha descrito en el Capítulo 4: Desarrollo Experimental.

5.2.1. Preparación y caracterización de los sensores

Síntesis y caracterización de los nanomateriales

En primer lugar, se han caracterizado los nanomateriales (AgNWs y AgNPs) y los sensores obtenidos con ellos.

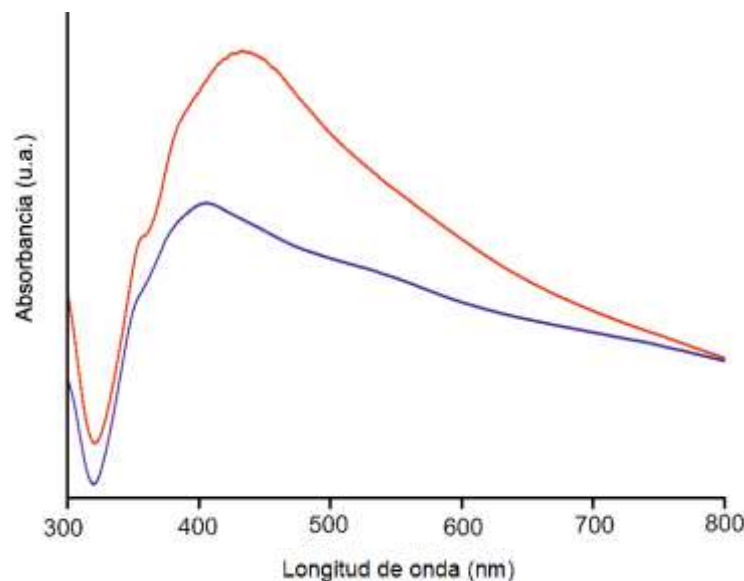


Figura 23. Espectro UV-Vis de la caracterización de los AgNWs. En rojo los AgNWs sin purificar y en azul los AgNWs purificados.

En la Figura 23 se muestran los espectros de absorción del producto de AgNWs sin purificar y tras realizar lavados con etanol y posterior centrifugación, eliminando así el sobrenadante.

En el espectro de los AgNWs sin lavar, se puede observar la presencia de dos bandas de absorción características de los AgNWs a 355 nm y 385 nm, que corresponde a la absorción longitudinal de los AgNWs y otra en 402 nm correspondiente a la absorción transversal de los AgNWs [106]. Hay un tercer pico a 434 nm que se atribuye a la presencia de nanopartículas de plata obtenidas como residuo durante el proceso de síntesis. Son precisamente estas nanopartículas, así como cualquier subproducto de reacción, las que se buscan eliminar mediante sucesivos lavados con etanol, por lo que al observar el espectro de los AgNWs después de varios lavados, se demuestra la eliminación de la presencia del pico a 434 nm [111].

Al igual que con los AgNWs, una vez obtenidas las nanopartículas se realizó un UV-Visible en un rango de 200-800 nm. La posición y la forma de esta banda están influenciadas por diferentes factores como el tamaño o la forma de las nanopartículas. Sabiendo que cuanto más estrecho sea el pico menos dispersión de tamaños hay entre las nanopartículas, se puede considerar que se han obtenido nanopartículas homogéneas y monodispersas.

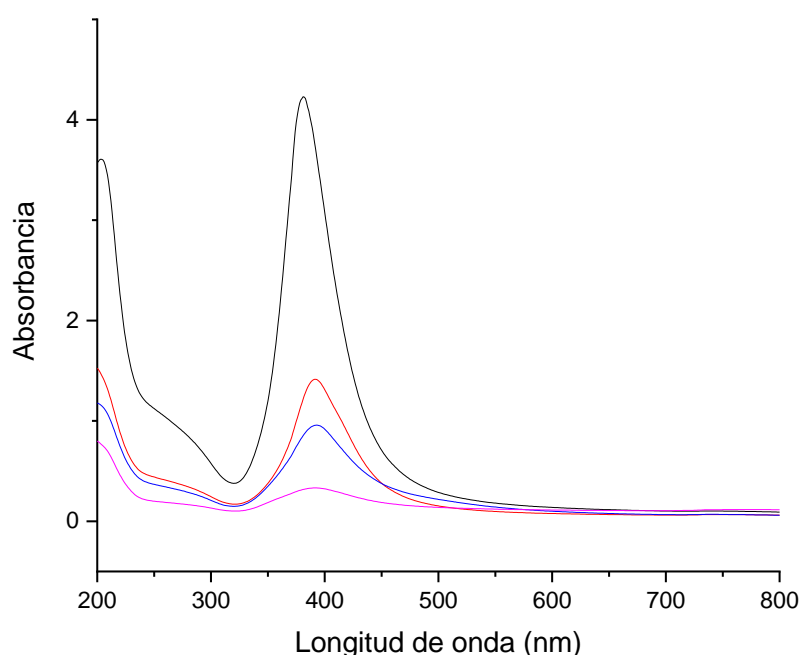


Figura 24. Caracterización AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis. En negro, AgNPs sin diluir. En rojo AgNPs diluidas (67% de agua). En azul AgNPs diluidas (70% de agua). En rosa AgNPs diluidas (80% de agua).

Como se observa en la Figura 24, tras obtener los AgNPs, se obtuvo una banda a 381 nm, que corresponde con la longitud de onda característica de las nanopartículas de plata [112].

Una vez obtenidas se diluyeron hasta obtener el mismo valor de absorbancia que en los nanohilos y así, siguiendo la ley de Lambert-Beer, se pudo obtener una concentración de AgNPs similar a la de AgNWs. Al estar la absorbancia directamente relacionada con la concentración del analito se pudo estimar una dilución de AgNPs con un 70% de agua (espectro azul de la Figura 24), equivalente a la concentración de 2 mg/mL obtenidos de los AgNWs.

Una vez obtenidos los AgNWs y los AgNPs, se procedió a preparar los sensores y biosensores depositando los nanomateriales y las enzimas sobre el sustrato BDD tal y como se explicó en el desarrollo experimental. En primer lugar, se procedió a la caracterización estructural de los sensores mediante espectroscopía y microscopía. Finalmente, en una segunda fase, se estudió su respuesta electroquímica.

Caracterización UV-Visible de los biosensores

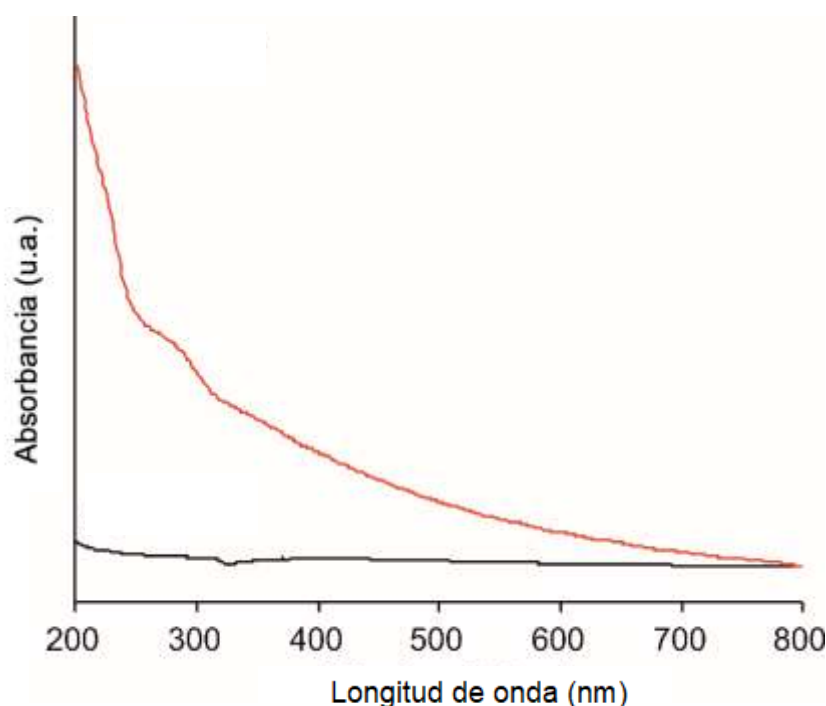


Figura 25. Espectro UV-Vis de un sensor modificado con AgNWs (negro) y uno modificado con AgNWs/β-gal (rojo).

La Figura 25 muestra un ejemplo de los espectros de los sensores obtenidos. En ellos se puede confirmar la presencia del nanomaterial y del enzima observándose una banda de absorción a 280 nm procedente de la presencia de enzima [63].

Asimismo, los espectros obtenidos para el resto de sensores y biosensores son similares.

Caracterización FTIR de los biosensores

De la misma forma la correcta adsorción de la enzima sobre la superficie del electrodo modificado ha podido demostrarse mediante FTIR.

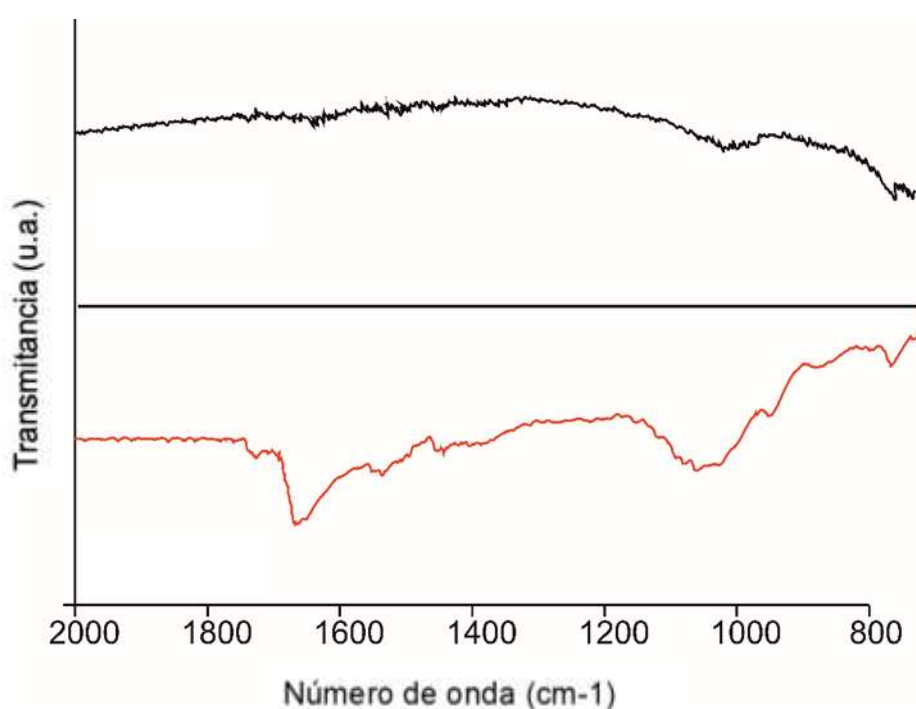


Figura 26. Espectro FTIR de un sensor modificado con AgNWs (negro) y uno modificado con AgNWs/ β -gal (rojo).

En la Figura 26 se observa que el espectro obtenido para los AgNWs no presenta picos característicos al no tener enlaces vibracionales, únicamente en 1000 y 800 cm^{-1} se muestran los picos de la plata. Sin embargo, al inmovilizar la enzima sobre su superficie, se observan los picos a 1550 y 1650 cm^{-1} , procedentes de la presencia de las amida de tipo I y II respectivamente, y a 1100 cm^{-1} , de los grupo hidroxilo de la enzima [63].

El espectro obtenido en el resto de sensores y biosensores ha sido similar.

Caracterización mediante AFM de los biosensores

Una parte fundamental de este trabajo es la caracterización de los sensores, de forma que se puedan dimensionar los nanomateriales y los cambios que se reflejan en el área del sustrato con la modificación enzimática.

En la Figura 27 se ilustran imágenes AFM de los electrodos BDD cubiertos con AgNP, AgNW y combinaciones dichos nanomateriales con enzimas.

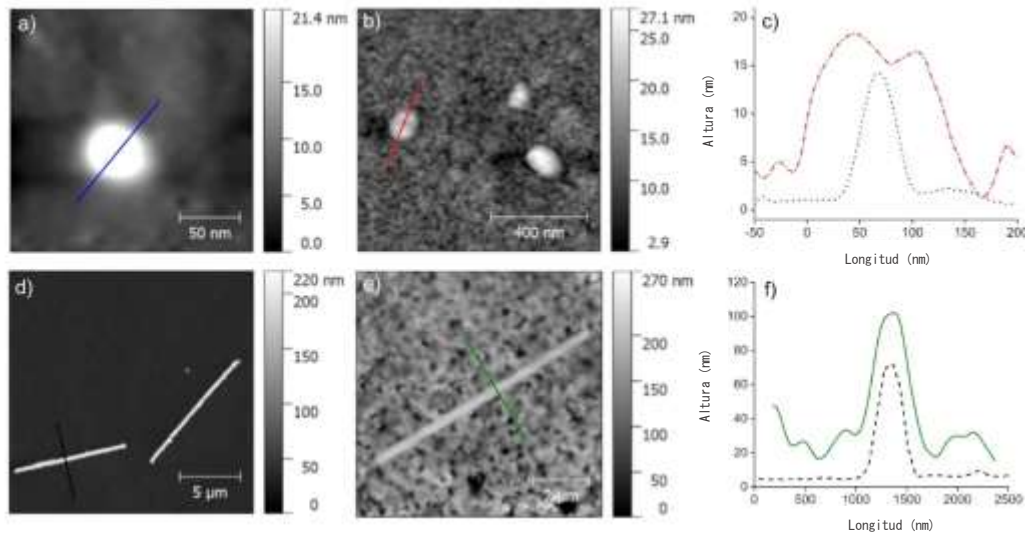


Figura 27. Topografía AFM de a) AgNP, b) AgNP+β-Gal, d) AgNW, e) AgNW+β-Gal. Perfil AFM de c) AgNP (línea punteada azul) y AgNP+β-Gal (línea discontinua roja) f) AgNW (línea discontinua negra) y AgNW+β-Gal (línea verde continua).

Las AgNPs se muestran como estructuras esféricas con un diámetro promedio de 80 ± 10 nm. Por otro lado, las imágenes de AgNWs mostraron nanohilos grandes y homogéneos con un diámetro promedio de 550 ± 43 nm y una longitud de 10 ± 2 μm.

Tras la inmovilización de las enzimas sobre la superficie del nanomaterial, se observa un aumento en el tamaño de las nanoestructuras. Esto se ilustra en la Figura 26c)-26f), donde se muestran las imágenes topográficas de la enzima β-Gal depositadas en AgNPs o AgNWs. Como se observa en la figura, las enzimas aparecieron homogéneamente distribuidas sobre la superficie del nanomaterial, produciéndose un claro aumento del diámetro de las nanoestructuras (diámetros de 180 ± 28 nm para AgNPs+β-Gal y 750 ± 81 nm para AgNWs+β-Gal). Se obtuvieron resultados similares con GaOx (AgNPs+GaOx diámetro de 173 ± 23 nm; AgNWs+GaOx diámetro de 717 ± 74 nm) y GOx (AgNPs+GOx diámetro de 160 ± 19 nm; AgNWs+GOx diámetro de 692 ± 73 nm).

Caracterización electroquímica

Antes de comenzar con el estudio electroquímico de los biosensores es necesario conocer la respuesta electroquímica del sustrato con el que se está trabajando, en este caso BDD. Este voltamograma será el blanco sobre el cual se analizarán el resto de respuestas, es decir, que si no se detecta un cambio frente a esta respuesta significará que no hay respuesta electroquímica (Figura 28).

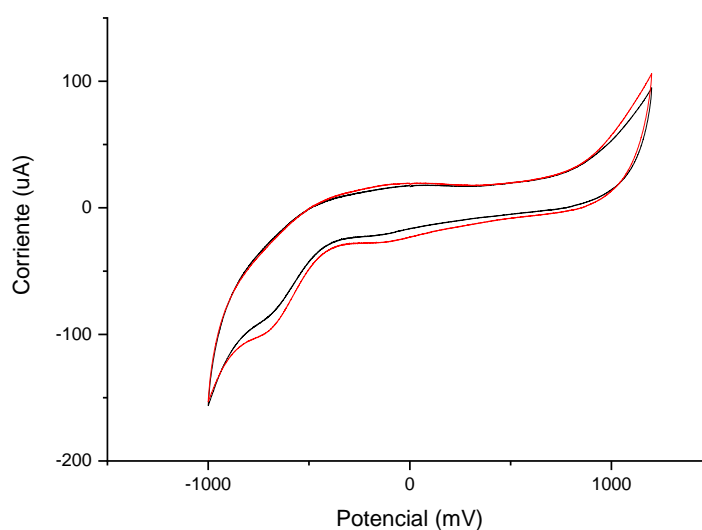


Figura 28. Voltamograma dos BDDs sin modificar analizados en buffer fosfato 0,01 M. En negro réplica 1 y en rojo réplica 2.

