



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN FÍSICA

TESIS DOCTORAL:

Electrochemical sensors and biosensors: new horizons and challenges in their integration in multisensor systems for food industry applications

Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores para su aplicación en la industria alimentaria

Presentada por Coral Salvo Comino para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Prof. Dra. María Luz Rodríguez Méndez

Prof. Dra. Ana Cristina García Cabezón

.....

Agradecimientos

Cuando comencé a escribir, cuando me enfrenté a una hoja en blanco que tenía que rellenar con toda mi trayectoria como investigadora, cuando me llené de agobios e inseguridades, me propuse como recompensa escribir estas páginas una vez redactada mi humilde aportación a la ciencia...Y llegó el ansiado momento, agradecer a todas las personas que han contribuido a mi formación y a los que han ido quitando piedras de mi travesía. Y finalmente, de dedicar mi trabajo, dedicar esta parte de mi vida, que para mí ha sido tan importante.

Tengo que comenzar agradeciendo a mis directoras, las Profesoras María Luz Rodríguez Méndez y Cristina García Cabezón por abrirme las puertas como a una más desde el primer día, por todo lo que me han enseñado y por dejarme volar cada vez más alto. También les agradezco su cercanía y sobre todo su paciencia. De la misma manera, quiero agradecer a todas y cada una de las personas que forman o han formado parte del grupo UVaSens. Uno de los peores inconvenientes que tiene trabajar en un grupo de investigación de estas características, es que el personal no suele ser permanente y por ello la gente va y viene constantemente. Lo bueno, que suele ser gente maravillosa. Y lo más bueno aún, que gracias a este grupo ahora forman parte de mi vida. A todos vosotros, gracias, gracias y gracias. Gracias por haberme acompañado durante este camino, haberme enseñado, haberme escuchado, haber reído conmigo (y también llorado), haber confiado en mí, haberme hecho brillar en ocasiones en las que no encontraba mi luz, pero, sobre todo, gracias por haber hecho de una relación laboral, relaciones de amistad de las que algunas serán eternas. Así mismo, agradecer a todas las personas que hayan contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral en cualquiera de sus etapas. Desde los que me han traído dulces para amenizar mis tardes hasta los que se han peleado con los resultados, o los que han dedicado tanto tiempo a enseñarme a entender los equipos o incluso a ordenar bibliografías.

A la Profesora Nicole Jaffrezic-Renault y todo su grupo de investigación. Personas magníficas que me acogieron como a una más desde el primer momento en que llegué a Francia para realizar mi estancia pre-doctoral.

Cuando me propusieron la idea de comenzar una Tesis Doctoral, lo vi inviable, no creía en mí, era un mundo demasiado complicado para el que yo no tenía llave. Sin embargo, mis directores, tutores y muchos de los integrantes del grupo en el que realicé mi Trabajo de Fin de Máster me cosieron unas hermosas alas para volar, y hoy es el

momento de devolvérselas en forma de agradecimiento, porque si no me hubieran ayudado en todos los sentidos, no estaría aquí. Por ello a mis queridas Profesoras Paloma Yáñez-Sedeño Orive, Araceli González Cortés y Susana Campuzano Ruiz y mi querido Profesor José Manuel Pingarrón Carrazón, así como al resto de compañeros, les mando unas gracias infinitas por haberme apoyado.

Así mismo, agradezco a todas las entidades financieras que han hecho posible que pueda formarme con todo lujo de instrumentos, equipos y materiales, así como permitiéndome la asistencia a cursos, congresos y cualquier actividad formativa que ha sido imprescindible para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Hoy vuelvo la vista unos años atrás, y la nostalgia me hace esbozar una sonrisa. He pasado momentos muy bonitos durante estos años, momentos nutritivos de alma y mente. La vida me ha regalado la oportunidad de crecer en tantos aspectos de la vida que me siento inmensamente afortunada, pero...el sentido real, la razón que me ha permitido sentirme así, sois vosotros, aquellos que hoy sois felices por mí, aquellos que estáis leyendo estas palabras tan moñas (porque ya sabéis que lo soy) para ver si tenéis un hueco en mi “hijo de papel”. Y claro, claro que le tenéis, pero me vais a permitir que no dé nombres, y el motivo es sencillo. Tú, que hoy estás sintiendo un hormigueo en la tripa porque sabes que yo estoy “atacaita”, tú, tienes tu hueco aquí ...y en mi corazón. Gracias a todos los que me habéis dado un pedacito vuestro para que yo me construya.

Finalmente escribo a mi familia, y aquí sí voy especificar:

MAMÁ Y PAPÁ GRACIAS. Gracias y perdón. Decir que sois mis referentes no es suficiente. Durante estos años, durante toda mi vida, habéis sido vosotros los que pegabais los trocitos de mi alma cada vez que se rompía, habéis sido vosotros mi refugio en momentos de vulnerabilidad. Pero también habéis sido mi escuela y mi universidad, me habéis mostrado valores tan necesarios en este mundo... El agradecimiento que le hago a la vida es tan inmenso por haberme regalado unos padres tan especiales como vosotros que no existen Tesis, ni trabajos suficientes para poder expresarlo. Y perdón, perdón por no haber estado a la altura en tantas ocasiones que los nervios no me dejan pensar con claridad y habéis sido vosotros mi blanco, y con los brazos abiertos habéis recibido mis tiros de desesperación, para después, acogerme en vuestro regazo como si nada. Os quiero tanto que duele.

A Dani, por dejar una vida para comenzar otra conmigo cuando le dije que empezaría a trabajar en Valladolid. Por todo lo que hemos vivido estos años, lo bueno y lo malo. Pero, sobre todo, por el regalo más grande que has podido darme, nuestra niña. Gracias por todo este tiempo y lo que hemos aprendido juntos. Te quiero infinitamente.

Y finalmente, me gustaría dedicar unas palabras a mi hija:

Lucía, a ti te agradezco haber llegado a nuestras vidas en un momento en el que el mundo se paró. Todos nuestros planes se descolocaron cuando llegó la pandemia, todos sentíamos tanto temor...pero fuiste tú la que nos trajo tanta fuerza y tanta paz. Tú eres la última pieza que cierra esta Tesis. Hija quiero dedicarte todo el esfuerzo que aquí se refleja, y con ello quiero decirte que en la vida te tropezarás con circunstancias que te llevarán al límite y que te harán dudar de todo, pero por favor cariño mío, nunca dudes de ti misma y de tu luz. No hay nada más poderoso que el esfuerzo, el esfuerzo combinado con la confianza en ti misma, harán de ti una persona excepcional. Y... recuerda hija mía, yo estaré aquí y te impulsaré a volar, pero cuando tengas dudas, no olvides que, en mí, siempre tendrás tu hogar. Te quiero hija mía, como nunca imaginé que se podía querer.

*A mi hija,
Por iluminar mi mundo*

Cuando el mundo parecía dormido.

Cuando el miedo se apoderó de mí.