A continuación, se estudió la respuesta voltamétrica de los sensores y biosensores en la leche. En este estudio, además de analizar la respuesta electroquímica, es importante evaluar la repetitividad de las respuestas para comprobar que los materiales sensibles están correctamente fijados al sustrato. El objetivo es medir la estabilidad de cada sensor y biosensor, comprobando que la enzima se ha inmovilizado correctamente y que no ha ido desapareciendo con el paso del tiempo o se ha ido disolviendo en la disolución.

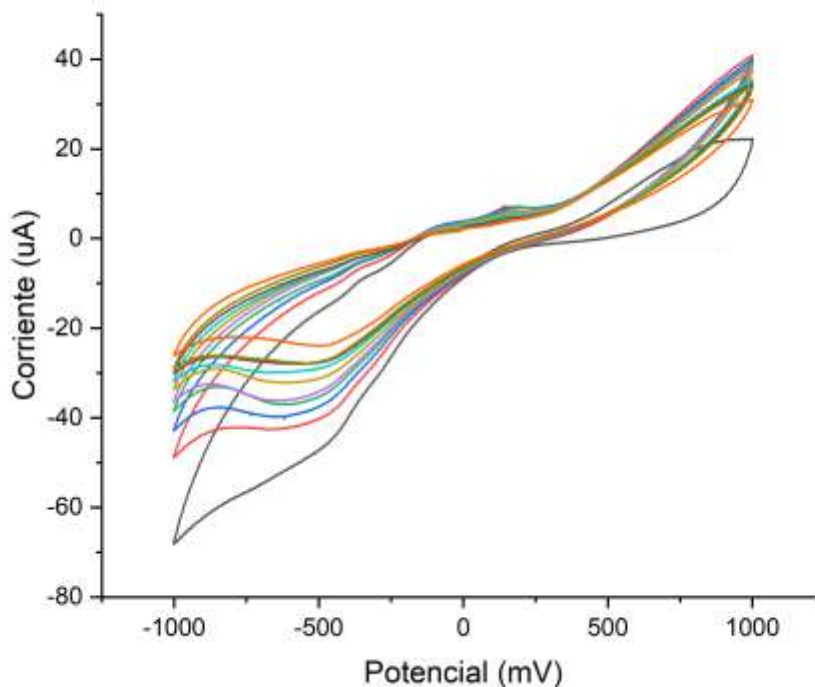


Figura 29. Estudio de la repetitividad del biosensor de AgNPs + β -Gal + naf en voltametría en leche clásica desnatada diluida al 50% con KCl 0,01M.

La Figura 29, muestra cómo el primer ciclo voltamétrico (negro) nunca aporta una señal fiable, ya que el sensor no se ha adecuado al medio al inicio de la medida y por lo tanto no se puede considerar un resultado fiable. El segundo ciclo corresponde a la curva de color rojo, la azul al tercero y así sucesivamente hasta llegar al ciclo número 10 de color naranja.

Estudiando la intensidad de los picos catódicos se observa que la señal electroquímica evoluciona desde una intensidad de -40,97 mV hasta -24,50 mV. Por otro lado, los picos anódicos varían desde 6,14 mV en el segundo ciclo hasta 5,46 mV en el último ciclo. Se estudió esta evolución de la señal calculando el coeficiente de variación, CV. En el pico catódico se obtuvo un valor del 25,15%, mientras que en el pico anódico se obtiene un CV de 5,86 %. Con este ejemplo se muestra que la rama de reducción no es tan estable como la de oxidación. A continuación, se estudiaron los CVs de dos sensores iguales, para comprobar si entre ellos también había esta diferencia en los coeficientes de variación y estudiar la reproducibilidad.

En la Figura 30 se muestra un ejemplo de la reproducibilidad de los sensores obtenida mediante voltamperometría en una de las 9 leches de estudio, concretamente la leche desnatada clásica.

En conclusión, hay que descartar el primer ciclo de medida, pero los CV de los siguientes ciclos son razonables.

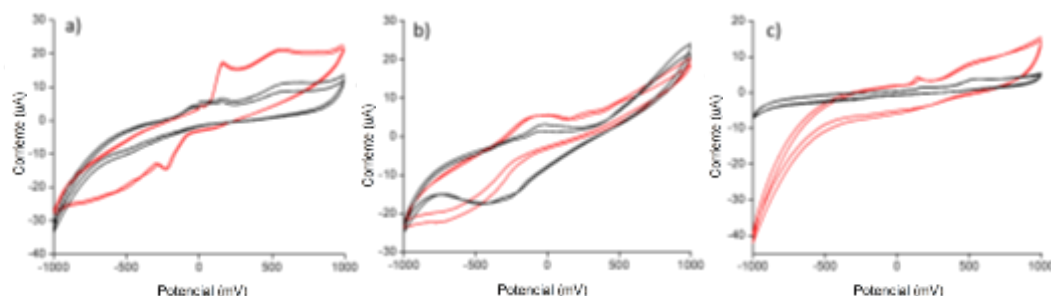


Figura 30. Voltamogramas de la reproducibilidad de pares de biosensors basados en a) AgNWs+GaOx+naf (rojo) y AgNPs+GaOx+naf (negro), b) AgNWs+β-Gal+naf (rojo) y AgNPs+β-Gal+naf (negro) y AgNWs+GOx+naf (rojo) y AgNPs+GOx+naf (negro) en leche desnatada clásica diluida al 50% en KCl 0,01M.

Como se puede observar, hay una mayor variación en el pico catódico (potenciales negativos), sin embargo, se puede considerar un sistema reproducible ya que no hay ningún coeficiente superior al 5% en potenciales positivos (Tabla 4).

Con la idea de conseguir un sistema lo más fiable posible y teniendo en cuenta que es en la rama de reducción donde se producen más interferencias, se realizó el estudio estadístico de las bioLEs en la rama de oxidación.

En la Tabla 4 se muestran los coeficientes de variación, CV (%), de todas las leches analizadas en cada sensor y biosensor desarrollado. La respuesta obtenida en todos ellos es muy similar a la mostrada en la Figura 30.

Tabla 4. Coeficientes de variación (CV (%)) de las dos réplicas de los sensores y biosensores

Sensor/ Biosensor	CD	CS	CE	LD	LS	LE	CaD	CaS	CaE
AgNWs + naf	3,6	3,2	4,7	3,5	2,5	2,1	2,3	4,2	4,3
AgNPs + naf	4,2	3,8	3,6	3,6	3,2	0,1	2,8	3,4	4,0
AgNWs + β -gal + naf	1,5	6,1	4,1	4,5	3,7	2,2	3,5	4,1	2,1
AgNPs + β -gal + naf	4,8	8,7	8,3	2,1	2,9	2,2	3,0	2,3	0,7
AgNWs + GaOx + naf	2,6	3,0	3,1	4,1	3,6	4,2	1,3	4,5	4,1
AgNPs + GaOx + naf	4,4	2,5	0,1	1,6	2,0	3,4	3,9	3,3	2,5
AgNWs + GOx + naf	0,9	2,2	2,1	2,1	1,8	2,6	3,7	2,9	2,6
AgNPs + GOx + naf	1,5	3,8	0,2	1,1	0,9	2,7	4,6	2,5	3,4

CD: clásica desnatada

LD: sin lactosa desnatada

CaD: enriquecida con calcio
desnatada

CD: clásica semidesnatada

LS: sin lactosa semidesnatada

CaS: enriquecida con calcio
semidesnatada

CE: clásica entera

LE: sin lactosa entera

CaE: enriquecida con calcio
entera

Una vez estudiada la repetitividad y la reproducibilidad del sensor, se estudió la diferencia en la respuesta voltamétrica entre el uso de AgNWs y AgNPs.

En la Figura 30 se mostró no sólo la reproducibilidad, sino también cómo varía la posición y la intensidad de las señales voltamétricas en función del nanomaterial y de la enzima para una misma leche.

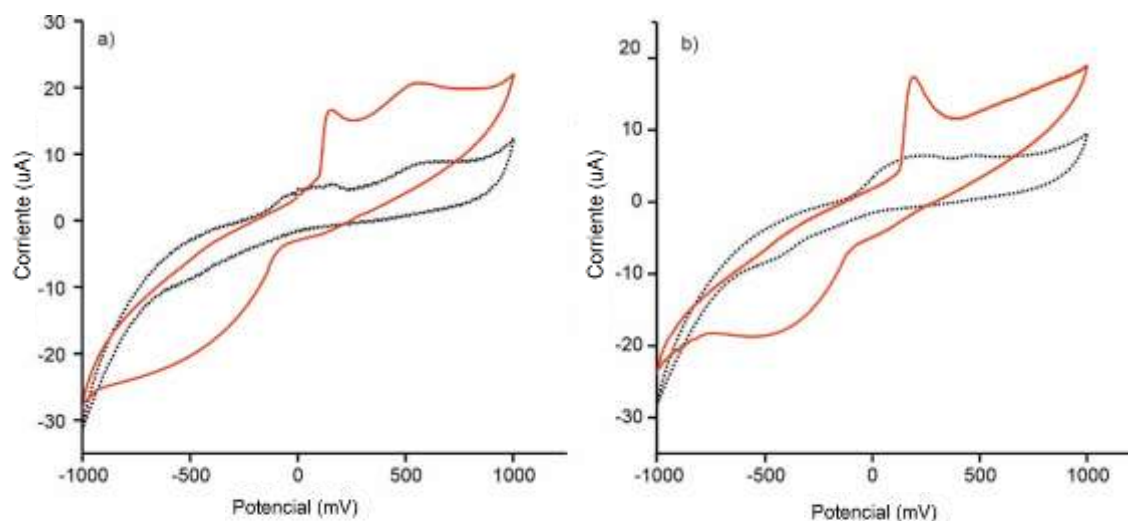


Figura 31. Voltamogramas de los biosensores modificados con AgNPs+GaOx+naf (negro) y AgNWs+GaOx+naf (rojo) en a) leche desnatada clásica y b) leche desnatada sin lactosa diluidas al 50% en KCl 0,01M

En la Figura 31 se muestran dichas respuestas, pero en este caso la posición y la intensidad de los picos dependen del nanomaterial de plata y de la leche analizada.

En los ejemplos mostrados en la Figura 30 y la Figura 31, así como en el resto de biosensores analizados, las respuestas voltamétricas de los biosensores basados en AgNWs fueron más intensas que las respuestas obtenidas por las AgNPs. Esto se debe a la antes mencionada relación superficie-volumen de los AgNWs, que proporciona más sitios activos en su superficie, mejorando el enlace con la enzima en comparación con las AgNPs.

Con este resultado se demuestra la importancia de la morfología del nanomaterial en el desarrollo de biosensores en términos de eficacia y sensibilidad.

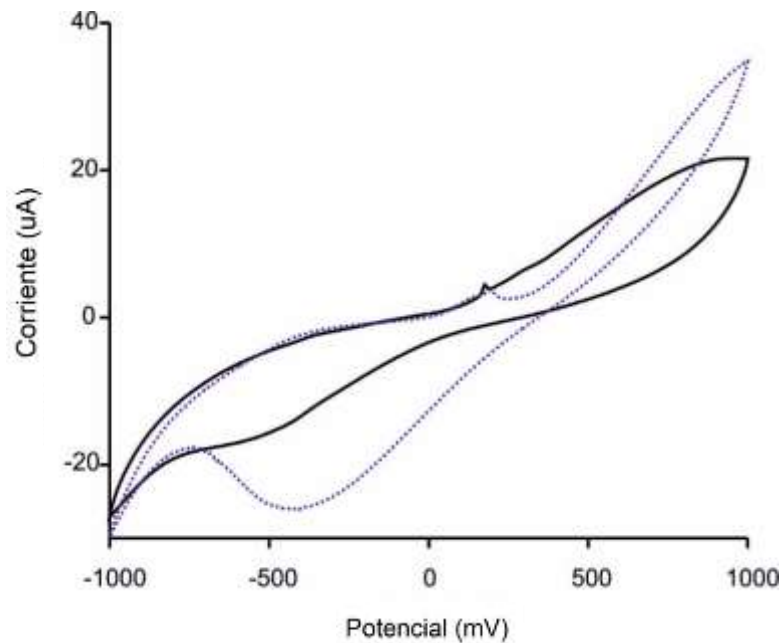


Figura 32. Voltamogramas del biosensor de AgNPs+ β -Gal+naf en leche clásica desnatada (negro) y en leche sin lactosa desnatada (azul punteado) diluidas en KCl 0,01M al 50%.

En la Figura 32 se demuestra que los biosensores dan respuestas diferentes en función de la leche estudiada. En este caso se ha escogido un ejemplo donde el pico catódico refleja esta diferencia. Esta respuesta se justifica debido a que la leche sin lactosa se basa en transformar la lactosa en sus unidades más sencillas, la galactosa y la glucosa, por lo que su contenido en galactosa es mayor en esta leche que en la clásica y reacciona con la enzima del biosensor.

5.2.2. Lengua bioelectrónica

Una vez caracterizados los sensores y biosensores tanto desde el punto de vista estructural como electroquímico, se formaron dos lenguas bioelectrónicas basadas en AgNWs y en AgNPs.

Los sensores y biosensores desarrollados se unieron para formar una red, y con ellos se analizaron las 9 leches de estudio. Los datos obtenidos se trataron con métodos quimiométricos para evaluar su capacidad de discriminación y clasificación.

En la Tabla 5 y la Tabla 6 se recogen los datos obtenidos de las dos redes de biosensores frente a las muestras de leche.

Tabla 5. Valor corregido de la intensidad del pico anódico para cada tipo de leche incluida en el estudio para cada sensor en la lengua electrónica de AgNPs.

bioLE AgNPs	Leches								
	CD	CS	CE	LD	LS	LE	CaD	CaS	CaE
β -gal + naf	1,59	0,69	1,95	0,25	1,11	1,23	0,23	0,13	0,10
GaOx + naf	4,12	1,04	2,37	3,30	2,99	3,52	3,30	2,83	2,30
GOx + naf	1,13	2,64	2,76	2,91	0,50	2,59	1,85	2,87	2,13

CD: clásica desnatada

LD: sin lactosa desnatada

CaD: enriquecida con calcio desnatada

CD: clásica semidesnatada

LS: sin lactosa semidesnatada

CaS: enriquecida con calcio semidesnatada

CE: clásica entera

LE: sin lactosa entera

CaE: enriquecida con calcio entera

Tabla 6. Valor corregido de la intensidad del pico anódico para cada tipo de leche incluida en el estudio para cada sensor en la lengua electrónica de AgNWs.

bioLE AgNWs	Leches								
	CD	CS	CE	LD	LS	LE	CaD	CaS	CaE
β -gal + naf	3,67	4,61	5,19	1,56	4,63	7,20	16,64	15,39	12,92
GaOx + naf	14,51	5,01	4,81	12,11	12,34	2,90	3,32	3,96	13,26
GOx + naf	4,43	3,25	2,86	3,65	3,67	3,15	2,06	4,01	3,72

CD: clásica desnatada

LD: sin lactosa desnatada

CaD: enriquecida con calcio desnatada

CD: clásica semidesnatada

LS: sin lactosa semidesnatada

CaS: enriquecida con calcio semidesnatada

CE: clásica entera

LE: sin lactosa entera

CaE: enriquecida con calcio entera

5.2.2.1. Resultado del análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un estudio de la capacidad de las lenguas bioelectrónicas de discriminar entre muestras de leche con diferente composición, para ello se utilizó el análisis de componentes principales (PCA).

PCA

Se espera que las lenguas electrónicas proporcionen respuestas diferentes para cada tipo de leche. Dichas señales, procesadas con una técnica de reducción matemática por kernels, son las que se han utilizado para este estudio estadístico.

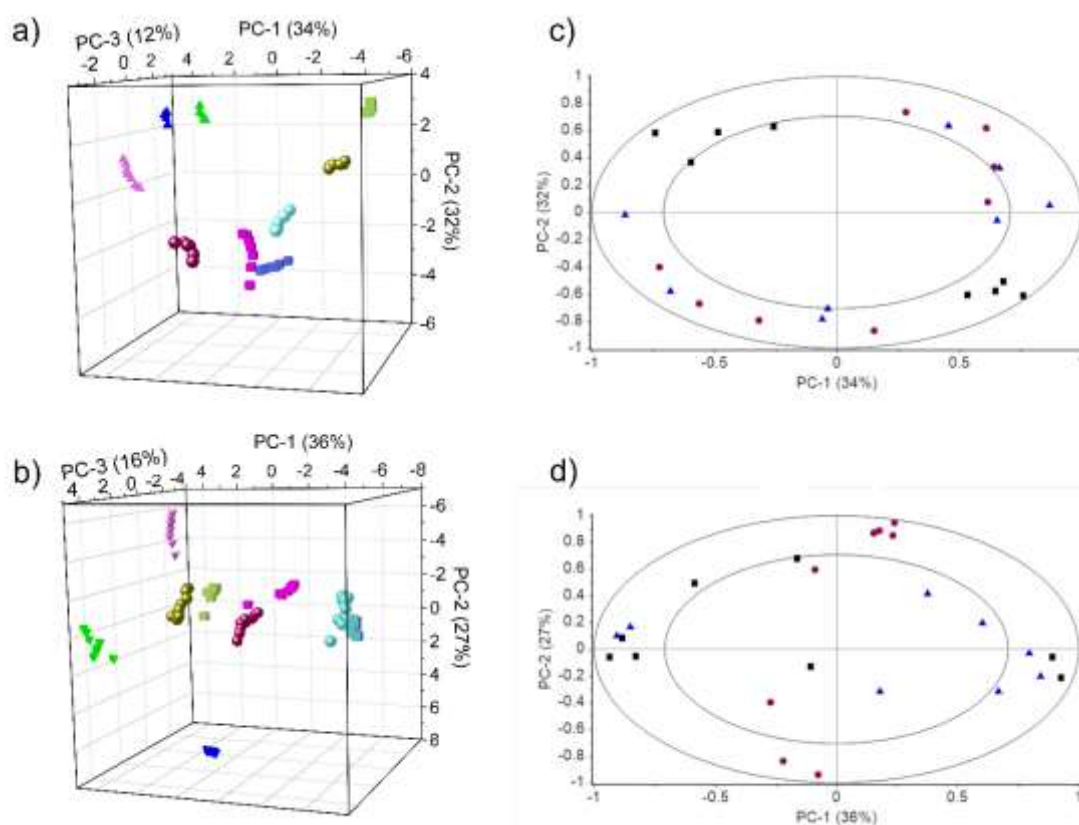


Figura 33. A la izquierda, PCA de a) LE de AgNWs y b) LE de AgNPs. A la derecha, gráficos loadings de c) LE de AgNWs y d) LE de AgNPs. Resultados de las PCAs de leches de diferente contenido graso: desnatada (tonos rosas), semidesnatada (tonos azules) y entera (tonos verdes); y de diferente contenido nutricional; leche clásica (círculos), leche sin lactosa (cuadrados) y leche enriquecida con calcio (triángulos). En los loadings las redes de biosensores están representadas por AgNWs+ β -Gal o AgNPs+ β -Gal (cuadrados negros), AgNWs+ GOx o AgNPs+ GOx (círculos rojos) y AgNWs+ GOx o AgNPs+ GOx (triángulos azules)



Como se muestra en la Figura 33, la covarianza de la PCA para la lengua electrónica de AgNWs (Figura 33a)) fue de 77,9 %, distribuida en 34,2 % (PC1), 31,5 % (PC2) y 12,2 % (PC3). La discriminación entre las muestras de leche estuvo dominada por el contenido de grasa. La leche desnatada apareció en la parte frontal del diagrama, la leche entera apareció en la parte posterior y superior y la leche semidesnatada apareció en la región entre la leche entera y la descremada.

La varianza de la PCA para la lengua electrónica de AgNPs (Figura 33b)) fue de 79,2% distribuida en 35,6% (PC1), 27,1% (PC2) y 16,4% (PC3). En este caso también se logró la discriminación, pero no se agruparon claramente las leches según el contenido de grasa o su composición nutricional.

Por otro lado, se estudió el gráfico loading de la PCA (Figura 33c) - 33d)). Los datos de la bioLE modificada con AgNWs muestran una distribución homogénea de las variables ubicadas dentro del círculo de correlación del gráfico. Esta distribución es el resultado de la complementariedad de los biosensores seleccionados y confirma que todas las variables son significativas para obtener un buen modelo de clasificación. La distribución obtenida de la bioLE con AgNPs no resultó tan homogénea como la otra, mostrando una menor complementariedad que explicaría la menor capacidad de discriminación que mostró frente a la modificada con AgNWs.

LDA

Dentro del estudio estadístico, se aplicó el análisis discriminante lineal, LDA, para desarrollar un modelo de clasificación predictivo para clasificar las muestras de leche en tres grupos: leche clásica, leche enriquecida con calcio y leche sin lactosa. Se construyó un modelo de clasificación para cada una de las bioLEs desarrolladas.

Tabla 7. Resultados de la calibración y validación de los modelos de clasificación LDA para ambas bioLE.

bioLE de AgNWs				
Calibración		Calcio	Clásica	Sin Lactosa
	Calcio	27 (100%)	0	0
	Clásica	0	27 (100%)	0
	Sin Lactosa	0	0	27 (100%)
Validación		Calcio	Clásica	Sin Lactosa
	Calcio	27 (100%)	0	0
	Clásica	0	27 (100%)	0
	Sin Lactosa	0	1 (3,7%)	26 (96,3%)
bioLE de AgNPs				
Calibración		Calcio	Clásica	Sin Lactosa
	Calcio	27 (100%)	0	0
	Clásica	0	27 (100%)	0
	Sin Lactosa	0	0	27 (100%)
Validación		Calcio	Clásica	Sin Lactosa
	Calcio	26 (96,3%)	1(3,7%)	0
	Clásica	0	27 (100%)	0
	Sin Lactosa	0	0	27 (100%)



El modelo fue validado mediante la metodología de validación cruzada “leave one-out cross validation”. El modelo LDA mostrado en la Tabla 7 ha generado tres grupos diferentes en función del contenido de calcio o de lactosa. Los resultados demostraron que las muestras de leche clásica en ausencia y presencia de lactosa se agrupan cerca unas de otras, lo cual es lógico según las similitudes en las respuestas electroquímicas, mientras que la leche enriquecida con calcio presentó mayores diferencias.

Dicho modelo se ha calculado a partir de los datos registrados mediante la bioLE de AgNWs y dio como resultado una precisión de reconocimiento del 100% para todas las muestras de leche (tasa de error del 0 %) para la calibración. Sin embargo, una de las muestras no se clasificó correctamente en el estudio de validación, detectándola como leche clásica en lugar de sin lactosa (tasa de error de validación del 3,7 %). A pesar de ello se considera un sistema fiable con una tasa de error muy pequeña.

También se realizó el modelo LDA en la bioLE de AgNPs, donde el 100 % de las muestras se clasificaron correctamente en una de las tres leches (clásica, leche enriquecida con calcio), mientras que, durante la validación cruzada de exclusión, una muestra de leche clásica se clasificó incorrectamente como enriquecida con calcio (tasa de error de validación del 3,7 %). Este resultado muestra, al igual que con la otra bioLE, que el sistema es fiable y es capaz de clasificar las muestras de leche en función de su composición nutricional.

PLS

El estudio de la PLS se ha llevado a cabo con la intención de estudiar si, a partir de los resultados obtenidos del análisis de las leches con las bioLEs, se podrían relacionar los parámetros químicos que la caracterizan.

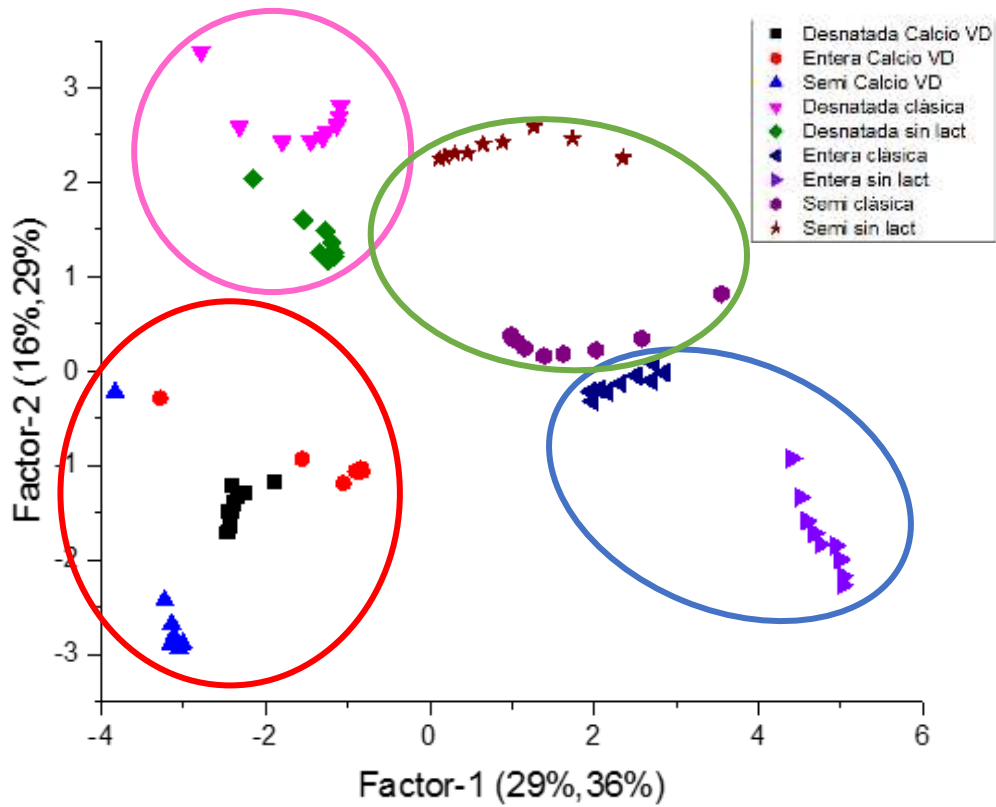


Figura 34. PLS de de las 9 leches UHT analizadas con la bioLE de AgNPs. Leches de diferente contenido graso con adición de calcio (óvalo rojo), leches desnatadas clásica y sin lactosa (óvalo rosa), leches semidesnatadas clásicas y sin lactosa (óvalo verde) y leches enteras clásicas y sin lactosa (óvalo azul).

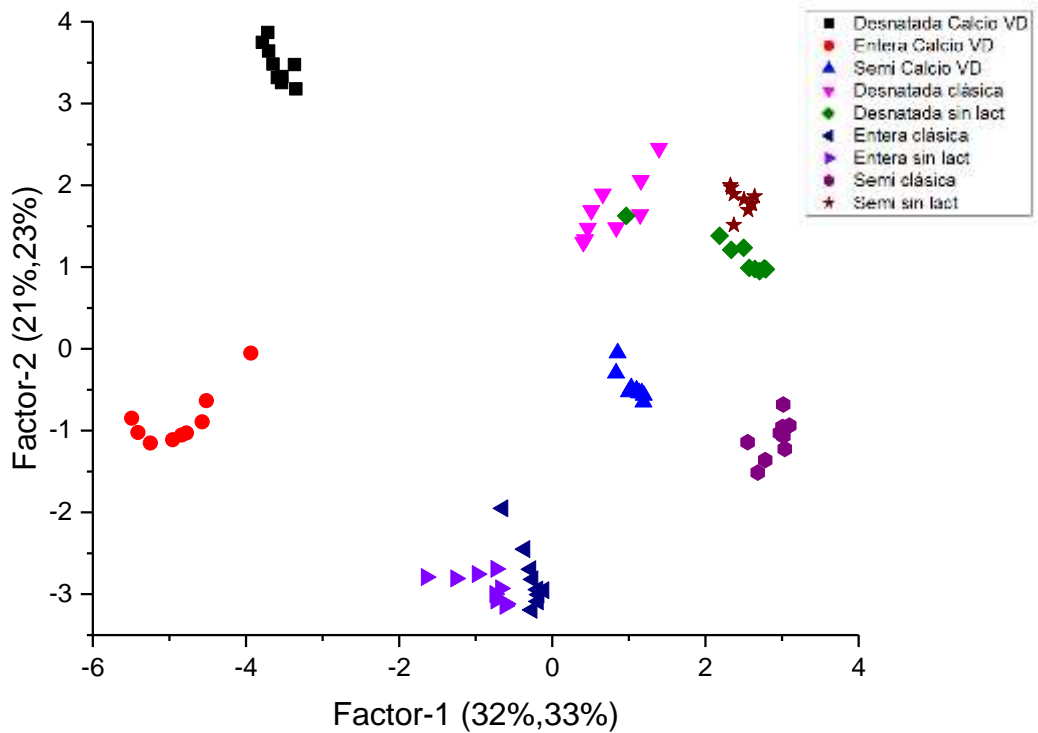


Figura 35. PLS de las 9 leches UHT analizadas con la bioLE de AgNWs.

Observando la Figura 34 correspondiente a la bioLE de AgNWs, se ve que se ha conseguido una discriminación según la composición nutricional de la leche (rojo) y a su vez se ha podido clasificar en agrupaciones de diferente contenido graso (rosa, verde y azul).

Por otro lado, la Figura 35 representa la bioLE de AgNPs y no muestra la misma clasificación que en la de AgNWs, no consiguiendo clasificar tan claramente las diferentes muestras de leches en función de su composición. Si se muestran agrupaciones entre las leches clásicas y las sin lactosa, pero no con la enriquecida con calcio.

Finalmente, en la Tabla 8 se recogen los resultados obtenidos en el modelo de regresión PLS.

Tabla 8. Resultados de la calibración y la validación por PLS de las lenguas bioelectrónicas

bioLE con AgNWs							
	Acidez (°D)	Densidad (g/ml)	Grasa (%m)	Proteínas (%m)	Lactosa (%m)	E.S.M (%m)	E.S.T (%m)
R ² _c	0,922	0,915	0,901	0,921	0,911	0,898	0,873
ECME _c	0,031	0,469	0,208	0,096	0,294	0,131	0,112
R ² _p	0,928	0,896	0,885	0,934	0,916	0,882	0,839
ECME _p	0,111	0,491	0,228	0,415	0,529	0,152	0,253
bioLE con AgNPs							
	Acidez (°D)	Densidad (g/ml)	Grasa (%m)	Proteínas (%m)	Lactosa (%m)	E.S.M (%m)	E.S.T (%m)
R ² _c	0,916	0,906	0,907	0,915	0,913	0,886	0,870
ECME _c	0,302	0,291	0,361	0,028	0,210	0,102	0,125
R ² _p	0,908	0,901	0,896	0,904	0,909	0,889	0,840
ECME _p	0,121	0,268	0,393	0,110	0,471	0,352	0,190

ECM_c: "error cuadrático medio de calibración". R²_c: Coeficiente de correlación en la calibración

ECM_p: "error cuadrático medio de predicción". R²_p: Coeficiente de correlación en la predicción.



Se obtuvieron buenos coeficientes de correlación y se obtuvieron errores residuales bajos tanto en la calibración como en la predicción para todos los parámetros analizados. Concretamente han sido en las proteínas y la acidez donde se han encontrado las mejores correlaciones, resultado que no sorprende ya que se encuentran entre los parámetros más utilizados en la industria láctea para evaluar la calidad de la leche. La alta correlación con la acidez se debe a la fuerte influencia del pH en la actividad enzimática, mientras que la buena correlación con la lactosa se debe a las enzimas trabajadas se relacionan directamente con la lactosa y los dos componentes de la lactosa: la galactosa y la glucosa.

Asimismo, destaca cómo en la bioLE de AgNWs se consiguió un coeficiente de correlación superior al de la bioLE de AgNPs, demostrando de nuevo la ventaja de los AgNWs frente a los AgNPs al tener una mayor respuesta enzimática que mejora los sensores y biosensores.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES





6. Conclusiones

Las conclusiones a las que se llegaron con el desarrollo de este trabajo fueron:

- Se han optimizado los métodos UV-Visible y FTIR para analizar muestras de leche. Además, se ha realizado un estudio de la composición nutricional de las leches mediante espectroscopía FTIR.
- Se han desarrollado dos lenguas bioelectrónicas basadas en sensores formados por nanomateriales de plata (AgNWs y AgNPs) y enzimas capaces de detectar diferentes componentes como la galactosa y la glucosa. Se ha demostrado que la combinación de un nanomaterial electrocatalítico con material biológico favorece la transferencia electrónica entre el electrodo modificado y la disolución mejorando así el rendimiento de los biosensores.
- Se ha demostrado la influencia de la relación de aspecto del nanomaterial (AgNWs frente AgNPs). Concretamente, los nanohilos de plata proporcionan una superficie activa más eficaz para la inmovilización enzimática debido a que presentan una mayor relación superficie-volumen, obteniendo de esta forma mejores resultados.
- Se han analizado muestras de leche de interés industrial con las bioLEs. Se ha concluido que la capacidad discriminadora de la bioLE basada en AgNWs es superior a la bioLE modificada con AgNPs. No obstante, ambas fueron capaces de discriminar 9 muestras diferentes de leche según su composición nutricional.
- Se han encontrado excelentes correlaciones con los parámetros químicos comúnmente utilizados en el control de calidad de la leche con el método PLS, demostrando que la mejor clasificación se consigue con los sensores y biosensores modificados con AgNWs.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid







CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



7. Bibliografía

- [1] “Informe anual de la Industria Alimentaria Española. Periodo 2019-2020,” *Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación* (MAPA), 2022. https://public.tableau.com/views/CCAA_4/Dashboard1?:showVizHome=no&:embed=true%0Ahttps://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/_20210114informeanualindustria2019-2020ok_tcm30-542507.pdf (accessed Apr. 16, 2022).
- [2] “Alimentación. Cifras de la industria alimentaria,” *Gobierno de España. Ministerio de Agricultura y Pesca. Alimentación y Medio Ambiente*, 2022. <http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/> (accessed Apr. 16, 2022).
- [3] “Federación Nacional de Industrial Lácteas,” 2021. <http://fenil.org/> (accessed Apr. 17, 2022).
- [4] J. LePree, “Smart sensors enable Industry 4.0,” *Chemical Engineering*, 2019. <https://www.chemengonline.com/smart-sensors-enable-industry-4-0> (accessed Apr. 19, 2022).
- [5] S. Otles and A. Sakalli, “Industry 4.0: The Smart Factory of the Future in Beverage Industry,” *Elsevier Inc*, 2019, doi: 10.1016/b978-0-12-815260-7.00015-8.
- [6] “E. de I. I. Universidad de Valladolid, ‘SensorGroup UVa.’” <http://www.eis.uva.es/inorganica/index.php/component/content/article/73-grupouvasens>. (accessed Apr. 22, 2021).
- [7] “Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado,” «BOE» núm. 248, de 17 de octubre de 1967, BOE-A-1967-16485, 1967. <https://www.boe.es/eli/es/d/1967/09/21/2484> (accessed Sep. 14, 2021).
- [8] C. L. Central, C. A. Materia, L. G. Prote, C. Calcio, M. Potasio, and S. Cloro, “Proyecto Nacional de Lechería del INTA . Composición química de la leche,” 2001.
- [9] F. Della Pelle and D. Compagnone, “Nanomaterial-based sensing and biosensing of phenolic compounds and related antioxidant capacity in food,” *Sensors*, vol. 18, no. 462, 2018, doi: 10.3390/s18020462.