Cuando todo parecía perdido,

comenzaste a latir

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|------------------------------------|------|
| Listado de abreviaturas..... | III |
| Listado de tablas y figuras..... | VII |
| Resumen/Summary..... | VIII |
| Contexto de la Tesis Doctoral..... | XII |

Capítulo 1: Justificación y objetivos

| | |
|-------------------------|---|
| 1.1. Justificación..... | 2 |
| 1.2. Objetivos..... | 5 |

Capítulo 2: Estado Del Arte

| | |
|--|----|
| 2.1. Sensores y biosensores electroquímicos..... | 10 |
| 2.1.1. Métodos de detección electroquímica | 10 |
| 2.1.2. Materiales y nanomateriales sensibles. Detección electroquímica..... | 15 |
| 2.1.3. Enzimas. Elementos de biorreconocimiento..... | 19 |
| 2.1.4. Preparación de sensores y biosensores. Modificación de la superficie..... | 21 |
| 2.2. Sensores en la Industria Alimentaria..... | 28 |
| 2.2.1. Sensores y biosensores para la detección de compuestos fenólicos..... | 28 |
| 2.2.2. Sensores y biosensores para la detección de carbohidratos..... | 35 |
| 2.3. Sistemas multisensores. Lenguas electrónicas | 43 |
| 2.3.1. Lenguas electrónicas en la industria vitivinícola..... | 46 |
| 2.3.2. Lenguas electrónicas en la industria láctea..... | 49 |

Capítulo 3: Resultados

| | |
|---|----|
| 3.1. Biosensores electroquímicos basados en LbL. Efectos sinérgicos..... | 54 |
| 3.1.1. Artículo 1. Promoting laccase sensing activity for catechol detection using LbL assemblies of chitosan/ionic liquid/ phthalocyanine as immobilization surfaces..... | 58 |
| 3.1.2. Artículo 2. Biosensors Platform Based on Chitosan/AuNPs/Phthalocyanine Composite Films for the Electrochemical Detection of Catechol. The Role of the Surface Structure..... | 59 |
| 3.1.3. Artículo 3. Discrimination of milks with a Multisensor system based on Layer-by-Layer films..... | 60 |



3.2. Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales de plata. Influencia de la relación de aspecto.....61

3.2.1. Artículo 4. Silver nanowires as electron transfer mediators in electrochemical catechol biosensors.....64

3.2.2. Artículo 5. Improving the performance of a bioelectronic tongue using silver nanowires. Application to milk analysis.....65

3.3. Sensores electroquímicos basados en MIP.....66

3.3.1. Artículo 6. Voltammetric sensor based on electrodeposited molecularly imprinted chitosan film on BDD electrodes for catechol detection in buffer and in wine samples.....70

3.3.2. Artículo 7. Voltammetric sensor based on molecularly imprinted chitosan-carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles nanocomposite deposited on Boron Doped Diamond electrodes for catechol detection.....71

Capítulo 4: Conclusiones y Perspectivas Futuras

4.1. Conclusiones/Conclusions74

4.2. Perspectivas futuras/future perspectives.....82

Capítulo 5: Bibliografía

5.1. Bibliografía.....86

Capítulo 6: Anexos

Publicaciones, congresos, cursos, participación en proyectos, estancia pre-doctoral, becas e informes previos a la defensa de Tesis.....108

Listado de abreviaturas

[BMIM] [BF4]: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio

[VO(acac)₂]: complejo de bis(acetilacetato)oxovanadio (IV)

AAc: ácido poliacrílico

AFM: microscopía de fuerza atómica

AgNPs: nanopartículas de plata

AgNWs: nanohilos de plata

ANN: redes neuronales artificiales

Au: oro

AuNPs: nanopartículas de oro

AuNWs: nanohilos de oro

B(OH)₂: hidróxido de bario

BDD: diamante dopado con boro

bioLE: lengua bioelectrónica

Ca²⁺: ion calcio

CB: carbono

Chi: quitosano

CNTs: nanotubos de carbono

CPE: electrodo de pasta de carbono

Cu⁺: ion cuproso

Cu²⁺: ion cúprico

CuNPs: nanopartículas de cobre

CuPcs: ftalocianina de cobre sulfonada

CV: voltamperometría cíclica

CDV: deposición física en fase vapor

DET: transferencia electrónica directa

DPV: voltamperometría diferencial de pulsos

DRX: difracción de rayos X

Ecoli: escherichia coli

ENFETs: transistores de efecto de campo enzimático

ESM: membrana de cáscara de huevo

FAD: dinucleotido flavina y adenina

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido reducido

FTIR: espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier

GA: algoritmos genéticos



GaOx: galactosa oxidasa
g-C₃N₄: nitruro de carbono grafítico
GCE: electrodo de carbono vítreo
GNPI: nanopaletas de grafeno
GOx: glucosa oxidasa
GPDDA: poli(cloruro de dialildimetilamonio)
GPSS: poli(sulfonato de estireno)
H₂O₂: agua oxigenada
HPLC: cromatografía líquida de gases
IDE: microelectrodos interdigitados
IL: líquido iónico
ISE: electrodo selectivo de iones
ISFETs: transistores de efecto de campo sensibles a iones
ITO: óxido de estaño e indio
IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
Lac: lacasa
LB: Langmuir-Blodgett
LbL: Layer by Layer
LDA: análisis discriminante lineal
LE: lengua electrónica
LOD: límite de detección
LOx: lactato oxidasa
Mg²⁺: ion magnesio
MIP: polímeros de impresión molecular
MLR: regresión múltiple lineal
MnO₂: óxido de manganeso (IV)
MnO₄⁻: ion permanganato
MOSFETs: transistor de efecto de campo metal-óxido-semiconductor
MPcs: metalofalocianinas
MWCNTs: nanotubos de carbono de pared doble
MXene: materiales basados en metal de transición carbonados y nitrados
Na²⁺: ion sodio
NH⁴⁺: ion amonio
Ni(OH)₂: hidróxido de níquel
NIP: polímero molecular no impreso

NIR: espectroscopía de infrarrojo cercano

NPs: nanopartículas

NWs: nanohilos

P3HT: poli(3-hexil-tiofeno)

PANI: polianilina

PATP: 4-(piridina-4'-amido)tiofenol

PCA: análisis de componentes principales

PCR: regresión de componentes principales

Pcs: ftalocianinas

PEI: polietilenimina

PFLA: poli[9,9-di-(2-etilhexil)-fluorenil-2,7-diilo]- extremo capado con N,N-bis(4-metilfenil)-4-anilina

PFLO: poli(9,9-di-(2-etilhexil)-fluorenil-2,7-diil)-extremo capado con 2,5-difenil-1,2,4-oxadiazol

PLM: poli-L-metionina

PLS: regresión de mínimos cuadrados parciales

PMA: polimaléico anhídrido

Pt: platino

PtNPs: nanopartículas de platino

PVD: deposición química en fase vapor

QCM: microbalanza de cuarzo

rG: grafeno

rGO: óxido de grafeno reducido

SA: ácido esteárico

SAMs: monocapas autoensambladas

SEM: microscopía electrónica de barrido

SIMCA: modelado independiente suave de analogía de clases

SnO₂: dióxido de estaño

SO₂: dióxido de azufre

SPE: electrodos de carbón serigrafiados

SVMR: regresión de máquinas de vectores de soporte

SWCNTs: nanotubos de carbono de pared sencilla

SWV: voltamperometría de onda cuadrada

THI: índice de temperatura y humedad

TiO₂: óxido de titanio

TPI: índice de polifenoles totales



Tyr: tirosinasa

UHT: tratamiento a altas temperaturas

UV-vis: espectroscopía ultravioleta visible

ZnPc: ftalocianina de zinc

β -gal: β -galactosidasa

Listado de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1: Sensores y biosensores electroquímicos basados en la detección de fenoles en distintas variedades de vino blanco y/o tinto.....35

Tabla 2: Sensores y biosensores electroquímicos basados en la detección de carbohidratos en distintas variedades de leche.....42

Figuras

Figura 1: Representación esquemática del método de desarrollo de diferentes técnicas de recubrimiento de sensores.....21

Figura 2: Representación esquemática de diferentes métodos de deposición directa de materiales sobre la superficie de electrodos.....24

Figura 3: Representación esquemática de diferentes métodos de deposición de películas ultra-finas y nanoestructuradas sobre la superficie de electrodos.....27

Figura 4. Representación esquemática de una lengua electrónica.....43



Resumen

La presente Tesis doctoral, plantea el desarrollo de sensores y biosensores para el análisis de alimentos, empleando diferentes materiales y nanomateriales sensibles. Se trata de sensores y biosensores electroquímicos que permiten detectar compuestos de interés en alimentos líquidos tales como leches o vinos. Los sensores se han diseñado empleando diferentes materiales sensibles y tecnologías relacionadas con la Nanociencia, con el propósito de mejorar parámetros analíticos como son: selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y repetitividad. Los sensores y biosensores se han utilizado para desarrollar redes de sensores que forman lenguas electrónicas y bioelectrónicas. La preparación y caracterización de los sensores y biosensores desarrollados, así como sus respuestas electroquímicas y su funcionamiento como parte de lenguas electrónicas, se discuten mediante los artículos científicos, indexados en revistas internacionales, incluidos en esta Tesis Doctoral. Estos trabajos se presentan agrupados en tres bloques, cada uno de ellos con una temática común:

En el primer bloque se aborda en profundidad el desarrollo de biosensores electroquímicos voltamétricos basados en películas nanoestructuradas preparadas mediante la técnica Layer by Layer, utilizando distintas combinaciones de materiales (polímeros conductores, líquidos iónicos, nanopartículas metálicas, ftalocianinas y enzimas). El objetivo es seleccionar las nanoestructuras con mejor respuesta electroquímica en función de la composición de las películas, para la detección de compuestos de interés en la industria alimentaria. A partir de las plataformas seleccionadas, se ha desarrollado una lengua bioelectrónica capaz de clasificar y discriminar entre distintas variedades de leche de vaca con diferentes características.

El segundo bloque de trabajos, tratan el desarrollo de biosensores voltamétricos basados en combinaciones de nanomateriales de plata (nanopartículas y nanohilos) con enzimas específicas para compuestos presentes en vino (tirosinasa) o leche (glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y β -galactosidasa). En estos trabajos se describe la preparación de los sensores y se analiza la influencia de la relación de aspecto de las nanoestructuras de plata en la capacidad de los nanomateriales como mediadores electrónicos, así como en los mecanismos de detección electroquímica. En algunos casos se han observado mecanismos de transferencia electrónica directa, lo que demuestra el gran potencial de esta tecnología. Finalmente, se ha realizado un estudio comparativo de las lenguas bioelectrónicas generadas a partir de ambas nanoestructuras evaluando la capacidad de discriminación y clasificación de leches con diferentes características nutricionales. Se han alcanzado excelentes correlaciones entre los datos obtenidos con las lenguas bioelectrónicas desarrolladas y parámetros químicos utilizados habitualmente en el control de calidad de leches

El tercer bloque de esta Tesis Doctoral, pone de manifiesto la capacidad de sensores no enzimáticos para alcanzar especificidad frente a determinados compuestos fenólicos gracias a la aplicación de la técnica de polímeros de impresión molecular (MIPs). Los MIPs desarrollados se obtienen mediante la electrodeposición de un biopolímero natural, el quitosano, así como en combinaciones de quitosano y nanotubos de carbono decorados con nanopartículas, con los que se ha desarrollado una plataforma específica capaz de detectar determinados fenoles en vino en presencia interferentes.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, han permitido desarrollar sensores avanzados que, una vez combinados en forma de redes de sensores, suponen un avance en el campo de las lenguas electrónicas y bioelectrónicas dedicadas al análisis de alimentos.



Summary

This Doctoral Thesis proposes the development of sensors and biosensors for food analysis, using different sensitive materials and nanomaterials. These are electrochemical sensors and biosensors that allow the detection of compounds of interest in liquid systems such as wines or milk. The sensors have been designed using different sensitive materials and technologies related to Nanoscience, with the purpose of improving analytical parameters such as selectivity, sensitivity, reproducibility and repeatability. Sensors and biosensors have been used to develop sensor arrays that form electronic and bioelectronic tongues. The preparation and characterization of the developed sensors and biosensors, as well as their electrochemical responses and their functioning as part of electronic tongues, are discussed through the scientific articles, indexed in international journals, included in this Doctoral Thesis. These works are presented grouped into three sections, each with a common topic:

The first section deals in depth with the development of voltammetric electrochemical biosensors based on nanostructured films prepared using the Layer by Layer technique, with different combinations of materials (conductive polymers, ionic liquids, metallic nanoparticles, phthalocyanines and enzymes). The objective is to select the nanostructures with the best electrochemical response based on the composition of the films, for the detection of compounds of interest in the food industry. From the selected platforms, a bioelectronic tongue capable of classifying and discriminating between different varieties of cow's milk with different characteristics has been developed.

The second section deals with the development of voltammetric biosensors based on combinations of silver nanomaterials (nanoparticles and nanowires) with specific enzymes for compounds present in wine (tyrosinase) or milk (glucose oxidase, galactose oxidase and β -galactosidase). In these works, the preparation of the sensors is described and the influence of the aspect ratio of silver nanostructures on the ability of nanomaterials as electronic mediators, as well as on electrochemical detection mechanisms, is analyzed. In some cases, direct electronic transfer mechanisms have been observed, which demonstrates the great potential of this technology. Finally, a comparative study of the bioelectronic tongues generated from both nanostructures has been carried out, evaluating the discrimination and classification capacity of milks with different nutritional characteristics. Excellent correlations have been achieved between the data obtained with the bioelectronic tongues developed and chemical parameters commonly used in milk quality control.

The third section of this Doctoral Thesis highlights the ability of non-enzymatic sensors to achieve specificity against certain phenolic compounds thanks to the application of the molecular imprinted polymers (MIPs) technique. The developed MIPs are obtained by electrodeposition of a natural biopolymer, chitosan, as well as in combinations of chitosan and carbon nanotubes decorated with nanoparticles, with which a specific platform capable of detecting certain interfering phenols in wine has been developed.



The results obtained in this Doctoral Thesis have allowed the development of advanced sensors that, once combined in the form of sensor arrays, represent an advance in the field of electronic and bioelectronic tongues dedicated to food analysis.



Contexto de la Tesis Doctoral

La presente Tesis Doctoral titulada “Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores para su aplicación en la industria alimentaria” se ha escrito como un compendio de publicaciones, y por ello los resultados obtenidos se presentan recogidos en siete artículos científicos publicados en revistas internacionales indexadas en JCR. Asimismo, esta Tesis cumple con los requisitos necesarios para ser acreditada con **Mención Internacional**, dado que parte del trabajo se ha realizado en el Instituto de Ciencias Analíticas, en Lyon (Francia), bajo la supervisión de la Prof. Nicole Jaffrezic-Renault.

La parte fundamental de esta Tesis, se ha realizado en el grupo UVaSens de la Universidad de Valladolid, supervisada por la Prof. María Luz Rodríguez Méndez y la Prof. Ana Cristina García Cabezón. El grupo en el que se ha desarrollado la Tesis, trabaja en una línea de investigación básica, enfocada al desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos nanoestructurados, y en una línea de investigación aplicada, en la que se combinan los sensores desarrollados para fabricar lenguas electrónicas (LEs) empleadas en la caracterización de alimentos y bebidas. Estos trabajos se realizan en colaboración con organismos y empresas, que proporcionan las muestras que se han analizado en este trabajo. Cabe destacar la colaboración con la Estación Enológica de Castilla y León, que ha proporcionado las muestras de vino y la empresa Calidad Pascual, que ha suministrado las muestras de leche.