- [10] W. Putzbach and N. J. Ronkainen, “Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review,” *Sensors*, vol. 13, pp. 4811–4840, 2013, doi: 10.3390/s130404811.
- [11] J. Janata, *Principles of chemical sensors*, 2nd ed. Springer Science, NY, 2009.
- [12] K. Persaud, “Electronic Noses and Tongues in the Food Industry, in: *Electron. Noses Tongues Food Sci.*,” Elsevier Inc., pp. 3–14, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-800243-8.00001-9.
- [13] L. A. Dias, A. M. Peres, A. C. A. Veloso, F. S. Reis, M. Vilas-Boas, and A. A. S. C. Machado, “An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 136, pp. 209–217, 2009, doi: 10.1016/j.snb.2008.09.02.
- [14] M. Hruškar *et al.*, “Evaluation of milk and dairy products by electronic tongue, *Mljekarstvo*,” vol. 59, no. 3, pp. 193–200, 2009.
- [15] Y. Tahara and K. Toko, “Electronic tongues-a review,” *IEEE Sens. J.*, vol. 13, pp. 3001–3011, 2013, doi: 10.1109/JSEN.2013.2263125.
- [16] “Composición de la leche y Valor Nutritivo.” http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/prod_lechera/GA000002pr.htm (accessed Sep. 13, 2021).
- [17] D. Lopez, A. y Barriga, “La leche. Composición y características,” *Compos. y Caracter. Inst. Investig. y Form. Agrar. y Pesq. Sevilla Espaa Cons. Agric. pesca y Desarro. Rural*, p. 16, 2016.
- [18] A. Charles, *Science du lait : principes des techniques laitières Société d’édition et de promotion agro-alimentaires, industrielles et commerciales.*, 4th ed. Société d’édition et de promotion agro-alimentaires, industrielles et commerciales, 1984.
- [19] U. Guth, W. Vonau, and J. Zosel, “Recent developments in electrochemical sensor application and technology – a review,” 2009, doi: 10.1088/0957-0233/20/4/042002.
- [20] L. G. Corona Ramírez, G. S. Abarca jiménez, and J. Mares Carreño, *Sensores y actuadores. Aplicaciones con Arduino*, 1st ed. Grupo Editorial Patria, 2014.



- [21] D. A. Skoog, F. James Holler, and T. A. Nieman, “Douglas A. Skoog & F. James Holler & Timothy A. Nieman - Principios de análisis instrumental (5ed, McGrawHill).pdf.” Madrid, pp. 1–856, 2001.
- [22] K. A. Rubinson and J. F. Rubinson, *Análisis Instrumental*. Madrid, 2001.
- [23] A. P. F. Turner, *Biosensors. Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, 1987.
- [24] R. Lalauze, *Chemical Sensors And Biosensors*, 2nd ed. London. ISTE, 2012.
- [25] C. Spahn and S. D. Minteer, “Enzyme Immobilization in Biotechnology,” *Recent Patents Eng.*, vol. 2, no. 3, pp. 195–200, 2008, doi: <https://doi.org/10.2174/187221208786306333>.
- [26] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-bouvier, “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 489–511, 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
- [27] V. S. Manikandan, B. R. Adhikari, and A. Chen, “Nanomaterial based electrochemical sensors for the safety and quality control of food and beverages,” *Analyst*, vol. 143, no. 19, pp. 4537–4554, 2018, doi: 10.1039/c8an00497h.
- [28] H. Fernández *et al.*, “Electrochemical biosensors for the determination of toxic substances related to food safety developed in south America: Mycotoxins and herbicides,” *Chemosensors*, vol. 5, no. 3, 2017, doi: 10.3390/chemosensors5030023.
- [29] V. Rajendran and J. Irudayaraj, “Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor,” *J. Dairy Sci.*, vol. 85, no. 6, pp. 1357–1361, 2002, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74201-X.
- [30] A. Navaee and A. Salimi, “Enzyme-based electrochemical biosensors,” *Electrochem. Biosens.*, pp. 167–211, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-816491-4.00007-3.
- [31] R. Wilson and A. P. F. Turner, “Glucose oxidase: An ideal enzyme,” *Biosens. t Biwlecrroña*, vol. 7, no. 3, pp. 165–185, 1992, doi: [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(92\)87013-F](https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)87013-F).

- [32] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, and L. Ananthanarayan, "Glucose oxidase - An overview," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 4, pp. 489–501, 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- [33] B. W. Matthews, "The structure of *E. coli* β -galactosidase," *Comptes Rendus - Biol.*, vol. 328, no. 6 SPEC. ISS., pp. 549–556, 2005, doi: 10.1016/j.crv.2005.03.006.
- [34] K. Wallenfels and R. Weil, " β -Galactosidase," *Enzymes*, vol. 7, no. C, pp. 617–663, 1972, doi: 10.1016/S1874-6047(08)60464-3.
- [35] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, and R. Fernandez-Lafuente, "Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization," *RSC Adv.*, no. 207890, pp. 1–63, 2013, doi: 10.1039/C3RA45991H.
- [36] K. A. Mauritz and R. B. Moore, "State of understanding of Nafion," *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 10, pp. 4535–4585, 2004, doi: 10.1021/cr0207123.
- [37] B. Smitha, S. Sridhar, and A. A. Khan, "Solid polymer electrolyte membranes for fuel cell applications - A review," *J. Memb. Sci.*, vol. 259, no. 1–2, pp. 10–26, 2005, doi: 10.1016/j.memsci.2005.01.035.
- [38] K. Grennan, A. J. Killard, and M. R. Smyth, "Physical characterizations of a screen-printed electrode for use in an amperometric biosensor system," *Electroanalysis*, vol. 13, no. 8–9, pp. 745–750, 2001, doi: 10.1002/1521-4109(200105)13:8/9<745::AID-ELAN745>3.0.CO;2-B.
- [39] T. Minami, "Present status of transparent conducting oxide thin-film development for Indium-Tin-Oxide (ITO) substitutes," *Thin Solid Films*, vol. 516, no. 17, pp. 5822–5828, 2008, doi: 10.1016/j.tsf.2007.10.063.
- [40] M. Ulbricht, "Advanced functional polymer membranes," *Polymer (Guildf.)*, vol. 47, no. 7, pp. 2217–2262, 2006, doi: 10.1016/j.polymer.2006.01.084.
- [41] B. Mostafiz *et al.*, "Molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode (MIP-CPE)-based sensors for the sensitive detection of organic and inorganic environmental pollutants: A review," *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 32, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.TEAC.2021.E00144.
- [42] J. V Macpherson, "A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research," pp. 2935–2949, 2015, doi: 10.1039/c4cp04022h.



- [43] R. Lecher, J. Wagner, F. Fuchs, M. Maier, P. Gonon, and P. Koidl, "Optical and electrical characterization of boron-doped diamond films," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 4, pp. 3–8, 1995.
- [44] J. H. T. Luong, B. Male, and J. D. Glennon, "Boron-doped diamond electrode : synthesis , characterization , functionalization and analytical applications," pp. 1965–1979, 2009, doi: 10.1039/b910206j.
- [45] C. Salvo-comino, I. Rassas, S. Minot, M. L. Rodriguez-mendez, A. Errachid, and N. Jaffrezic-renault, "Voltametric sensor based on electrodeposited molecularly imprinted chitosan film on BDD electrodes for catechol detection in buffer and in wine samples," *Mater. Sci. Eng. C*, p. 110667, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.110667.
- [46] J. R. Macdonald and a J. Wiley, *Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications*, Second Edi. Wiley-Interscience, 2005.
- [47] B. Wu, Z. Wang, D. Zhao, and X. Lu, "A novel molecularly imprinted impedimetric sensor for melamine determination," *Talanta*, vol. 101, pp. 374–381, 2012, doi: 10.1016/J.TALANTA.2012.09.044.
- [48] E. I. Geană, C. T. Ciucure, and C. Apetrei, "Electrochemical Sensors Coupled with Multivariate Statistical Analysis as Screening Tools for Wine Authentication Issues: A Review," *Chemosensors*, vol. 8, no. 59, 2020, doi: 10.3390/CHEMOSENSORS8030059.
- [49] Â. Vilas-Boas, P. Valderrama, N. Fontes, D. Geraldo, and F. Bento, "Evaluation of total polyphenol content of wines by means of voltammetric techniques: Cyclic voltammetry vs differential pulse voltammetry," *Food Chem.*, vol. 276, no. May 2018, pp. 719–725, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.078.
- [50] A. Muhammad, N. A. Yusof, R. Hajian, and J. Abdullah, "Construction of an electrochemical sensor based on carbon nanotubes/gold nanoparticles for trace determination of amoxicillin in bovine milk," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.3390/s16010056.
- [51] Y. Yao *et al.*, "Poly(3,4-ethylenedioxythiophene): Poly(styrenesulfonate) composite electrode as sensing platform for the simultaneous electrochemical determination of dihydroxybenzene isomers," *Monatshefte fur Chemie*, vol. 145, no. 1, pp. 137–146, 2014, doi: 10.1007/s00706-013-1003-x.

- [52] J. Heinze, "Cyclic Voltammetry—'Electrochemical Spectroscopy'. New Analytical Methods," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 23, no. 11, pp. 831–847, 1984, doi: 10.1002/anie.198408313.
- [53] Â. Vilas-Boas, P. Valderrama, N. Fontes, D. Geraldo, and F. Bento, "Evaluation of total polyphenol content of wines by means of voltammetric techniques: Cyclic voltammetry vs differential pulse voltammetry," *Food Chem.*, vol. 276, no. May 2018, pp. 719–725, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.078.
- [54] P. Amalio and S. Domingo, "Nanociencia y nanotecnología: aspectos generales," *Inst. Cienc. Mater. Madrid Cons. Super. Investig. Científicas U.A.M.*, pp. 1–12, 1980.
- [55] N. Taniguchi, "On the basic concept of nanotechnology. Proceeding of the ICPE.," 1974.
- [56] H. Jafarizadeh-Malmiri, Z. Sayyar, N. Anarjan, and A. Berenjian, "Nanosensors in Food Nanobiotechnology, Nanobiotechnology Food Concepts," *Appl. Perspect.*, pp. 81–94, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-05846-3_6.
- [57] M. Rossi *et al.*, "Nanotechnology for Food Packaging and Food Quality Assessment," in *Elsevier Inc.*, 1st ed., vol. 82, 2017, pp. 149–204.
- [58] X. He and H. M. Hwang, "Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment," *J. Food Drug Anal.*, vol. 24, pp. 671–681, 2016, doi: 10.1016/j.jfda.2016.06.001.
- [59] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, and Y. Lin, "Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures," *Anal. Chem.*, vol. 87, pp. 230–249, 2015, doi: 10.1021/ac5039863.
- [60] V. S. Manikandan, B. R. Adhikari, and A. Chen, "Nanomaterial based electrochemical sensors for the safety and quality control of food and beverages," *Analyst*, vol. 143, pp. 4537–4554, 2018, doi: 10.1039/c8an00497h.
- [61] L. Rotariu, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, and C. Bala, "Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 79, pp. 80–87, 2016, doi: 10.1016/J.TRAC.2015.12.017.
- [62] H. Xu, H. Shang, C. Wang, and Y. Du, "Low-Dimensional Metallic Nanomaterials for Advanced Electrocatalysis," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 50, 2020, doi: 10.1002/adfm.202006317.



- [63] C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, C. Garcia-Cabezon, and M. Luz Rodriguez-Mendez, "Silver Nanowires as Electron Transfer Mediators in Electrochemical Catechol Biosensors," 2021, doi: 10.3390/s21030899.
- [64] L. Zhang *et al.*, "Recent progress for silver nanowires conducting film for flexible electronics," *J. Nanostructure Chem.*, vol. 11, no. 3, pp. 323–341, 2021, doi: 10.1007/s40097-021-00436-3.
- [65] S. Fahad *et al.*, "Recent progress in the synthesis of silver nanowires and their role as conducting materials," *J. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 2, pp. 997–1035, 2019, doi: 10.1007/s10853-018-2994-9.
- [66] P. Zhang *et al.*, "Silver nanowires: Synthesis technologies, growth mechanism and multifunctional applications," *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 223, pp. 1–23, 2017, doi: 10.1016/j.mseb.2017.05.002.
- [67] T. Tetsumoto, Y. Gotoh, and T. Ishiwatari, "Mechanistic studies on the formation of silver nanowires by a hydrothermal method," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 362, no. 2, pp. 267–273, 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.05.079.
- [68] D. Zhang, L. Qi, J. Yang, J. Ma, H. Cheng, and L. Huang, "Wet Chemical Synthesis of Silver Nanowire Thin Films at Ambient Temperature," *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 5, pp. 872–876, 2004, doi: 10.1021/cm0350737.
- [69] L. Liu, C. He, J. Li, J. Guo, D. Yang, and J. Wei, "Green synthesis of silver nanowires via ultraviolet irradiation catalyzed by phosphomolybdic acid and their antibacterial properties," *New J. Chem.*, vol. 37, no. 7, pp. 2179–2185, 2013, doi: 10.1039/c3nj00135k.
- [70] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, and A. D'Amico, "Nonspecific sensor arrays ('electronic tongue') for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 77, pp. 1965–1983, 205AD, doi: 10.1351/pac200577111965.
- [71] K. Persaud, "Electronic Noses and Tongues in the Food Industry, in: *Electron. Noses Tongues Food Sci.*," Elsevier Inc., 2016. .
- [72] I. Tazi, K. Triyana, D. Siswanta, A. C. A. Veloso, A. M. Peres, and L. G. Dias, "Dairy products discrimination according to the milk type using an electrochemical multisensor device coupled with chemometric tools," *J. Food Meas. Charact.*, vol. 12, pp. 2385–2393, 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9855-8>.

- [73] M. Bougrini *et al.*, “Aging time and brand determination of pasteurized milk using a multisensor e-nose combined with a voltammetric e-tongue,” *Mater. Sci. Eng.*, vol. 45, pp. 348–358, 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.09.030.
- [74] S. Cavanillas, F. Winqvist, and M. Eriksson, “A self-polishing platinum ring voltammetric sensor and its application to complex media,” *Anal. Chim. Acta.*, vol. 859, pp. 29–36, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2014.11.039.
- [75] L. A. Mercante, V. P. Scagion, A. Pavinatto, R. C. Sanfelice, L. H. C. Mattoso, and D. S. Correa, “Electronic tongue based on nanostructured hybrid films of gold nanoparticles and phthalocyanines for milk analysis,” *J. Nanomater.*, vol. 16, no. 1, pp. 402–402, 2015, doi: 10.1155/2015/890637.
- [76] A. A. Arrieta, M. S. Palencia, and O. Fuentes, “Miniaturised multi-channel system of electrochemical measurements for an electronic tongue for milk samples,” *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, vol. 12, no. 1, pp. 28–35, 2018.
- [77] Y. Yu *et al.*, “Discrimination of milk adulterated with urea using voltammetric electronic tongue coupled with PCA-LSSVM,” *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 10, pp. 10119–10131, 2015.
- [78] L. Bueno, W. R. de Araujo, M. O. Salles, M. Y. Kussuda, and T. R. L. C. Paixão, “Voltammetric electronic tongue for discrimination of milk adulterated with urea, formaldehyde and melamine,” *Chemosensors*, vol. 2, pp. 251–266, 2014, doi: 10.3390/chemosensors2040251.
- [79] F. Winqvist, P. Wide, and I. Lundström, “An electronic tongue based on voltammetry,” *Anal. Chim. Acta.*, vol. 357, pp. 21–31, 1997, doi: 10.1016/S0003-2670(97)00498-4.
- [80] F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, and I. L. P. Wide, “Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry,” *Meas. Sci. Technol.*, vol. 9, pp. 1937–1946, 1998, doi: 10.1088/0957-0233/9/12/002.
- [81] F. Winqvist, S. Holmin, C. Krantz-Rülcker, and I. L. P. Wide, “A hybrid electronic tongue,” *Anal. Chim. Acta.*, vol. 406, pp. 147–157, 2000, doi: 10.1016/S0003-2670(99)00767-9.