La motivación central de esta Tesis es la integración de nuevos materiales y nanomateriales en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos. La idea central es combinar materiales y nanomateriales utilizando distintas técnicas, con el fin de desarrollar novedosas membranas y películas sensibles, con propiedades sensibles mejoradas. La incorporación de enzimas específicas frente a azúcares, fenoles u otros compuestos presentes en leches y vinos, ha de permitir mejorar el desempeño del sensor en términos de selectividad y sensibilidad. Además, estos nuevos sensores y biosensores con mejores prestaciones, pueden incorporarse a redes de sensores para obtener lenguas electrónicas y bioelectrónicas que puedan utilizarse para analizar muestras de interés en las industrias vitivinícola y láctea, fomentando la viabilidad de su integración para aplicaciones de campo en la Industria 4.0.

Mencionar que, como ya se ha indicado, parte de esta investigación se ha realizado en la Universidad de Lyon (Francia) mediante una estancia pre-doctoral. Durante dicha estancia, se han desarrollado novedosos sensores basados en la tecnología de impresión molecular, con la que se generan plantillas específicas para ciertos compuestos, lo cual permite reemplazar a biorreceptores que son costosos y frágiles, por polímeros en los que se imprime la huella de las moléculas a detectar.

La estructura que sigue la presente Tesis Doctoral es la siguiente:

Capítulo 1- Justificación y objetivos.

En el que se describe la justificación y motivación de esta Tesis, así como los objetivos perseguidos durante su realización.

Capítulo 2- Estado del arte.

Este capítulo recoge una introducción general a los sensores y biosensores electroquímicos, que pretende dar una amplia visión del tema tratado. Para ello se describen los métodos de detección electroquímica, las diferentes técnicas y métodos de desarrollo de sensores basados en materiales y nanomateriales sensibles, así como el concepto de biosensores enzimáticos. También se presentan algunos trabajos previos destacables en el campo de las lenguas electrónicas.

Capítulo 3- Resultados.

Se presentan los resultados de las investigaciones realizadas y los artículos científicos publicados en revistas indexadas internacionales mediante tres subcapítulos:

-Biosensores electroquímicos basados en LbL. Efectos sinérgicos.

Se presentan tres artículos con una temática común. Se inicia con los objetivos y motivación perseguidas. A continuación, se describen los resultados obtenidos en dos trabajos dedicados al desarrollo de biosensores electroquímicos basados en películas nanoestructuradas preparadas mediante la técnica de Layer by Layer. Estas películas se han obtenido utilizando combinaciones de nanomateriales y enzimas, y se han dedicado a la detección de catecol, un compuesto de interés en la industria alimentaria. En una línea más aplicada, también se presenta un trabajo sobre el desarrollo y puesta a punto de una lengua bioelectrónica (bioLE) a partir de los biosensores nanoestructurados



desarrollados aplicada a la industria láctea. Finalmente se muestran los artículos publicados en revistas indexadas.

-Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales de plata. Influencia de la relación de aspecto.

Se presentan dos artículos en los que se ha desarrollado biosensores enzimáticos voltamétricos basados en diferentes nanoestructuras de plata. Se muestra una breve introducción que describe la motivación y los objetivos planteados. Se indaga sobre la influencia de la relación de aspecto de las nanoestructuras de plata en los mecanismos de detección electroquímica de compuestos de interés en la industria alimentaria mediante el diseño de dos bioLEs que se han utilizado para clasificar, discriminar y predecir parámetros de interés en muestras de leche con diferente contenido nutricional. Finalmente se muestran los artículos publicados en revistas indexadas internacionales.

-Sensores electroquímicos basados en MIP.

Se presentan dos artículos realizados a partir de las investigaciones realizadas durante la estancia internacional. Se detalla la motivación y los objetivos perseguidos en el desarrollo de sensores basados en polímeros de impresión molecular (MIPs) para la detección de compuestos fenólicos. Se resumen los hitos de los artículos desarrollados. Finalmente se muestran los artículos publicados por dos revistas internacionales.

Capítulo 4- Conclusiones y perspectivas futuras.

En este capítulo se recogen las conclusiones a las que se ha llegado tras analizar los resultados experimentales obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral. También se contemplan las aplicaciones y proyecciones futuras de las investigaciones desarrolladas.

Capítulo 5- Bibliografía.

En este capítulo se encuentran las referencias bibliográficas en las que se apoya esta Tesis Doctoral.

Capítulo 6- Anexos.

Se recogen las publicaciones, asistencia a congresos o cursos, participación en proyectos, certificación de estancia pre-doctoral en el extranjero de la autora de la Tesis Doctoral, becas e informes de evaluadores externos.

Capítulo 1

Justificación y objetivos

En este capítulo se presenta la justificación de esta Tesis. Para ello se desarrolla una breve descripción del marco científico e industrial actual en lo relativo a la investigación en el desarrollo y uso de sensores, biosensores basados en nanomateriales, así como de los avances requeridos en el campo de las lenguas electrónicas y su aplicación en la industria de la alimentación, específicamente en la industria láctea y vitivinícola. Finalmente se presentan los objetivos específicos planteados en esta Tesis doctoral.

This chapter presents the justification for this Thesis. To do so, a brief description of the current scientific and industrial framework in terms of research in the development and use of sensors, biosensors based on nanomaterials and electronic tongues and their application in the food industry, specifically in the dairy and wine industry, is presented. Finally, the specific objectives set out in this doctoral Thesis are presented.



1.1. Justificación

La industria alimentaria está en constante renovación con el fin de satisfacer, las cada vez más exigentes demandas de los consumidores, así como la estricta legislación que rige en el sector [1]. Por esta razón esta industria, como muchas otras, se encuentra inmersa en la cuarta revolución industrial, denominada Industria 4.0 o Smart Industry, que se basa en el uso de sistemas inteligentes que permitan controlar todas las etapas del proceso productivo incluyendo materiales, procesos y productos. Es decir, el control desde las materias primas hasta el consumidor final, de forma autónoma e interconectada. Esto requiere combinar sistemas de control (habitualmente sensores) con sistemas de software en red [2,3]. La importancia de estos sistemas, hace necesario investigar y mejorar diversos aspectos, como las unidades sensibles, la trazabilidad de componentes individuales, los sistemas de autoaprendizaje o la interpretación de tecnologías de medición [4]. Estas mejoras son cruciales para obtener mediciones en tiempo real a través de la monitorización remota con dispositivos asequibles y fiables [2,5]. Estos nuevos sistemas mejorados permitirán registrar datos fiables, procesar las señales y localizar la información relevante contenida en grandes cantidades de datos, facilitando así, la clasificación e interpretación de la información. Esto proporcionará una monitorización más eficiente de los sistemas de producción.