- [82] W. A. Collier, D. B. Baird, Z. A. Park-Ng, N. More, and A. L. Hart, "Discrimination among milks and cultured dairy products using screen-printed electrochemical arrays and an electronic nose," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 92, pp. 232–239, 2003, doi: 10.1016/S0925-4005(03).
- [83] C. Medina-Plaza *et al.*, "The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the anal," *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 62, no. 2, pp. 940–947, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.027>.
- [84] A. Riul, C. A. R. Dantas, C. M. Miyazaki, and O. N. Oliveira, "Recent advances in electronic tongues," *Analyst*, vol. 135, pp. 2481–2495, 2010, doi: 10.1039/COAN00292E.
- [85] J. R and W. D., *Applied Multivariate Statistical Analysis*, 6th ed. Prentice Hall, 2007.
- [86] K. Brudzewski, S. Osowski, and T. Markiewicz, "Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 98, pp. 291–298, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2003.10.028>.
- [87] P. Ciosek, E. Augustyniak, and W. Wróblewski, "Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitive electrode-based electronic tongue for qualitative analysis of beverages," *Analyst*, vol. 129, pp. 639–644, 2004, doi: 10.1039/b401390e.
- [88] J. Ye, "Two-Dimensional Linear Discriminant Analysis," *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, pp. 1–8.
- [89] S. Panigrahi, S. Balasubramanian, H. Gu, C. M. Logue, and M. Marchello, "Design and development of a metal oxide based electronic nose for spoilage classification of beef," vol. 119, pp. 2–14, 2006, doi: 10.1016/j.snb.2005.03.120.
- [90] G. C. Cawley and N. L. C. Talbot, "Efficient leave-one-out cross-validation of kernel Fisher discriminant classifiers," vol. 36, pp. 2585–2592, 2003, doi: 10.1016/S0031-3203(03)00136-5.
- [91] S. R. Sain, "The Nature of Statistical Learning Theory," *Technometrics*, vol. 38, no. 4, pp. 409–409, 1996, doi: 10.2307/1271324.

- [92] G. Mateos-Aparicio Morales and A. J. Caballero Domínguez, “La regresión por mínimos cuadrados parciales : orígenes y evolución,” in *Historia de la Probabilidad y la Estadística*, no. 1979, 1995, pp. 441–448.
- [93] K. Vo, M. Hernandez, and N. Patel, “Chemistry LibreTexts. Electromagnetic Radiation,” 2022. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Fundamentals_of_Spectroscopy/Electromagnetic_Radiation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Fundamentals_of_Spectroscopy/Electromagnetic_Radiation) (accessed Apr. 17, 2022).
- [94] F. Rouessac and A. Rouessac, *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. Madrid: McGraw-Hill, 2003.
- [95] K. Wehbe, J. Filik, M. D. Frogley, and G. Cinque, “The effect of optical substrates on micro-FTIR analysis of single mammalian cells,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 4, pp. 1311–1324, 2013, doi: 10.1007/s00216-012-6521-6.
- [96] “Jasco Spain.” <https://www.jasco-spain.com/> (accessed Sep. 16, 2021).
- [97] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, “Atomic Force Microscope,” vol. 56, no. 9, 1986, doi: 10.1103/physrevlett.56.930.
- [98] P. Taylor, A. Avila, B. Bhushan, A. Avila, and B. Bhushan, “Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences Electrical Measurement Techniques in Atomic Force Microscopy Electrical Measurement Techniques in Atomic Force,” no. April 2013, pp. 37–41, 2010, doi: 10.1080/10408430903362230.
- [99] A. Labuda *et al.*, “Tapping Mode AFM Imaging in Liquids with blueDrive Photothermal Excitation,” *Micros. Today*, vol. 26, no. 6, pp. 12–17, 2018, doi: 10.1017/S1551929518001050.
- [100] D. V. Klinov, A. D. Protopopova, D. S. Andrianov, R. I. Litvinov, and J. W. Weisel, “An Improved Substrate for Superior Imaging of Individual Biomacromolecules with Atomic Force Microscopy,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 196, p. 111321, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111321.
- [101] M. Wasilewska and Z. Adamczyk, “Fibrinogen adsorption on mica studied by AFM and in situ streaming potential measurements,” *Langmuir*, vol. 27, no. 2, pp. 686–696, 2011, doi: 10.1021/la102931a.



- [102] S. Xiong, B. Adhikari, X. D. Chen, and L. Che, "Determination of ultra-low milk fat content using dual-wavelength ultraviolet spectroscopy," *J. Dairy Sci.*, vol. 99, no. 12, pp. 9652–9658, 2016, doi: 10.3168/jds.2016-11640.
- [103] Y. Lei, Q. Zhou, Y. L. Zhang, J. B. Chen, S. Q. Sun, and I. Noda, "Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy," *J. Mol. Struct.*, vol. 974, no. 1–3, pp. 88–93, 2010, doi: 10.1016/j.molstruc.2009.12.030.
- [104] N. Nicolaou, Y. Xu, and R. Goodacre, "Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species," *J. Dairy Sci.*, vol. 93, no. 12, pp. 5651–5660, 2010, doi: 10.3168/jds.2010-3619.
- [105] I. Stefanov, V. Baeten, O. Abbas, B. Vlaeminck, B. De Baets, and V. Fievez, "Evaluation of FT-NIR and ATR-FTIR spectroscopy techniques for determination of minor odd- and branched-chain saturated and trans unsaturated milk fatty acids," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 14, pp. 3403–3413, 2013, doi: 10.1021/jf304515v.
- [106] Y. Sun, Y. Yin, B. T. Mayers, T. Herricks, and Y. Xia, "Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO₃ with ethylene glycol in the presence of seeds and poly(vinyl pyrrolidone)," *Chem. Mater.*, vol. 14, no. 11, pp. 4736–4745, 2002, doi: 10.1021/cm020587b.
- [107] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, "Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio † micellar media , silver nanorods of varied aspect ratio were," pp. 617–618, 2001, doi: 10.1039/b100521i.
- [108] "ISO/TC 34/SC 5 Milk And Milk Products. International Organization For Standardization," 2021. <https://www.iso.org/committee/47878.html> (accessed Sep. 10, 2021).
- [109] T. Markoska, T. Huppertz, M. K. Grewal, and T. Vasiljevic, "Structural changes of milk proteins during heating of concentrated skim milk determined using FTIR," *Int. Dairy J.*, vol. 89, pp. 21–30, 2019, doi: 10.1016/j.idairyj.2018.08.010.

- [110] N. Wada, N. Horiuchi, M. Nakamura, K. Nozaki, A. Nagai, and K. Yamashita, "Controlled crystallization of calcium carbonate via cooperation of polyaspartic acid and polylysine under double-diffusion conditions in agar hydrogels," *ACS Omega*, vol. 3, no. 12, pp. 16681–16692, 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b02445.
- [111] H. Mao, J. Feng, and X. Ma, "One-dimensional silver nanowires synthesized by self-seeding polyol process," 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0887-4.
- [112] A. Zielińska, E. Skwarek, A. Zaleska, M. Gazda, and J. Hupka, "Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size," *Procedia Chem.*, vol. 1, no. 2, pp. 1560–1566, 2009, doi: 10.1016/j.proche.2009.11.004.







CAPÍTULO 8

ANEXOS



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

8. Anexos

Sensors & Actuators: B. Chemical 364 (2022) 131877



Contents lists available at ScienceDirect

Sensors and Actuators: B. Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb

Improving the performance of a bioelectronic tongue using silver nanowires: Application to milk analysis

Coral Salvo-Comino^{a,b}, Patricia Martín-Bartolomé^{a,b}, Jose Luis Pura^{a,b},
Clara Perez-Gonzalez^{a,b,c}, Fernando Martín-Pedrosa^{b,c}, Cristina García-Cabezón^{b,c,*}, María
Luz Rodríguez-Méndez^{a,b,*}^a Group UVASENS, Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid, Paseo del Cañizo, 59, Valladolid 47011, Spain^b Bioceal/VA Research Institute, Universidad de Valladolid, 47011 Valladolid, Spain^c Department of Materials Science, Universidad de Valladolid, Paseo del Cañizo, 59, 47011 Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Electronic tongue
BioET
Electrochemical sensor
Milk

ABSTRACT

Recent advances in the field of electronic tongues (ET) are linked to the development of devices dedicated to a particular application. Following this idea, we have developed a voltammetric bioelectronic tongue (bioET) specifically dedicated to analyze milk. The performance of the multisensor system has been improved by incorporating biosensors combining specific enzymes for the detection of sugars present in milk (β -galactosidase, glucose oxidase and galactose oxidase) with silver nanomaterials. It has been demonstrated that silver nanowires (AgNWs) provide a more effective platform for the immobilization of biomolecules than silver nanoparticles (AgNPs), inducing unique performance characteristics in terms of sensitivity and detection limits. Two multi-sensor systems have been developed; one based on combinations of AgNWs and enzymes (AgNW/bioET) and a second based on combinations of AgNPs and enzymes (AgNP/bioET). Principal component analysis (PCA) demonstrates that the bioET based on combinations of AgNWs and enzymes (AgNW/bioET) can discriminate 9 classes of milk with different fat content (skimmed, semi-skimmed and whole), as well as different nutritional compositions (classic, calcium-enriched and lactose-free), with a higher capacity than the bioET based on combinations of AgNPs and enzymes (AgNP/bioET). Support vector machine (SVM) models show excellent correlation coefficients between the responses of the bioETs and physicochemical parameters commonly used to evaluate the quality of milk (acidity, density, fat, proteins, lactose, total dry matter and non-fat dry matter). The good results obtained support the dairy industry's interest in dedicated bioETs, not only for classification purposes but also to obtain information concerning several physicochemical parameters in a single measurement.

1. Introduction

The implementation of new methods to evaluate the quality and safety of milk is of great importance to the dairy industry [1]. Electrochemical sensors offer several advantages, such as high sensitivity and fast response time. For this reason, a wide range of sensors and biosensors for the quality control of milk has been developed [2].

Electrochemical sensors can be combined to obtain multisensor systems that, coupled to a pattern recognition system, form the so-called electronic tongues (ET). ETs have been widely used to analyze foods and beverages offering global information about the sample [3–5]. They have been employed to analyze dairy products and applied in many aspects of quality control, including the evaluation of taste, freshness,

detection of adulterations, or recognition of the origin [6]. These general systems consist of potentiometric sensors based on polymeric membranes [7–9] or voltammetric sensors based on metallic electrodes [10–14]. Unfortunately, only few attempts to use e-tongues to assess the chemical composition of milk have been reported [9,15,16]. The analysis of milk using ETs is not a completely solved problem and new improvements in the field are required.

ETs can adopt some of the important advances achieved in the field of electrochemical sensors, whose analytical performance can be improved by incorporating nanomaterials that enhance sensitivity thanks to their excellent electrocatalytic properties [17–19]. Only a few examples of ETs dedicated to the dairy industry have used nanomaterials. These include a voltammetric ET based on nanostructured

* Corresponding authors at: Group UVASENS, Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid, Paseo del Cañizo, 59, Valladolid 47011, Spain.
E-mail addresses: crisgar@vill.uva.es (C. García-Cabezón), mluz@vill.uva.es (M.L. Rodríguez-Méndez).

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131877>

Received 10 December 2021; Received in revised form 25 February 2022; Accepted 9 April 2022

Available online 14 April 2022

0925-4005/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Layer-by-Layer films [16]; a potentiometric ET using sensors modified with nanoparticles [20]; and an impedimetric ET with electrodes modified with electrospun nanofibers [18].

The performance of ETs could be improved by developing systems dedicated to a specific application. This is why the development of bioelectronic tongues (bioETs) combining unspecific sensors with biosensors has been an important innovation: bioETs simultaneously provide overall information about the sample (as classical ETs do) plus information about specific compounds provided by the biosensors included in the array [21–27]. In the case of dairy products, the presence of biosensors could provide quantitative information about sugars (lactose, glucose or galactose) and this will be an important advantage in the field. The efficiency of electrochemical biosensors can be fostered by combining enzymes with such nanomaterials as nanocarbons or nanoparticles. Such nanomaterials are efficient electron mediators and are excellent immobilization platforms. In addition, nanomaterials can be used to obtain third generation biosensors based on Direct Electron Transfer (DET) [28]. Only a few examples of voltammetric bioETs using combinations of enzymes and nanomaterials have been reported. For instance, a bioET containing phenol oxidases and glucose oxidase combined with nanoparticles has been successfully used to analyze grapes and musts [29,30]. The development and study of the capabilities of multisensor systems containing different combinations of enzymes and nanomaterials is a new field of research.

Our purpose here is to design a bioET specifically dedicated to milk by developing biosensors formed by the combination of enzymes specific to the sugars present in milk and nanomaterials. Milk is rich in lactose, glucose and galactose and their concentration is directly related to the quality and type of milk [31]. Several examples of individual biosensors dedicated to the detection of lactose, glucose and galactose, where β -galactosidase (β -Gal), glucose oxidase (GOx) and galactose oxidase (GaOx) have been co-immobilized with nanomaterials (graphene, CNTs, AuNPs), have been published [28,32–35]. Silver nanoparticles (AgNPs) can be an excellent alternative to enhance the performance of biosensors due to their electrochemical properties, their high electrical conductivity ($6.301 \times 10^7 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$), and their ability to amplify bioelectrochemical signals [36–39]. Recently, it has been evidenced that the morphology of the nanomaterial has a strong influence on the electrochemical response of biosensors. One dimensional (1D) metallic nanomaterials (nanowires or nanotubes) have much higher electron mobility and density of active sites, as well as a higher specific surface area than their 0D counterparts [40]. Despite this interest, only a few examples of biosensors combining AgNWs with enzymes have been reported. These include one example of a tyrosinase biosensor [41], three examples of glucose biosensors [42–44], and one example of a cholesterol biosensor [45]. Until now, the benefits of incorporating AgNWs based biosensors in a bioET have not been evaluated.

As mentioned before, the objective of this work is to design a bioET dedicated to analysing milk. The system will be used for discrimination and classification purposes. In addition, in order to obtain quantitative information, the system will include three enzymes (β -Gal, GOx and GaOx) specific to compounds present in milk (lactose, glucose and galactose). To enhance the performance of the biosensors, enzymes were combined with silver nanowires that have been used as immobilization supports. The bioET based on AgNWs and enzymes (AgNW/bioET) was applied to the analysis of 63 UHT milk samples with different fat content and nutritional composition. The performance was compared to that of a similar bioET based on combinations of nanoparticles and enzymes (AgNP/bioET). The capability to discriminate and classify has been evaluated using unsupervised (PCA) and supervised (LDA) multivariate methods. SVMR was also used to create mathematical models to correlate the physicochemical parameters commonly used in the milk industry to evaluate the quality of milk (acidity, density, lactose, fat and protein content and total dry matter and non-fat dry matter) with the electrochemical responses of the bioETs. The benefits of using Ag nanowires (AgNWs) instead of Ag nanoparticles (AgNPs) have been

established by comparing the capabilities of the bioET based on AgNWs with that of a similar device based on AgNPs.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Silver nitrate (AgNO_3), polyvinylpyrrolidone (PVP, Mw = 55,000), ethylene glycol (EG) anhydrous (99.8%), phosphate buffer, acetone, ethanol, Nafion® 117 solution, galactose oxidase (GaOx) (from *Dactyloctenium aegyptium*, 3000 u/g solid), β -galactosidase (β -Gal), (from *Aspergillus oryzae*, 10,9 u/mg solid) and glucose oxidase (GOx) (from *Aspergillus niger*, 168400 u/mg solid) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Deionized water from MilliQ (Millipore-Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) (resistivity 18.2 M Ω -cm) was used in all experiments. Potassium chloride (KCl) was provided by PanReac AppliChem (Barcelona, Spain). Boron Doped diamond substrates were provided by NEOCOAT (La Chaux-de-Fonds, Switzerland). NaBH_4 98% was purchased from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA).

2.2. Instruments

The synthesis of the AgNWs was carried out using a Perimax peristaltic pump from Spetec and a Sorvall ST 8 Centrifuge (Thermo Scientific, Waltham, USA). UV-Vis characterization of silver nanomaterials was performed in a UV-2600 device (Shimadzu, Duisburg, Germany). Electrochemical measurements were carried out using a PGSTAT128 potentiostat/galvanostat (Autolab Metrohm, Utrecht, The Netherlands) in a three-electrode electrochemical cell, using a BDD sensor as the working electrode. Ag=AgCl/KCl was used as the reference electrode and a platinum sheet (2 cm²) as the counter electrode.

Atomic force microscopy (AFM) was used to determine the topography of the films deposited on the BDD substrates in a Cypher ES Environmental AFM device (Oxford Instruments, Asylum Research, Wiesbaden, Germany) operated in tapping mode with blueDrive photothermal excitation technology. The tip used was AC160TSA-R3 (Oxford Instruments, Asylum Research, Wiesbaden, Germany).

2.3. Milk samples

A set of 63 UHT milk samples corresponding to 9 classes of milk (7 replicas per class) with different fat content and different nutritional composition were used in the study. The milk categories included were: Classic Skimmed (CS), Classic Semi-Skimmed (CSS), Classic Whole (CW), Calcium Skimmed (CaS), Calcium Semi-Skimmed (CaSS), Calcium Whole (CaW), Lactose-Free Skimmed (LFS), Lactose-Free Semi-Skimmed (LFSS) and Lactose-Free Whole (LFW).

Physicochemical parameters were obtained by classical standard methods: acidity (Titration method ISO 22113:2012), density (Hydrometer method ISO 2449:1974), fat (Gravimetry Röse-Gottlieb method ISO 1211:2010), proteins (Kjeldahl method ISO 8968-1:2014), lactose content (HPLC ISO 22662:2007). Total dry matter (TDM) and non-fat dry matter (NFD) were also analysed (ISO 6731:2010) [46]. Results are collected in Table S.1.

2.4. Preparation of the biosensors: Bioelectronic tongue

AgNWs were synthesized following a modification of the polyol method described in a previous work [41]. AgNPs were synthesized following the Creighton method [47]. The silver nanomaterials were deposited onto BDD substrates (1 cm²) by adding 25 μ L of the corresponding silver nanomaterial suspension (2 g/L AgNWs or AgNPs in ethanol) by drop-casting. After drying, 25 μ L of the enzyme (5 g/L GOx, GaOx and β -Gal in phosphate buffer 0.01 M, pH 7.0) were drop-casted onto the electrode surface. After drying, 25 μ L of Nafion diluted in ethanol 1:3 was drop-casted and left to dry overnight at room

temperature. Finally, the biosensors were washed with a phosphate buffer 0.01 M solution.

2.5. Bioelectronic tongues (bioETs)

The biosensors thus obtained were used to construct two bioETs. The first, denoted as AgNW/bioET, was based on combinations of enzymes with AgNWs (β -Gal/AgNWs, GOx/AgNWs and GaOx/AgNWs). The second, denoted as AgNP/bioET, was based on combinations of enzymes and AgNPs (β -Gal/AgNPs, GOx/AgNPs and GaOx/AgNPs and). Both bioETs were used to analyze milks with different nutritional characteristics. The electrochemical responses were probed by cyclic voltammetry (CV) in milk diluted 1:2 in 0.1 M KCl solution. The area of the BDD exposed to milk was 0.07 cm^2 limited by an O-ring seal.

The measurements were registered over a potential range of -1 – 1 V, a potential step of 10 mV, and at a scan rate of 100 mV/s. It is important to remark that the optimum pH of the enzymes GOx, GaOx and β -Gal are 7.5, 7 and 6 respectively. All three enzyme enzymes are active at pHs between 5.5 and 9 that corresponds to the pH of diluted milk.

The multivariate data analysis was performed by using MATLAB R2021a (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA). For statistical purposes, milk samples were measured by septuplicate. To reduce the high dimensionality of the voltammetric signals, a feature extraction tool, based on "bell-shaped-windowing" curves called "kernels", was used [48,49]. Using this method, eight coefficients per voltammogram were obtained. These coefficients were then used as the input variables for the Principal Component Analysis (PCA) and the Linear Discriminant Analysis (LDA), used for the recognition of sample patterns and its (similarities) between varieties of milk. Mathematical correlations between the results obtained using the voltammograms registered by the bioET and the physicochemical analysis were established using Support Vector Machine Regression (SVMR) models. Radial Basis Function was chosen as the core function because of its ability to avoid overfitting and its capability to establish non-linear correlations between the data sets. All the classification models were subjected to leave one out validation.

3. Results and discussion

3.1. Structural characterization of the biosensors

AFM images of the BDD electrodes covered with AgNPs, AgNWs and combinations of nanomaterials with enzymes are illustrated in Fig. 1. AgNPs appeared as spherical structures with an average diameter of 80 ± 10 nm. The images of AgNWs displayed large and homogeneous wires with an average diameter of 550 ± 43 nm and length of 10 ± 2 μm . When the enzymes were immobilized on the nanomaterial surface, an increase in the size of the nanostructures was observed. This is illustrated in Fig. 1.c.–1.f., where the topographic images of β -Gal deposited onto AgNPs or AgNWs are shown. As observed in the figure, the enzymes appeared homogeneously distributed on the nanomaterial surface, producing a clear increase in the diameter of the nanostructures (diameters of 180 ± 28 nm for β -Gal/AgNPs and 750 ± 81 nm for β -Gal/AgNWs). Similar results were obtained with GaOx (GaOx/AgNPs diameter 173 ± 23 nm; GaOx/AgNWs diameter 717 ± 74 nm) and GOx (GOx/AgNPs diameter 160 ± 19 nm; GOx/AgNWs diameter 692 ± 73 nm).

3.2. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS)

Using electrochemical impedance spectroscopy (EIS), the interface properties of the sensors were investigated. This approach determines the electron transfer resistance (R_{et}), from the diameter value of the semicircle obtained from the Nyquist diagram. EIS experiments were carried out on a bare BDD substrate, BDDs modified with AgNPs or AgNWs, BDDs modified with enzymes, and BDDs modified with enzyme/AgNPs or enzyme/AgNWs composites, immersed in 5 mmol L^{-1} $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ in KCl 0.1 M. The results obtained are collected in Table S.2. The Nyquist plot of the electrodes analyzed showed similar trends and this is illustrated in (Fig. 2). As observed, the R_{et} of the BDD bare electrode was estimated to be $65.1 \pm 3.6 \Omega/\text{cm}^2$. This value decreased to $47.1 \pm 1.8 \Omega/\text{cm}^2$ when AgNPs were deposited on the electrode surface and to $14.3 \pm 0.4 \Omega/\text{cm}^2$ when AgNWs were used (Fig. 2.a). Taking into account the fact that the masses of the AgNPs and AgNWs deposited onto the BDD electrode were similar, this result confirms that the conductivity and the electron transfer resistance of the

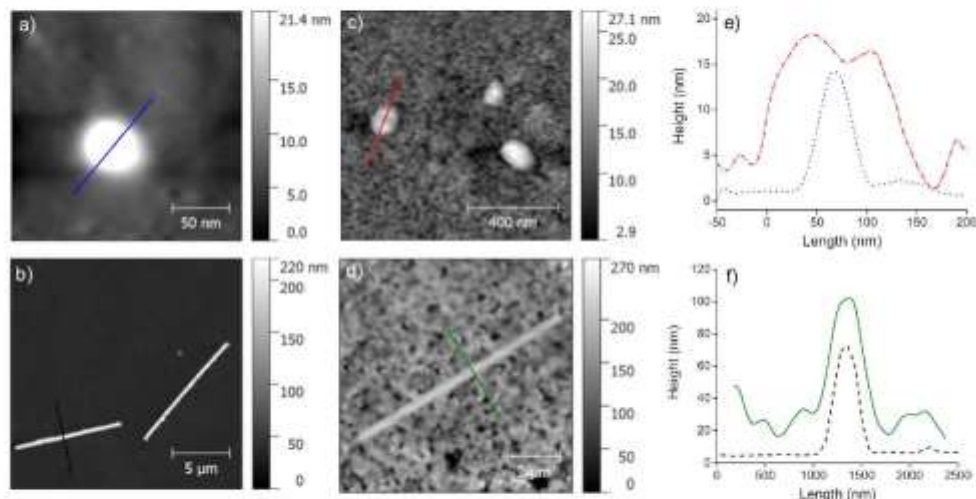


Fig. 1. AFM topography of (a) AgNPs, (b) AgNWs, (c) β -Gal/AgNPs, (d) β -Gal/AgNWs. AFM profile of (e) AgNPs (blue dotted line) and β -Gal/AgNPs (red dashed-dotted line) and (f) AgNWs (black dashed line) and β -Gal/AgNWs (green solid line).

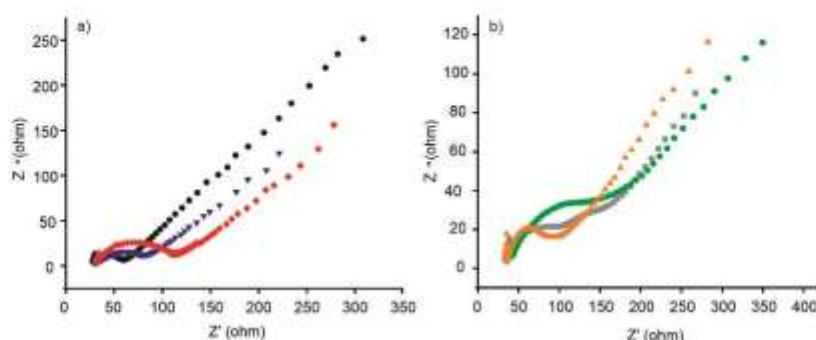


Fig. 2. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of (a) bare BDD (red squares), AgNP (blue triangles) and AgNW (black circles) sensors and (b) β -Gal (green circles), β -Gal/AgNW (orange triangles) and β -Gal/AgNP (gray squares) biosensors in the presence of 5mmolL^{-1} $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-/4-}$ in KCl 0.1 M .

modified electrode is affected by the shape and size of the silver nanomaterial. The higher aspect ratio of AgNWs provides higher electrical conductivity and electron transfer capabilities than AgNPs. The Nyquist plot of the electrodes modified with enzymes is illustrated in Fig. 2.b for β -Gal. As observed in the figure, the value of the R_{ct} for a BDD electrode modified with β -Gal was found to be $139.6 \pm 5.7 \Omega/\text{cm}^2$. The resistance decreased in the presence of nanomaterials, being $43.2 \pm 1.4 \Omega/\text{cm}^2$ for β -Gal/AgNPs and $36.2 \pm 0.7 \Omega/\text{cm}^2$ for β -Gal/AgNWs. The same trends were observed in biosensors modified with GOx and GaOx.

3.3. Electrochemical properties

The electrochemical characteristics of the sensing devices were analyzed by studying the responses towards standard solutions of the target analytes (10^{-4} molL^{-1} glucose, galactose or lactose in 0.01 molL^{-1} phosphate buffer pH 7.00) (Fig. 3, S1 and S2).

The electrochemical responses of BDD electrodes modified with AgNPs or AgNWs showed the typical Ag^+/Ag redox couple at ca. $\sim 200\text{ mV}$ (cathodic wave) and $\sim 400\text{ mV}$ (anodic wave) [41] (Fig. S3).

When GOx or GaOx were deposited on a bare BDD electrode, very small response was observed, apart from a wide cathodic peak at

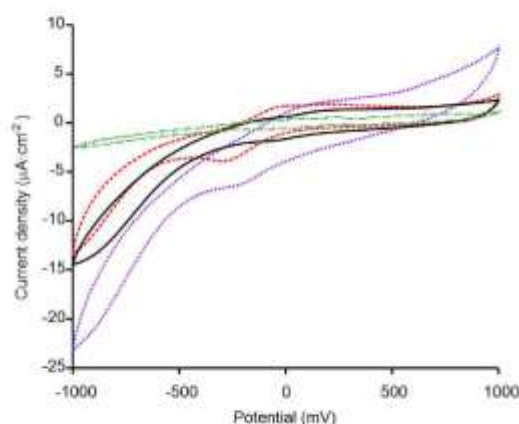


Fig. 3. Cyclic voltammograms obtained for GOx (black solid line), GOx/AgNPs (red dashed line) and GOx/AgNWs (blue dotted line) electrodes in the presence of glucose 10^{-4} molL^{-1} in 0.01 molL^{-1} phosphate buffer pH 7.00 and for GOx/AgNWs (green dash-dotted line) in the absence of glucose in 0.01 molL^{-1} phosphate buffer pH 7.00.

$\sim 900\text{ mV}$ corresponding to the formation of H_2O_2 according to Reaction 1 linked with the oxidation of the enzyme.

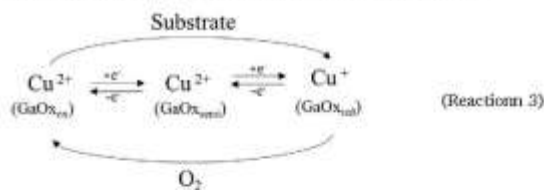


The responses of the GOx/AgNPs biosensor showed redox peaks at $E_{an} = -30\text{ mV}$ and at $E_{cat} = -250\text{ mV}$, and GOx/AgNWs biosensor showed peaks at $E_{an} = 70\text{ mV}$ and at $E_{cat} = -200\text{ mV}$, for GOx/AgNWs. These peaks are attributed to the transference of two protons and two electrons from glucose to GOx through the electroactive enzyme cofactor FAD to produce FADH_2 (Reaction 2).



This result confirmed the occurrence of Direct Electron Transfer (DET) at the silver nanomaterial surface. This is an interesting result because DET is quite difficult to achieve, since the redox-active centers are deeply embedded in the enzyme structure. It has been reported that DET can be facilitated by depositing GOx or GaOx on top of such nanostructures as carbon nanotubes (CNTs), graphene or carbon nanospheres, among others [28,50–52]. The results displayed here are an example of DET using silver nanomaterials as support. It is worth noting that the intensity of the peaks was higher when AgNWs were used as the enzymatic support over spherical nanoparticles.

The electrochemical response of galactose oxidase biosensors (GaOx/AgNPs and GaOx/AgNWs) also involved the transfer of two electrons and two protons to catalyze the oxidation of galactose through the oxidation and reduction of its copper center (Reaction 3) [53]. It was characterized by an anodic peak at $\sim 200\text{ mV}$ and a cathodic peak at $\sim 100\text{ mV}$, characteristic of the $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{I})$ redox couple of the enzyme. Very small peaks were observed when GaOx was deposited on unmodified BDD electrodes because the redox center is not accessible.



In the case of biosensors based on β -Gal, the cathodic wave observed at $\sim -850\text{ mV}$ was due to the variations of ion concentrations produced by the lactose hydrolysis involving proton transfer through the nafion membrane [54]. In the absence of redox processes, DET is not applicable.

The voltammetric responses obtained at different scan rates (from 10

to 1000 mV s⁻¹) were employed to study the dynamics of the electron transfer process of the biosensors. In the case of GOx and GaOx, the studies were carried out using the cathodic peak corresponding to the DET process in the 200–250 mV region. In the cases of β-Gal, the studies were carried out in the cathodic peak at ca. - 850 mV. All the biosensors showed a linear relationship with the square root of the scan rate, in the range of 100 – 1000 mV s⁻¹. This is typical of a diffusion-controlled process. In the range of 10–100 mV s⁻¹, the cathodic current was linearly dependent on the scan rate, indicating that, within this range, the limiting step was a surface-controlled process. The obtained slopes and the correlation coefficients are listed in Table 1.

The studies carried out at increasing scan rates were also used to calculate the active area A and the surface coverage (Γ) to determine the molecular active sites of the biosensors and to evaluate the benefits of using AgNWs or AgNPs. For this purpose, the Randles-Sevcik equation was used to estimate the electrochemical active surface area (A) of the developed biosensors in the high scan rate range, following Eq. 1:

$$I_p = 0.4463nFA \left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2} D^{1/2} \nu^{1/2} C \quad (1)$$

where n is the electron transfer number, A is the active area of the electrode surface, D is the diffusion coefficient for the oxidized species at 298.15 K ($D_{\text{glucose}} = 6.7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $D_{\text{galactose}} = 7.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ and $D_{\text{lactose}} = 5.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [55]), C is the concentration of the solution, ν is the scan rate and other symbols have their usual meanings. The area A was calculated from the slope of the curve obtained by representing the cathodic peak current versus the square root of the scan rate. Then, the electrode surface coverage (Γ) was calculated from the slope of the curve obtained by representing the cathodic peak current versus the scan rate, using the Laviron equation (Eq. 2) [56]:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma \nu}{4RT} \quad (2)$$

The product AΓ was used to calculate the number of molecular active sites, which is a useful parameter to evaluate the influence of the shape of the silver nanostructures. As shown in Table 1, the number of active sites increased in the presence of metallic nanomaterials. Remarkably, the higher values were always obtained when AgNWs were used as enzymatic support instead of AgNPs. For instance, the number of active sites was 5.20 μmol for GOx (in the absence of nanomaterial) and increased to 6.01 μmol (GOx/AgNPs), and to 6.62 μmol (GOx/AgNWs). The same tendency was observed for GaOx biosensors, where the number of active sites was 5.20 μmol in the absence of nanomaterial, 6.96 μmol for GaOx deposited on AgNPs, and 8.87 μmol for GaOx

immobilized on AgNWs. This increase can be attributed to conformational changes induced by the interaction between the enzymes and the nanomaterials, which facilitate the DET between the enzymatic active site and the electrode [57,58]. The effect is more intense in biosensors containing AgNWs because nanowires offer a higher contact surface to the enzymes and show a larger capacity for protein loading than nanoparticles. The increase in the number of active sites was even stronger in the case of β-Gal (2.56 μmol for β-Gal; 2.88 μmol for β-Gal/AgNPs and 4.70 μmol for β-Gal/AgNWs).