El control de los procesos y productos requiere disponer de sensores rápidos, sensibles y reproducibles. En el caso de los sensores físicos (capaces de detectar parámetros como temperatura, presión o posición) existen dispositivos comerciales fiables y con alta reproducibilidad. Sin embargo, en el campo de los sensores químicos, es necesario desarrollar nuevas tecnologías que permitan mejorar la selectividad, la sensibilidad y la vida media de los sensores. El sistema de funcionamiento de los sensores químicos consta de dos componentes principales: un sistema de reconocimiento de analitos, denominado receptor y un transductor físico-químico capaz de procesar y transformar la señal obtenida en una señal eléctrica medible. Debido a que existen diferentes formas de producir señales, existen diferentes tipos de sensores de acuerdo al tipo de transducción que utilizan. Ésta puede ser piezoeléctrica, óptica, térmica, másica, electroquímica, magnética y resistiva entre otras [6].

Este trabajo se centra en el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos voltamétricos para el análisis de líquidos complejos. Su fundamento se basa en la

detección de las reacciones de oxidación/reducción que tienen lugar en la superficie del electrodo a ciertos voltajes. La modificación de la superficie del electrodo permite variar los potenciales a la que ocurren esas reacciones redox, así como amplificar la intensidad de las respuestas. Existen multitud de materiales que pueden usarse como modificadores, siendo especialmente interesantes aquellos que tienen un comportamiento electrocatalítico, es decir, aquellos que facilitan la transferencia electrónica hacia el electrodo, disminuyendo el voltaje al que ocurren las reacciones y aumentando la intensidad de la respuesta [7]. En los biosensores electroquímicos, por su parte, el elemento biológico actúa como receptor, y por tanto se combina la capacidad analítica de la técnica electroquímica con la especificidad del elemento biológico.

Debido a las propiedades que presentan los sensores electroquímicos, tales como la estabilidad, especificidad, precisión, selectividad, repetitividad, bajo coste, posibilidad de miniaturización y portabilidad, entre otras, son dispositivos altamente demandados en controles de calidad en la industria alimentaria [8]. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es desarrollar nuevos sensores y biosensores electroquímicos para la detección de sustancias presentes en alimentos tales como antioxidantes y azúcares, capaces de mejorar los niveles de seguridad y calidad de alimentos y bebidas.

Existen diversas estrategias para mejorar la sensibilidad de los sensores electroquímicos. Por una parte, la inclusión de nanomateriales en la membrana sensible tales como nanotubos de carbono (CNTs), grafeno o nanopartículas metálicas (MNPs) entre otros, abre la posibilidad de mejorar la sensibilidad de los sensores ya que el uso de estos materiales aumenta la relación superficie/volumen de la película sensible [9]. Además, las propiedades electrocatalíticas de los nanomateriales, facilitan los procesos electroquímicos de oxidación/reducción de los compuestos a detectar, lo que implica conseguir un aumento de la sensibilidad, obtener límites de detección más bajos y disminuir los problemas causados por posibles interferencias [9,10].

Un problema recurrente en los sensores químicos es su falta de selectividad. Existen varias estrategias para mejorar la selectividad de los sensores electroquímicos. La primera consiste en el uso de biosensores enzimáticos, que se benefician de la especificidad enzima-sustrato. Así, durante los últimos años, se han realizado numerosos avances en este campo, habiéndose desarrollado una gran cantidad de sensores que utilizan diferentes enzimas que se han aplicado con éxito al análisis de sustancias de interés en la



industria alimentaria [11–16]. Por otra parte, la combinación de enzimas y nanomateriales puede contribuir a la mejora de las especificaciones de estos biosensores electroquímicos, ya que los nanomateriales pueden actuar como matrices de inmovilización eficaces para enzimas, y además, son excelentes mediadores electrónicos, lo que se traduce en una mejora de las características de los biosensores [10,17]. Otra posibilidad de alcanzar cierta especificidad en sensores no enzimáticos es el desarrollo de sensores basados en polímeros de impresión molecular (MIPs). Para ello, mediante técnicas de electropolimerización se generan membranas con cavidades específicas del analito, siendo una técnica adecuada para la detección electroquímica de compuestos de interés en la industria alimentaria como fenoles o azúcares [18,19].

Otra estrategia para solucionar el problema relacionado con la selectividad, es la utilización de sistemas multisensores, denominados lenguas electrónicas (LEs), en las que una red de sensores con especificidad parcial, pero con selectividad cruzada, se combina con un software de reconocimiento de patrones. Estos dispositivos tienen la ventaja de poder analizar líquidos complejos como vinos o leches, reduciendo el coste, el tiempo de medida y el procesado en comparación con los métodos analíticos clásicos. Por esta razón, las LEs basadas en sensores electroquímicos tienen un gran potencial en el control de calidad de la industria alimentaria [20]. Sin embargo, esta tecnología aún no está lo suficientemente madura, y para lograr su implementación en la industria se hace necesario seguir investigando para adquirir nuevos avances. Las redes de sensores basados en nanomateriales y en combinaciones de nanomateriales y enzimas, pueden suponer un importante avance en este campo.

El grupo de investigación UVASens, cuenta con una larga experiencia en el desarrollo de redes de sensores y biosensores electroquímicos. Además, de los aspectos de investigación básica, el grupo siempre tiene en cuenta la aplicación industrial de los sensores desarrollados. En esta investigación, se ha profundizado en estos aspectos, desarrollando nuevos nano/sensores y biosensores cuya composición y estructura está en la interfase entre la nanociencia, la biología y la electroquímica. A tal efecto, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se abordan y combinan dos líneas de investigación complementarias, cuyos objetivos se resumen en el siguiente apartado.

1.2. Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis se centra en la preparación, desarrollo y aplicación de diferentes sensores y biosensores en redes de sensores y biosensores electroquímicos para el análisis de compuestos fenólicos y azúcares en disoluciones patrón, así como en matrices complejas.

Para ello, se siguen dos líneas de investigación, la primera, basada en una investigación básica, que consiste en el desarrollo de nuevos sensores y biosensores modificados con diferentes materiales y nanomateriales sensibles a la detección de moléculas de interés en la industria alimentaria. Para lo cual, se utilizarán distintas combinaciones de materiales y técnicas de preparación, con el fin de obtener sensores y biosensores electroquímicos que mejoren su sensibilidad, estabilidad, reproducibilidad, y repetitividad, para garantizar su capacidad química en el análisis de muestras complejas. La segunda línea, es una investigación aplicada, en la que los sensores y biosensores desarrollados en la fase previa, se han utilizado para formar redes de sensores, que se han combinado con técnicas quimiométricas para obtener diferentes lenguas bioelectrónicas (bioLEs) dedicadas al análisis de distintas bebidas, en concreto vino y leche, dos de los alimentos claves en la economía de Castilla y León.

Para llevar a cabo esta investigación, se realizará un amplio estudio de las propiedades electrocatalíticas que ofrecen los diferentes materiales y nanomateriales seleccionados, así como las posibles sinergias obtenidas tras su combinación, para lo cual se utilizarán y compararán diferentes técnicas basadas en el desarrollo de películas delgadas estructuradas. En segundo lugar, se desarrollarán biosensores, para ello, se inmovilizará material biológico en la superficie, específicamente enzimas, para mejorar el rendimiento de los dispositivos en términos de especificidad y sensibilidad. Posteriormente, los sensores y biosensores se combinarán para construir redes multisensoras formando bioLEs que serán aplicadas al análisis de matrices complejas, Para ello, los resultados obtenidos serán analizados mediante herramientas estadísticas para discriminar entre muestras, y establecer correlaciones entre los datos obtenidos y los parámetros físico-químicos obtenidos por análisis tradicional.