The direct electron rate constants (k_d) and the charge transference coefficient α associated to the DET phenomenon for GOx and GaOx biosensors were calculated at a scan rate value of 1000 mV/s following Eq. 3 [56]:

$$\text{Log}k_d = \alpha \text{log}(1-\alpha) + (1-\alpha) \text{log}\alpha - \text{log}(RT/nFv) - \alpha(T-\alpha)(nF\Delta E_p/2.3RT) \quad (3)$$

The k_d and values for the GOx/AgNWs and GOx/AgNPs biosensors were 1.05 s⁻¹ and 0.28 s⁻¹ and 1.49 s⁻¹ and 1.31 s⁻¹ respectively. The α value could also be easily calculated from the slope of I_{pc} vs. $\text{log} \nu$ [56]. The values obtained were 0.56 for GOx/AgNWs, 0.69 for GOx/AgNPs, 0.57 for GaOx/AgNWs and 0.37 for GaOx/AgNPs biosensors. The calculated values were higher when AgNWs were used. These results demonstrate that the presence of nanowires accelerates the DET process with a fast direct electron transfer process.

The LOD and sensitivity were obtained from the calibration curves from the Differential Pulse Voltammograms at increasing concentrations of glucose, galactose or lactose. The results are listed in Table 1. The LODs were calculated using the 3σ/m criterion, where σ is the standard deviation for 5 measures of the blank and m is the slope of the calibration plot for the cathodic peak. The LODs obtained were lower or comparable to previously reported results for GOx, GaOx and β-gal immobilized on nanomaterials [58–62]. In addition, the LODs were lower when AgNWs were used as support, reaching values in the range of 10⁻¹⁰ M, which is one order of magnitude lower than in the LODs obtained in the presence of AgNPs. This considerable enhancement confirms that AgNWs improve the efficiency of the enzymatic immobilization, increasing the number of active sites and promoting electron transfer. The sensitivity calculated from the slope of the linear part of the calibration plot was higher in the presence of AgNWs. This is due to the large specific surface area and the higher number of active sites provided by nanowires that facilitate the electron transfer. Finally, the linear ranges observed were higher or at least comparable to other published enzymatic glucose oxidase, galactose oxidase or β-galactosidase biosensors [58–62].

In order to determine the enzyme-substrate affinity, the apparent

Table 1
Results obtained from studies at increasing scan rates and increasing concentrations of the corresponding substrate.

	Biosensor	Slope I vs. V 10–100 mV s ⁻¹	Slope I vs. V ^{1/2} 100–1000 mV s ⁻¹	Active sites (μmol)	[Sensitivity] (A M ⁻¹)	[LOD] (nM)	[LOD] (%) (m)	Linear range (nM)	K _M ^{app} (μM)
Response to lactose	β-Gal	0.61 ± 1.27 (R ² =0.989)	29.55 ± 4.62 (R ² =0.984)	2.56 ± 0.33	18.44 ± 2.47 (R ² =0.904)	9.85 ± 1.31	0.33 ± 0.01	2.2–66	8.45 ± 0.48
	β-Gal/ AgNPs	10.43 ± 1.02 (R ² =0.958)	29.61 ± 3.72 (R ² =0.987)	2.88 ± 0.27	19.70 ± 1.87 (R ² =0.986)	2.71 ± 0.25	0.09 ± 0.01	2.2–66	517.3 ± 25.8
	β-Gal/ AgNWs	17.66 ± 1.36 (R ² =0.986)	29.94 ± 3.64 (R ² =0.988)	4.70 ± 0.36	71.41 ± 3.88 (R ² =0.999)	0.14 ± 0.01	0.04 ± 0.01	2.2–66	139 ± 5.9
	GOx	21.07 ± 1.96 (R ² =0.951)	28.72 ± 4.54 (R ² =0.983)	5.20 ± 0.64	79.13 ± 6.87 (R ² =0.885)	3.40 ± 0.30	0.12 ± 0.01	2.2–31	37.3 ± 2.1
Response to glucose	GOx/ AgNPs	22.08 ± 1.42 (R ² =0.994)	33.04 ± 2.65 (R ² =0.981)	6.01 ± 0.52	64.81 ± 4.66 (R ² =0.888)	0.97 ± 0.07	0.03 ± 0.01	2.2–31	69.4 ± 3.3
	GOx/ AgNWs	24.90 ± 1.39 (R ² =0.985)	26.23 ± 2.10 (R ² =0.988)	6.62 ± 0.41	83.03 ± 4.21 (R ² =0.952)	0.31 ± 0.01	0.010 ± 0.01	2.2–31	53.2 ± 2.2
	GaOx	19.50 ± 2.08 (R ² =0.927)	21.68 ± 3.63 (R ² =0.969)	5.20 ± 0.36	32.24 ± 3.65 (R ² =0.984)	1.98 ± 0.22	0.07 ± 0.021	2.2–11	2.1 ± 0.1
	GaOx/ AgNPs	26.17 ± 1.83 (R ² =0.979)	30.43 ± 2.14 (R ² =0.994)	6.96 ± 0.33	27.20 ± 2.18 (R ² =0.964)	3.12 ± 0.24	0.11 ± 0.01	2.2–36	28.0 ± 1.4
Response to galactose	GaOx/ AgNWs	33.20 ± 2.15 (R ² =0.977)	27.16 ± 2.22 (R ² =0.979)	8.87 ± 0.39	92.63 ± 6.04 (R ² =0.929)	0.23 ± 0.01	0.01 ± 0.02	2.2–33	123 ± 6.4

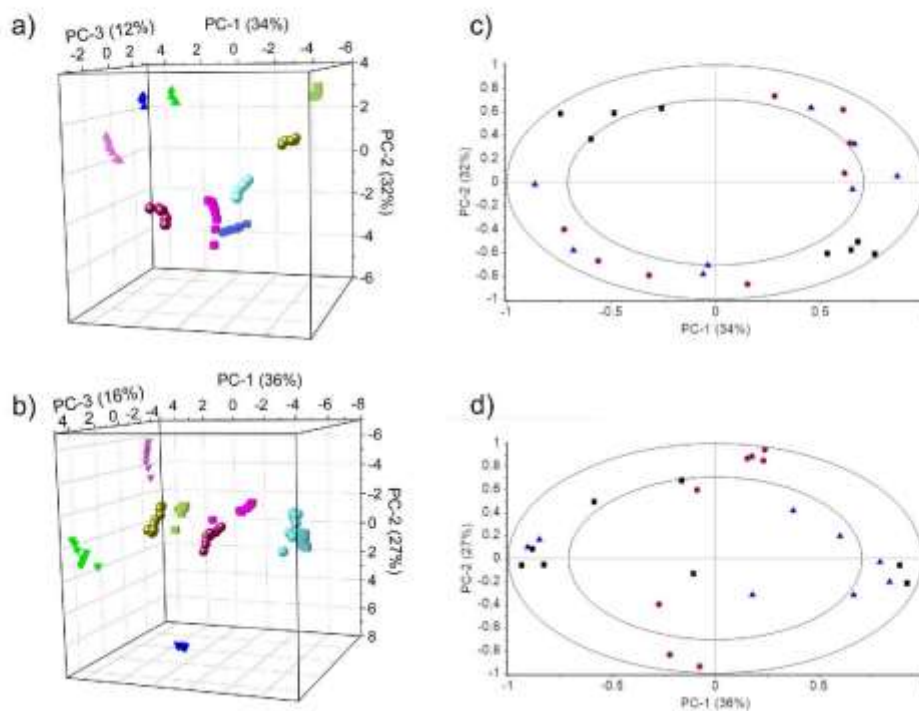


Fig. 5. Left: PCA score-plots of a) AgNW/bioET and b) AgNP/bioET. Right: PCA loading plots of c) AgNW/bioET and d) AgNP/bioET. The obtained results are from milk with different fat contents: [Skimmed (pinkish colors), Semi-Skimmed (blueish colors) and Whole (greenish colors)]; or nutritional characteristics: [Classic milk (circles), milk enriched with Calcium (triangles), Lactose-Free milk (squares)]. In the loading plots, the biosensor arrays were represented by β -Gal/AgNWs or β -Gal/AgNPs (black squares), GaOX/AgNWs or GaOX/AgNPs (red circles), and GOX/AgNWs or GOX/AgNPs (blue triangles).

Table 2
Results of the calibration and validation of LDA classification models for both bioETs.

AgNW/bioET				
Training	Calcium	21 (100%)	0	0
	Classic	0	21 (100%)	0
	Lactose free	0	0	21 (100%)
Validation	Calcium	21 (100%)	0	0
	Classic	0	20 (100%)	0
	Lactose free	0	1 (4.75%)	20 (95.25%)
AgNP/bioET				
Training	Calcium	21 (100%)	0	0
	Classic	0	21 (100%)	0
	Lactose free	0	0	21 (100%)
Validation	Calcium	21 (100%)	0	0
	Classic	0	21 (100%)	0
	Lactose free	0	1 (4.75%)	20 (95.25%)

function due to its ability to avoid overfitting and its capability to handle non-linear interactions between sensor inputs and target characteristics [65]. The regularization parameters (c) and kernel parameter (γ) were optimized by applying a grid search method, where approaches to the model were made using $\log_{10}c$ and $\log_2\gamma$, varying from [10] for an epsilon of 0.1. The best validation accuracy for each of the systems developed was achieved when $\gamma = 0.01$ combined with $c = 100$ and $\epsilon = 35.94$, for AgNW/bioET and AgNP/bioET, respectively.

Good correlation coefficients (R^2) and low residual errors were obtained in both calibration and prediction for all the parameters analyzed. Excellent correlations were obtained for protein concentration and acidity, which are among the parameters most commonly used in the dairy industry to evaluate the quality of milk. The high correlation with acidity can be explained by the strong influence of the pH in enzymatic activity. The good correlation found with lactose is due to the enzymes included in the array, whose targets were lactose and the two components of lactose (galactose and glucose). It is also remarkable how, in the case of lactose concentration, the AgNW/bioET achieved a higher correlation coefficient of 0.988 compared to 0.974 for the AgNP/bioET. This could be explained by an enhanced enzymatic response of the biosensors in the presence of AgNWs, since the enzymes in the bioET were selected specifically to detect changes in lactose content.

Thus, using the AgNW/bioET could be a better choice to assess simultaneously in a single measurement.

3.5. Repeatability, reproducibility and lifetime

The repeatability was analyzed by measuring the decrease in intensity after 5 consecutive cycles. In all cases the coefficient of variation was lower than 4.9% in standard solutions and lower than 6.3% in milk. The reproducibility was calculated from the responses of two identical sensors. Values were lower than 3.9% for sensors immersed in standard solutions and lower than 4.3% in sensors immersed in milk samples, confirming the good level of precision achieved in the fabrication of the biosensors (Fig. S5). Biosensors could be cycled repeatedly (up to 50 cycles) without considerable losses of intensity (lower than 8%).

Table 3
Results of the calibration and validation of SVMR for both bioETs.

AgNW/bioET							
	Acidity (°D)	Density (g/ml)	Fat (%w)	Proteins (%w)	Lactose (%w)	TDM (%w)	NFDM (%w)
R ² _c	0.984	0.987	0.995	0.984	0.988	0.979	0.986
RMSE _c	0.137	0.348	0.137	0.025	0.252	0.171	0.061
R ² _p	0.975	0.977	0.953	0.975	0.966	0.945	0.975
RMSE _p	0.210	0.403	0.292	0.037	0.428	0.347	0.088
AgNP/bioET							
	Acidity (°D)	Density (g/ml)	Fat (%w)	Proteins (%w)	Lactose (%w)	TDM (%w)	NFDM (%w)
R ² _c	0.973	0.981	0.992	0.973	0.974	0.976	0.983
RMSE _c	0.148	0.353	0.121	0.026	0.381	0.175	0.061
R ² _p	0.970	0.977	0.988	0.973	0.951	0.968	0.978
RMSE _p	0.191	0.402	0.149	0.033	0.538	0.218	0.076

RMSE_c: "root mean square of calibration error", R²_c: correlation coefficient in calibration RMSE_p: "root means square of prediction error", R²_p: correlation coefficient in prediction.

However, once the sensors were withdrawn from the milk, a decrease in the intensity of the peaks was perceived (due to the adhesion of a layer of fat). For this reason, biosensors were considered as disposable devices and each milk was analyzed with a new set of sensors.

4. Conclusions

In this work, different strategies were followed to obtain a bio-electronic tongue dedicated to the analysis of milk with improved performance. On the one hand, the array included biosensors based on enzymes able to detect sugars present in milk (β -galactosidase, galactose oxidase and glucose oxidase). On the other hand, the performance of the biosensors was improved by combining the enzymes with silver nanomaterials that induce unique performance characteristics in terms of sensitivity. It has been demonstrated that the aspect ratio of the nanomaterial is of great importance. Silver nanowires (AgNWs) provide a more effective platform for the immobilization of biomolecules than silver nanoparticles (AgNPs). The LODs were lower when AgNWs were used as support, reaching values in the range of 10^{-10} M, which was one order of magnitude lower than in the LODs obtained in the presence of AgNPs. These results demonstrate that the presence of nanowires accelerates the DET process with a fast, direct electron transfer process.

Principal component analysis (PCA) demonstrated that the bioET based on combinations of AgNWs and enzymes could discriminate 9 commercial types of milk according to their nutritional composition, with a higher capacity than the bioET based on combinations of AgNPs and enzymes. The PCA loading plot confirmed the excellent complementarity of the biosensors.

Excellent correlations with the chemical parameters commonly used in the quality control of milk were found using Support Vector Machines. This result confirms that the developed system shows the benefits of biosensors (specificity), nanomaterials (promoting the enzymatic activity) and the advantages of multisensory systems that provide global information about the sample and, at the same time, can be used to give quantitative information of several physicochemical parameters in a single measurement. Although both bioETs work appropriately, the AgNW/bioET-NWs could be a better choice than the AgNP/bioET due to the larger specific surface area and the higher number of active sites provided by nanowires.

CRedit authorship contribution statement

As the corresponding author of this paper, I declare that the contribution of the authors have been the following: **Coral Salvo-Comino**: Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing, **Fernando Martín-Pedrosa**: Software, **Cristina García-Cabezón**: Conceptualization, **María Luz Rodríguez-Méndez**: Conceptualization, Project administration, Writing – review & editing, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We appreciate the financial support of Spanish Ministry of Science and Innovation (RTI2018-097990-B-I00), Junta de Castilla y León-FEDER VA202P20 and "Infraestructuras Red de Castilla y León (INFRARED)" UVA01 and the EU-FEDER program (CLU-2019-04). One of us C-SC thanks to the Spanish Ministry of Science and Innovation for the PFI fellowship (AGL 2015-67482-R).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.snb.2022.131877](https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131877).

References

- [1] K. Guadhi, R. Sharma, P.B. Gautam, B. Mann, *Chemical Quality Assurance of Milk and Milk Products*, First Ed., Springer Nature, Switzerland AG, 2020 <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4167-4>.
- [2] M. Ruedi, A. Harnschoony, E. Hartung, Technical solutions for analysis of milk constituents and abnormal milk, *J. Dairy Sci.* 93 (2) (2010) 427–436, <https://doi.org/10.3168/jds.2009.2565>.
- [3] J. Tan, J. Xu, Applications of electronic nose (e-nose) and electronic tongue (e-tongue) in food quality-related properties determination: a review, *Artif. Intell. Agric.* 4 (2020) 104–115, <https://doi.org/10.1016/j.iaia.2020.06.003>.
- [4] M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. De Saja, B. González-Antón, Electronic noses and tongues in wine industry, *Front. Biosci. Biotechnol.* 4 (81) (2016) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00361>.
- [5] D. Ha, Q. Sun, K. Sa, H. Woo, H. Li, H. Xu, F. Sun, L. Zhuang, H. Hu, P. Wang, Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors, *Sens. Actuators B Chem.* 207 (2015) 1136–1146, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.077>.
- [6] P. Gosw, *Milk and Dairy Products Analysis by Means of an Electronic Tongue*, in: M.L. Rodríguez-Méndez (Ed.), *Electronic Noses and Tongues in Food Science*, 21, Academic Press, 2016, pp. 209–223, <https://doi.org/10.1016/C2013-0-14449-2>.
- [7] I. Tsai, K. Triyana, D. Siswanta, A.C.A. Veloso, A.M. Perez, L.G. Dias, Dairy products discrimination according to the milk type using an electrochemical multisensor device coupled with chemometric tools, *J. Food Meas. Charact.* 12 (2018) 2385–2393, <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9835-0>.
- [8] L.A. Dias, A.M. Perez, A.C.A. Veloso, P.S. Reis, M. Vilas-Boas, A.A.S.C. Machado, An electronic tongue taste evaluation: identification of goat milk adulteration with bovine milk, *Sens. Actuators B Chem.* 136 (2009) 289–217, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.09.025>.
- [9] C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, L. Díaz, M.A. Rodríguez-Pérez, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez, Analysis of milk using a portable potentiometric electronic tongue based on five polymeric membrane sensors, *Front. Chem.* 9 (2021), 706460, <https://doi.org/10.3389/fchem.2021>.