De acuerdo con este propósito general, los objetivos específicos que se persiguen en esta Tesis Doctoral se dividen en tres bloques en el capítulo 3:

El objetivo principal del primer bloque es el desarrollo de sensores voltamperométricos para el análisis de compuestos de interés en la industria alimentaria, basados en la preparación de películas nanoestructuradas mediante la técnica Layer by Layer (LbL). Para ello se combinarán quitosano, líquido iónico (IL), ftalocianinas (Pcs) y/o nanopartículas metálicas (NPs) con enzimas y se evaluará la respuesta electroquímica de los sensores preparados. Este objetivo general se perseguirá a través de dos objetivos secundarios. El primero es estudiar la influencia de la arquitectura de las películas LbL (composición y orden de las monocapas) y analizar las sinergias establecidas entre los diferentes componentes. También se analizará el papel de estas películas como plataformas para la inmovilización de fenoloxidasas o galactosa oxidasa, evaluando su capacidad para facilitar la transferencia electrónica entre el electrodo, la enzima y el sustrato. Finalmente, se evaluará la posibilidad de desarrollar una lengua bioelectrónica basada en dichos biosensores y analizar muestras de leche según su contenido en lactosa.

Los trabajos presentados en el segundo bloque, tienen como objetivo principal el desarrollo de biosensores voltamperométricos basados en la combinación de nanoestructuras de plata y enzimas para la detección de fenoles o azúcares. El primer trabajo en este campo tiene como objetivo demostrar que es posible utilizar nanohilos de plata (AgNWs), en lugar de las clásicas nanopartículas (AgNPs) y evaluar los potenciales beneficios de utilizar nanomateriales con una relación de aspecto mayor. Los siguientes trabajos tienen como objetivo desarrollar diferentes biosensores, formados con distintas enzimas para su implementación en una bioLE para discriminar entre muestras de leche según su contenido en grasa y calcio, y establecer correlaciones mediante técnicas quimiométricas con los correspondientes datos químicos.

El objetivo principal de los trabajos presentados en el último bloque consiste en el desarrollo y optimización de sensores no enzimáticos basado en la impresión de una matriz polimérica de quitosano siguiendo la técnica de impresión molecular de polímeros (MIPs), que serán usados para la detección de catecol en vino. Para ello se analizarán las capacidades electroquímicas de los sensores voltamperométricos desarrollados en la detección de catecol en disoluciones patrón y se evaluará el papel de la incorporación de nanotubos de carbono (CNTs) decorados con nanopartículas de oro (AuNPs) como mediadores electrónicos en la matriz polimérica. Además, se determinará el rendimiento



de los sensores desarrollados en presencia de interferentes fenólicos y en matrices complejas de vino.

Todos los objetivos perseguidos se debatirán a lo largo de esta Tesis y su contribución a la investigación se discutirá de acuerdo con los artículos científicos obtenidos.



Universidad de Valladolid

Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores y su aplicación en la industria alimentaria

Capítulo 2

Estado Del Arte

El empleo de nanomateriales como materiales sensibles en sensores y biosensores electroquímicos ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. A lo largo de este capítulo se presentan los principales principios y las metodologías utilizadas para la incorporación de nanomateriales en sensores, biosensores y sistemas multisensores electroquímicos, así como sus aplicaciones en la industria alimentaria. Se evalúa el papel de la incorporación de nanomateriales o mezclas de nanomateriales y los beneficios de los efectos sinérgicos que se generan. Se discuten los efectos electrocatalíticos de los nanomateriales como soportes para la inmovilización de enzimas en biosensores. Finalmente, se revisa la aplicación de sensores, biosensores y lenguas electrónicas en la industria alimentaria.

The use of nanomaterials as sensitive material for electrochemical sensors and biosensors has been the subject of numerous studies in recent years. In this chapter, the main principles and methodologies used for the incorporation of nanomaterials in electrochemical sensors, biosensors and multi-sensor systems are presented, as well as their applications in the food industry. The role of incorporating nanomaterials or mixtures of nanomaterials and the benefits of synergistic effects are evaluated. The electrocatalytic effects of nanomaterials as supports for the immobilization of enzymes in biosensors are discussed. Finally, the application of sensors, biosensors and electronic tongues in the food industry is reviewed.



2.1. Sensores y biosensores electroquímicos

Las técnicas electroquímicas son de gran interés para analizar diferentes compuestos presentes en alimentos y bebidas, como antioxidantes o azúcares, entre otros [17,21]. Además, brindan la posibilidad de trabajar en matrices complejas y pueden servir como alternativa a los métodos convencionales de análisis ya que son rápidos, poseen una elevada sensibilidad, permiten su aplicación *in-situ* y no requieren de operadores altamente cualificados [9]. En los siguientes apartados se describen los múltiples métodos de detección electroquímica en los que se basan los sensores electroquímicos, así como algunos de los materiales utilizados en la modificación de electrodos y las diferentes técnicas de preparación de películas que pueden ser empleadas en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos utilizados en el control de calidad de vino y leche, que son los alimentos de interés en esta Tesis.

2.1.1. Métodos de detección electroquímica

La elección del método de detección electroquímica con el que se pueden estudiar las reacciones que tienen lugar en la superficie del electrodo, depende fundamentalmente de las propiedades electroquímicas del sistema (sustrato, electrolito, analito). Generalmente, el proceso de medida involucra un sistema de tres electrodos (el electrodo de trabajo actúa como transductor de la reacción, el contraelectrodo mantiene contacto entre la disolución y la superficie del electrodo y permite aplicar corriente al electrodo de trabajo y el electrodo de referencia tiene un potencial de equilibrio estable y conocido y se utiliza para medir el potencial entre los otros dos electrodos) [22,23]. No obstante, existen sistemas de detección electroquímica en los que se utilizan dos electrodos, como en el caso de los sensores potenciométricos o los impedimétricos en los que no se precisa contraelectrodo [24]. Para garantizar un buen rendimiento electroquímico, la selección del electrodo de trabajo es esencial, por ello tal y como se ha reportado, la modificación de la superficie con materiales y nanomateriales, así como con material biológico, desempeña un papel realmente importante. Además de ello, es necesario solventar la necesidad de desarrollar sensores baratos y desechables para poder utilizar a nivel industrial, lo cual implica el desarrollo de nuevas estrategias como por ejemplo, el desarrollo de electrodos serigrafiados modificados con diferentes materiales [23].

Las técnicas electroquímicas ofrecen múltiples posibilidades de análisis dependiendo del método utilizado en la detección [17]. Entre ellos se incluyen la impedancia, la potenciometría, la amperometría y la voltamperometría [25,26]. A continuación, se presenta un breve resumen de los métodos de detección electroquímica comúnmente aplicados en el desarrollo de sensores para la industria alimentaria.

Los sensores impedimétricos se basan en la detección de cambios en la interacción de la superficie del electrodo y el medio, es decir, registran los cambios de impedancia que ocurren como consecuencia de las interacciones que tienen lugar en la superficie de electrodos modificados químicamente y el medio de ensayo. Este método consiste en la aplicación de una señal sinusoidal de potencial, de pequeña amplitud en un rango de frecuencias determinado, entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, registrándose una respuesta en forma de intensidad de corriente de diferente amplitud y fase que el potencial aplicado. La relación potencial/intensidad de corriente permite identificar los datos de impedancia que pueden representarse en un plano complejo como Z'' (impedancia de la parte imaginaria) frente a Z' (impedancia de la parte real), denominados diagramas de Nyquist o bien el módulo de impedancias $|Z|$ y el desfase (θ) en función de las frecuencias aplicadas denominados diagramas de Bode. Además, es posible ajustar los datos a un circuito eléctrico equivalente para explicar los procesos electroquímicos donde ocurre transferencia de carga a través de la interfase sólido-líquido y a través del electrolito, así como los procesos de difusión [27,28]. Por ello, la inmovilización sobre el electrodo de una amplia variedad de materiales de detección, incluidos nanomateriales y elementos de biorreconocimiento, permite aumentar la especificidad de los sensores a elementos presentes en la disolución en función del cambio de impedancia que se registra en la interfase como consecuencia de su interacción con la superficie del electrodo [29–31].