- [10] F. Winqvist, C. Krantz-Rudiker, P. Wide, I. Lundström, Monitoring of fresh milk, by an electronic tongue on the basis of voltammetry, *Meas. Sci. Technol.* 9 (1998) 1937–1946, <https://doi.org/10.1088/0957-0222/9/12/002>.
- [12] J. Wei, W. Wang, Evaluation of varieties of set yogurts and their physical properties using a voltammetric electronic tongue based on various potential scanforms, *Sens. Actuators B Chem.* 177 (2013) 684–694, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.056>.
- [13] I. Pascual, M. Gras, D. Vidal-Brotons, M. Alcañiz, R. Martínez-Máñez, J.V. Ros-Lis, A voltammetric e-tongue tool for the emulsion of the sensorial analysis and the discrimination of vegetal milks, *Sens. Actuators B Chem.* 270 (2018) 231–238, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.151>.
- [14] M. Borgini, K. Tahi, Z. Haddi, H. B. Bari, E. Uebet, R. Jańczak-Bemant, B. Bouchikha, Aging time and brand determination of pasteurized milk using a multisensor e-nose combined with a voltammetric e-tongue, *Mater. Sci. Eng. C* 45 (2014) 348–358, <https://doi.org/10.1016/j.msc.2014.09.030>.
- [15] M. Hraikha, H. Major, M. Kapan, K. Vahčić, Simultaneous determination of fermented milk aroma compounds by a potentiometric sensor array, *Talanta* 82 (4) (2010) 1292–1297, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.04>.
- [16] C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, C. García-Cabezo, M.L. Rodríguez-Méndez, Discrimination of milks with a multisensor system based on layer-by-layer films, *Sensors* 18 (10) (2018) 2710, <https://doi.org/10.3390/s18102710>.
- [17] Q. Wang, M. del Valle, Determination of Chemical Oxygen Demand (COD) using nanoparticle-modified voltammetric sensors and electronic tongue principles, *Chemosensors* 9 (3) (2021) 46, <https://doi.org/10.3390/chemosensors903046>.
- [18] K.B.R. Teodoro, F.M. Shinzato, V.P. Seigoin, D.S. Correa, Ternary nanocomposites based on cellulose nanowhiskers, silver nanoparticles and electrochromic nanofibers: use in an electronic tongue for heavy metal detection, *Sens. Actuators B Chem.* 2901 (2019) 387–395, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.05.125>.
- [19] T. Amorim da Silva, M.L. Rungger, M.A. Neis Gostinho, L. Rios do Amaral, V. Rodrigues, A. Rini Jr., 3D-printed graphene electrodes applied in an impedimetric electronic tongue for soil analysis, *Chemosens* 7 (4) (2019) 50, <https://doi.org/10.3390/chemosensors7040050>.
- [20] L.A. Mesquita, V.P. Seigoin, A. Pavinatto, R.C. Sanfiesse, L.H.C. Mattoso, D. S. Correa, Electronic tongue based on nanostructured hybrid films of gold nanoparticles and phthalocyanines for milk analysis, *J. Nanomater.* 16 (2015) 402, <https://doi.org/10.1155/2015/890402>.
- [21] T. Wasilewski, W. Kamyn, J. Gebicki, Bioelectronic tongue: current status and perspectives, *Biosens. Bioelectron.* 150 (2020), 111923, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111923>.
- [22] P. Skladal, Smart bio-electronic tongues for food and drinks control, *Taste-Trend Anal. Chem.* 127 (2020), 115887, <https://doi.org/10.1016/j.tam.2020.115887>.
- [23] C. Medina-Piña, G. Revilla, R. Muñoz, J.A. Fernández-Escobedo, E. Barajas, G. Medrano, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Electronic tongue formed by sensors and bioelectronic containing phthalocyanines as electron mediators: application to the analysis of red grapes, *J. Porphy. Phthalocyanines* 18 (2014) 74–86, <https://doi.org/10.1142/S1088424613501137>.
- [24] X. Ceto, H.H. Vedeckis, B. Pisto-Simón, Bioelectronic tongues: new trends and applications in water and food analysis, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 668–676, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.075>.
- [25] C. García-Cabezo, C.G. Telesina, L. Das, C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, M.L. Rodríguez-Méndez, F. Martín-Pedroza, Analysis of phenolic content in grape seeds and skins by means of a bio-electronic tongue, *Sensors* 20 (15) (2020) 4176, <https://doi.org/10.3390/s20154176>.
- [26] D. Hu, Q. Sun, K. Su, H. Wan, H. Li, R. Xu, F. Sun, L. Zhuang, H. Hu, P. Wang, Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors, *Sens. Actuators B Chem.* 297 (2019) 1136–1146, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.09.077>.
- [27] C. García-Hernández, C. García-Cabezo, F. Martín-Pedroza, M.L. Rodríguez-Méndez, Analysis of musts and wines by means of a bio-electronic tongue based on tyrosinase and glucose oxidase using polypyrrole/gold nanoparticles as the electron mediator, *Food Chem.* 289 (2019) 751–756, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.107>.
- [28] S. Palanisamy, C. Karapınar, S.M. Chen, Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite modified electrode, *Goloid Surf. B* 114 (2014) 164–169, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.006>.
- [29] C. García-Cabezo, G. Gobbi, L. Dai, C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, M.L. Rodríguez-Méndez, F. Martín-Pedroza, Analysis of phenolic content in grape seeds and skin by means of a bio-electronic tongue using electrochemical modified biosensors with phthalocyanines, NiO nanoparticles and tyrosinase, *Sensors* 20 (15) (2020) 4176, <https://doi.org/10.3390/s20154176>.
- [30] C. García-Hernández, C. García-Cabezo, F. Martín-Pedroza, J.A. de Saja, M. L. Rodríguez-Méndez, Analysis of musts and wines with a bio-electronic tongue based on tyrosinase and glucose oxidase using a polypyrrole/gold nanoparticle composite as electron mediator, *Food Chem.* 756 (2019), 289751, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.107>.
- [31] J.A. Ollason, M. Johansson, H. Hansson, A. Abrahamsson, L. Hyberg, A. Smidman, H. Lindmark-Månsson, Å. Lendh, Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products, *Int. Dairy J.* 73 (2017) 151–154, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.06.004>.
- [32] P. Kanyong, E.D. Krumpa, Y. Anilweh, G.A. Awandare, Enzyme-based amperometric galactose biosensors: a review, *Microchim. Acta* 184 (10) (2019) 3663–3671, <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2405-z>.
- [33] D. Mangani, B.V. McGeary, H. Gillman, C. Corning, R. Ivory, V.A. McKie, E. Delaney, T. Kargelis, A novel enzymatic method for the measurement of lactose in lactose-free products, *J. Sci. Food Agric.* 99 (2018) 947–956, <https://doi.org/10.1002/jsf.9317>.
- [34] B. Çakıroğlu, Y.C. Demirci, E. Güllüoğlu, M. Özcan, A photoelectrochemical glucose and lactose biosensor consisting of gold nanoparticles, MnO₂ and g-C₃H₄ decorated TiO₂, *Sens. Actuators B Chem.* 282 (2018) 283–289, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.064>.
- [35] B.H. Nguyen, B.T. Nguyen, H.V. Vu, C.V. Nguyen, D.T. Nguyen, L.T. Nguyen, T. T. Vu, L.D. Tran, Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminonaphthalene) film, *Curr. Appl. Phys.* 16 (2) (2016) 135–140, <https://doi.org/10.1016/j.cap.2015.11.004>.
- [36] G. Maduraiveeran, W. Jin, Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications, *Trends Environ. Anal. Chem.* 13 (2017) 10–23, <https://doi.org/10.1016/j.teac.2017.02.001>.
- [37] X. Lao, A. Morrin, A.J. Kilard, M.R. Smyth, Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors, *Electroanal. Chem.* 18 (4) (2006) 319–326, <https://doi.org/10.1002/elan.200502415>.
- [38] A.S. Basal, A. Mirali, E. Binnaz, B. Tayebi, A review on glucose and hydrogen peroxide biosensor based on modified electrode included silver nanoparticles, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 3671–3683.
- [39] S. Sandeep, A.S. Santhosh, H. Kumar Swamy, G.S. Surendra, J.S. Melo, Detection of catechol using a biosensor based on biotinylated silver nanoparticles and polyphenol oxidase enzymes, *Funct. Electrochim. Acta* 37 (4) (2019) 257–270, <https://doi.org/10.4152/fea.201904257>.
- [40] Q. Zhao, M. Zhao, J. Qin, W. Lai, H. Peng, W. Huang, One dimensional silver based nanomaterials: preparations and electrochemical applications, *Sensors* 13 (36) (2017), 170191, <https://doi.org/10.3390/s1307170191>.
- [41] C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedroza, C. García-Cabezo, M.L. Rodríguez-Méndez, Silver nanowires as electron transfer mediators in electrochemical catechol biosensors, *Sensors* 21 (2021) 899, <https://doi.org/10.3390/s21030899>.
- [42] L. Wang, X. Gao, L. Jin, Q. Wu, Z. Chen, X. Liu, Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase, *Sens. Actuators B-Chem.* 176 (2013) 9–14, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.077>.
- [43] S. Kumar-Rishwan, S. Chakravarthy, A. Hernández-Rangel, E. Prokhorov, G. Lann-Büccieri, R. Esparza, M. Meyyappan, Chitosan supported silver nanowires as a platform for direct electrochemistry and highly sensitive electrochemical glucose biosensor, *RSC Adv.* 6 (2016) 20102–20108, <https://doi.org/10.1039/C5RA24298E>.
- [44] X. Yang, J. Bai, Y. Wang, X. Jiang, X. He, Hydrogen peroxide and glucose biosensor based on silver nanowires synthesized by polyol process, *Analyst* 137 (2012) 4362–4367, <https://doi.org/10.1039/C2AN35467A>.
- [45] L. Xu, Y. Hou, M. Zhang, G. Jenkins, W. Huang, C. Yao, A novel electrochemical biosensor for detection of cholesterol, *Russ. J. Electrochem.* 52 (2016) 239–244, <https://doi.org/10.1134/S1023193516030101>.
- [46] ISO/TC 34/SC 5 Milk And Milk Products, 2021. International Organization For Standardization, <https://www.iso.org/committees/47678.html>, 2021 (Accessed 23 June 2021).
- [47] J.A. Creighton, C.G. Hatchford, M.G. Albrecht, Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold so particles of size comparable to the excitation wavelength, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* (2) (1979) 790–798, <https://doi.org/10.1039/F29797200790>.
- [48] C. Medina-Piña, C. García-Hernández, J.A. De Saja, J.A. Fernández-Escobedo, E. Barajas, G. Medrano, C. García-Cabezo, F. Martín-Pedroza, M.L. Rodríguez-Méndez, The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes, *IAT Food Sci. Technol.* 62 (2) (2015) 940–947, <https://doi.org/10.1016/j.iat.2015.02.025>.
- [49] C. Medina-Piña, J.A. de Saja, J.A. Fernández-Escobedo, E. Barajas, G. Medrano, M. L. Rodríguez-Méndez, Array of biosensors for discrimination of grapes according to grape variety, vintage and ripeness, *Anal. Chim. Acta* 947 (2016) 16–22, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.032>.
- [50] X. Zhang, D. Liu, L. Li, T. You, Direct electrochemistry of glucose oxidase on novel free standing nitrogen-doped carbon nanospheres/graphene nanofibers composite film, *Sci. Rep.* 5 (2015) 9885, <https://doi.org/10.1038/srep09885>.
- [51] G. Bharath, Rajesh Madha, Shen-Ming Chen, Vellayappan Veeramani, A. Balasubramaniam, D. Manjagan, C. Viswanathan, M. Ponpandian, Enzymatic electrochemical glucose biosensors by mesoporous 1D hydroxyapatite-on-2D reduced graphene oxide, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 1360–1370, <https://doi.org/10.1039/C4TB01651G>.
- [52] J. Xie, C. Chen, Y. Zhou, J. Pei, Y. Ding, J. Zhao, A galactose oxidase biosensor based on graphene composite film for the determination of galactose and dihydroxyacetone, *Electroanal. Chem.* 28 (1) (2016) 183–188, <https://doi.org/10.1002/elan.201500486>.
- [53] S. Shrivastava, J. Khat, A. Christenson, T. Ruzgan, A.I. Yaropolov, J.W. Whittaker, L. Gorton, Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 20 (12) (2005) 2517–2524, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.003>.
- [54] H. Fontou, A. Zanoni, M. Brückel, R. Jańczak-Bemant, An enzyme biosensor based on beta-galactosidase inhibition for electrochemical detection of cadmium (II) and chromium (VI), *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 96 (9) (2016) 1–14, <https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1209659>.
- [55] J. Winkelman, *Diffusion in Gases, Liquids and Electrolytes*, First Ed., Springer, Berlin, 2018 <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54089-3>.
- [56] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusion-controlled electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 101 (1) (1979) 19–28, [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(79\)80075-3](https://doi.org/10.1016/0022-0728(79)80075-3).



C. Salvo-Comino et al.

Sensors and Actuators B: Chemical 364 (2022) 131877

- [57] M. Shariif, M.J. Sobrah, S.H. Hossaini, P.H. Rani, A.J. Talari, A. Hasan, M. Palabatt, Enzyme immobilization onto the nanoceramics: application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy, *Int. J. Biol. Macromol.* 143 (2020) 665–676, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.064>.
- [58] L. Chen, H. Xie, J. Li, Electrochemical glucose biosensor based on silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes modified electrode, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 3323–3329, <https://doi.org/10.1007/s10000-012-1773-9>.
- [59] P.H. La Phan, Q.T. Tran, D.A. Dinh, K.K. Bok, C.H. Hong, T.V. Cuong, The facile synthesis of novel ZnO nanostructure for galactose biosensor application, *J. Nanomat.* 2019 (2019) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2019/2364327>.
- [60] M. Sharma, P. Yadav, M. Sharma, Novel electrochemical sensing of galactose using GalOx/TPs/CHI modified pencil graphite electrode, *Carbohydr. Res.* 483 (2019), 107749, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107749>.
- [61] P. Yang, L. Wang, Q. Wu, Z. Chen, X. Lin, A method for determination of glucose by an amperometric biosensor based on silver nanotubes modified Au electrode, *Sens. Actuators B Chem.* 194 (2014) (2014) 71–78, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.074>.
- [62] A.R. De Brito, R.S. de Jesus, I.M. de C. Tavares, F.H. Silva, H.B. Santana, S. P. Barbosa Ferrão, M. Franco, Application of the electrochemical biosensor in the detection of lactose in skimmed milk, *Surf. Interfaces* 22 (2021), 100839, <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2020.100839>.
- [63] L. Moser, M.L. Merlodi, Die Kinetik der Invertierung, *Biochem. Z.* 40 (1913) 323–369.
- [64] H. Löwenweber, D. Bark, The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 650–666, <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>.
- [65] V. Vapnik, *The Nature of Statistical Learning Theory*, Second Ed., Springer-Verlag, New York, 1999 <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3264-1>.

Coral Salvo-Comino obtained the Ms in Analytical Chemistry in 2015 (U. Complutense, Madrid, Spain). She is currently working on her PhD Thesis which is dedicated to the

development of electrochemical sensors for the analysis of foods. She is author of 13 scientific papers.

Patricia Martín-Bartolome has a degree in engineering (2021 U. Valladolid, Spain). She is currently working on her Master Thesis which is dedicated to the development of electrochemical sensors for the analysis of milk.

Jose Luis Pura obtained the PhD in Physics in 2019 (U. Valladolid, Spain). As a postdoc he is currently working in the study of electrochemical surfaces by APD. He is author of 20 scientific papers.

Clara Pérez-González obtained the Ms in Biochemistry in 2019 (U. Valladolid, Spain). She is currently working on her PhD Thesis which is dedicated to the development of electrochemical sensors for the analysis of foods. She is author of 3 scientific papers.

Fernando Martín Pedrosa is full professor at the University of Valladolid and Head of the Department of Materials Science. His research is dedicated to electrochemistry studies of different solid materials. He is author of more than 80 papers.

Cristina García Caceron, is assistant professor of the Engineers school of the University of Valladolid. She is an expert in electrochemistry and impedance spectroscopy. She is author or coauthor of more than 50 papers in the field.

María Luz Rodríguez-Mendez is Full professor of Inorganic Chemistry at the Engineers School of the University of Valladolid and Head of the group of sensors UVASens. She is leading several funded Projects devoted to the development of arrays of voltammetric nanostructured sensors and biosensors for the characterization of foods. She is author or co-author of over 165 publications (H index: 44), seven books and three patents in the field.