Actualmente, existe una gran variedad de (bio)sensores impedimétricos utilizados en el análisis de alimentos y bebidas cuyas aplicaciones industriales más comunes se basan en el control de calidad, dada su buena estabilidad, reproducibilidad y precisión [24,32]. Cabe destacar la capacidad de dichos sensores para discriminar muestras de vino en función del tipo de cosecha, viñedo, región o marca de vino. Concretamente se han desarrollado redes de sensores cuyas unidades de detección están basadas en películas Langmuir-Blodgett (LB) o LbL de polímeros, lípidos y una gran variedad de compuestos. También se han empleado técnicas de preparación de películas más sencillas como spin-



coating para la modificación de electrodos con polímeros conductores, nanopartículas y/o ftalocianinas [33,34].

De la misma manera, los sensores impedimétricos se han utilizado con éxito para el análisis de leche. Por ejemplo, utilizando microelectrodos interdigitados (IDE) recubiertos con polímeros conductores es posible detectar adulterantes como la tetraciclina en muestras de leche con distinto contenido graso. También se han usado sensores impedimétricos recubiertos de nanofibras conductoras para analizar muestras de leche sin necesidad de pretratar las muestras [35].

Los sensores potenciométricos se basan en la medida del potencial creado por especies con carga en la superficie de una membrana que actúa como material sensible. Este potencial se mide frente a un electrodo de referencia. El potencial registrado puede utilizarse entonces para determinar la concentración de las especies responsables de la aparición de la carga en la superficie de la membrana. Los sensores potenciométricos ofrecen la posibilidad de modificar la selectividad del sensor variando la naturaleza de los materiales que forman la membrana [36].

Existe una amplia variedad de electrodos potenciométricos selectivos de iones (ISE) que, modificados con membranas de diferentes composiciones (por ejemplo membranas compuestas por agentes quelantes) , permiten detectar selectivamente diversos iones, como por ejemplo Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ o urea generalmente presentes en la leche [37–39] o iones como, Na^+ , NH_4^+ o MnO_4^- presentes en bebidas como vino o cerveza [40,41].

Existen otros materiales empleados en el desarrollo de membranas que, al ser introducidos en una disolución, crean una doble capa cargada en la superficie de la membrana, carga que es proporcional a la presencia de ciertos compuestos. Estos materiales permiten la fabricación de sensores potenciométricos sólidos donde en la mayoría de los casos, las membranas están formadas por un polímero, un plastificante y un aditivo [42,43]. En esta configuración se reemplaza el electrolito interno de los electrodos ISE convencionales por un transductor de contacto sólido [44]. En estos sensores es relativamente sencillo inmovilizar enzimas. La acción enzimática provoca cambios en el potencial de membrana, lo que hace de los sensores potenciométricos unos excelentes biosensores con especificidad para una amplia gama de compuestos (urea, glucosa, etc). Los electrodos modificados mediante la combinación de polímeros con nanomateriales como nanopartículas, nanohilos o nanomateriales de carbono, entre

muchos otros, han demostrado ser sensores potencialmente eficientes debido a que la presencia de nanomateriales ofrece mayor estabilidad en el potencial del electrodo y aumenta la carga de la doble capa [43]. El uso de este tipo de sensores también ha sido utilizado por la tecnología de impresión molecular de polímeros (MIP), con el fin de obtener sensores potenciométricos ISE con una gran selectividad sin necesidad de inmovilizar enzimas en la membrana polimérica [45–47].

Una ventaja importante de los sensores potenciométricos es la posibilidad de miniaturización de forma sencilla, Así, el desarrollo de sensores potenciométricos miniaturizados de transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFETS) y de transistores de efecto de campo enzimático (ENFETS) ha demostrado ser una herramienta eficiente en el análisis de alimentos y bebidas [48,49]. Un transistor ISFET se basa en un MOSFET clásico (transistor de efecto de campo metal-óxido-semiconductor) donde la puerta metálica está conectada a un electrodo de referencia sumergido en una solución acuosa. El dispositivo es sensible a la presencia de portadores de carga en la superficie de la membrana y la señal producida es proporcional a la concentración de analito presente en una muestra [50]. Por otra parte, en el caso de los ENFET la puerta se modifica con una membrana enzimática [51].

Los sensores amperométricos se basan en el registro de la intensidad de corriente eléctrica que produce la oxidación o reducción de la especie de interés cuando se aplica un voltaje fijo (potencial) entre dos electrodos [52]. La señal obtenida es directamente proporcional a la concentración de analito.

Se han utilizado diversos sensores amperométricos modificados con una gran variedad de materiales, nanomateriales y/o enzimas, para cuantificar el contenido de antioxidantes en los vinos [22] o componentes de interés en productos lácteos como lactosa o lactato a través del H_2O_2 generado en la reacción enzimática [53,54], así como para la determinación de aditivos o contaminantes en otros alimentos o bebidas entre los que incluyen hidracina, bisfenol A, ácido ascórbico, cafeína, ácido cafeico, sulfitos o nitritos [9]. Por lo general los sensores amperométricos se emplean en la detección electroquímica del analito, mientras que el comportamiento electroquímico del analito en la superficie del electrodo suele estudiarse a través de técnicas voltamperométricas.

En los sensores voltamperométricos se aplica un barrido de potencial y se registra la corriente eléctrica producida por la oxidación/reducción del analito y/o de la especie



de interés en la superficie del electrodo. Durante estos procesos redox se produce una transferencia de electrones entre el electrodo de trabajo y la solución, que causan un aumento de la intensidad de corriente, donde la intensidad de los picos es proporcional a la concentración del analito [55]. Al igual que en los sensores amperométricos, en los sensores voltamétricos es posible modificar los electrodos con una amplia variedad de materiales, capaces de incrementar la selectividad y la especificidad del sensor de forma sencilla y efectiva. Otra ventaja importante de la voltametría es su versatilidad ya que existen diferentes formas de aplicar el barrido de voltaje. Estas diferentes técnicas, se detallan a continuación [56]:

En la voltamperometría cíclica (CV) el potencial se aplica de forma cíclica y varía linealmente con el tiempo a una velocidad de barrido constante, desde un potencial inicial hasta un potencial máximo regresando al potencial inicial, un determinado número de ciclos. Al voltaje apropiado, las especies redox se oxidan o reducen en la superficie del electrodo, produciendo una corriente transitoria, cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito. Es la técnica más empleada para obtener información cualitativa y cuantitativa de la presencia de especies con actividad redox. Dada su gran capacidad de detección electroquímica, la CV será la técnica aplicada en las investigaciones desarrolladas en esta Tesis para la cuantificación de los analitos estudiados. No obstante, existen otras técnicas voltamperométricas ampliamente usadas como son la voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) o la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) con las que también se ha trabajado en el desarrollo de investigaciones realizadas en esta Tesis.

En DPV, la señal de excitación consiste en la aplicación de un barrido lineal de potencial a través de pulsos con una amplitud, duración e incremento de potencial constantes. La respuesta que se obtiene es un barrido de intensidad en el que se representa para cada pulso la diferencia entre las corrientes registradas inmediatamente antes del pulso y al final del pulso. Esta técnica minimiza las corrientes no faradaicas. De esta manera al representar la diferencia de las corrientes obtenidas, frente al potencial aplicado se obtienen respuestas donde la intensidad máxima de corriente faradaica es directamente proporcional a la concentración de la especie reaccionante con una mayor sensibilidad que otras técnicas como la voltametría cíclica.

En SWV se aplican pulsos de potencial constantes entre el electrodo de trabajo y el de referencia en forma de onda cuadrada y se mide como en DPV la corriente dos veces

durante cada ciclo de la onda cuadrada, la primera al final del pulso directo y la segunda al final del pulso inverso, durante intervalos de tiempo muy cortos (periodos). En SWV como en DPV se representa la diferencia entre estas dos mediciones frente al potencial en escalera aplicado, esto es en condiciones de oxidación y en condiciones de reducción. Este método es más sensible y más rápido que la DPV ya que además de eliminar las corrientes faradaicas se consigue un aumento en la intensidad de la señal debido a que la intensidad de la corriente obtenida en cada pulso es más elevada al ser la diferencia entre la corriente anódica positiva y la corriente catódica negativa. Por tanto la técnica SWV permite discriminar mejor la corriente faradaica de la corriente capacitiva, al tener en cuenta las dos corrientes mientras que en la técnica DPV se registra únicamente la corriente en el sentido anódico [56].

El uso de sensores voltamperométricos ha sido ampliamente abordado para la cuantificación de analitos en la industria alimentaria. Para ello se han utilizado desde los sensores más simples, fabricados con materiales conductores clásicos (carbono, oro, platino, etc.) hasta aquellos en los que la superficie del electrodo se ha modificado químicamente para mejorar la selectividad del sensor. Una gran variedad de materiales tales como los polímeros conductores, ciertos compuestos de coordinación, nanomateriales o nanomateriales derivados del carbono entre muchos otros han demostrado ser buenos materiales modificadores gracias a sus excelentes propiedades electrocatalíticas [14,57–62]. A su vez, estos electrodos químicamente modificados, permiten en muchos casos la inmovilización de biomateriales tales como enzimas, lo que permite inducir especificidad a los sensores [16,63–66]. A continuación, se describe la importancia de estos materiales y nanomateriales como materiales sensibles, así como soportes para la inmovilización de enzimas en la detección electroquímica.

2.1.2. Materiales y nanomateriales sensibles. Detección electroquímica

La sensibilidad y selectividad de los sensores electroquímicos se puede optimizar modificando la superficie de los sensores (electrodos modificados químicamente) utilizando diversos materiales, nanomateriales o enzimas, cuyo uso ha demostrado ser extremadamente útil para mejorar las características de los sensores electroquímicos [9]. Los nanomateriales han atraído una gran atención por su actividad electrocatalítica y alta conductividad, su alta relación superficie/volumen y la posibilidad de ser modificados o funcionalizados [17]. Además, la biocompatibilidad de los nanomateriales les convierte



en una plataforma excelente para la inmovilización de biomateriales, favoreciendo la especificidad [67]. Asimismo, la combinación adecuada entre varios materiales electrocatalíticos puede mejorar el funcionamiento del sensor gracias a los efectos sinérgicos que aumentan la transferencia electrónica [68,69].

Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: metales y aleaciones convencionales, polímeros, moléculas orgánicas, compuestos de coordinación, materiales porosos o materiales carbonosos, entre otros [70,71]. Entre ellos, los que se han empleado en el desarrollo de esta Tesis son: polímeros como el quitosano, nanotubos de carbono (CNTs), líquidos iónicos (ILs), ftalocianinas (Pcs), y nanoestructuras metálicas como nanopartículas (NPs) o nanohilos (NWs) [72].

Existe una amplia variedad de **polímeros** que pueden emplearse como sustrato intermedio en la modificación de superficies de electrodos. Los polímeros naturales como el **quitosano** son materiales baratos, biocompatibles y aptos para desarrollar sensores o biosensores por las ventajas físicas y químicas que ofrecen (buena resistencia mecánica, estabilidad, hidrofiliidad y posibilidad de modificación química, entre otras). Los polisacáridos tienen un gran potencial en el desarrollo de sensores electroquímicos gracias a su capacidad para crear uniones con otros materiales, y con enzimas, lo que les convierte en una excelente plataforma para la inmovilización de materiales [73]. Así, la modificación de la superficie del electrodo con polisacáridos ha demostrado ser una excelente opción para aumentar el rendimiento analítico de sensores y biosensores [74]. Esta mejora se puede implementar mediante la combinación de estos polímeros con otros materiales, como NPs, ILs o derivados de carbono, que potencian la transferencia de electrones [75]. Dentro de la gran variedad de polímeros disponibles, el quitosano destaca por su amplia aplicación en el análisis de muestras ambientales, clínicas y alimentarias [74].

Los **nanomateriales de carbono** son ampliamente utilizados en el desarrollo de sensores electroquímicos debido a sus excelentes propiedades electrónicas y catalíticas, la gran ventana de potencial a la que pueden trabajar y a su bajo coste. Por ello, el uso de sensores y biosensores modificados con nanomateriales de carbono permite realizar análisis electroquímicos de analitos electroactivos con elevada precisión. La estructura geométrica de los nanomateriales de carbono puede variar entre tubos (nanotubos de carbono, CNTs), cuernos (nanocuernos de carbono), nanopartículas esféricas o elipsoidales (por ejemplo, fullerenos) y grafeno, pudiendo además funcionalizarse con

moléculas orgánicas o inorgánicas. Poseen excelentes propiedades, entre las que se incluyen una alta conductividad, alta relación superficie/volumen y su gran capacidad de adsorber materiales y biomateriales. La modificación de sensores electroquímicos con nanomateriales de carbono es una excelente opción en el desarrollo de biosensores al favorecer la inmovilización de la enzima con técnicas como adsorción física, reticulación o unión covalente [76–79]. Una parte de esta Tesis está enfocada al estudio del rol que desempeñan los **nanotubos de carbono** como mediadores electrónicos en la fabricación de sensores electroquímicos basados en sensores MIPs.

En las últimas décadas, el empleo de *líquidos iónicos* (ILs) como modificadores de superficies ha despertado un gran interés en el desarrollo de sensores electroquímicos [80,81]. Los ILs son sales orgánicas que están compuestas por aniones y cationes, y suelen clasificarse según su solubilidad. Tanto los ILs hidrofóbicos como los hidrofílicos, se utilizan comúnmente en el desarrollo de películas. La integración de IL en el desarrollo de sensores y biosensores es una buena opción para incrementar la sensibilidad como resultado de su alta conductividad iónica, lo que mejora los procesos de transferencia de electrones desde el analito al electrodo. Además, se pueden depositar sobre la superficie de un electrodo mediante técnicas sencillas. En algunos trabajos, basados en la combinación de IL con otros materiales como metalofalocianinas y grafeno, se ha determinado que la presencia del IL es crucial debido a que mejora la intensidad de las señales [82]. Además, se ha demostrado que los ILs tienen una buena compatibilidad con las biomoléculas, por lo que preparar películas combinando enzimas en ILs puede mejorar la actividad de la película sensible, debido a sus propiedades estabilizadoras y su capacidad para aumentar la transferencia de electrones y la reversibilidad en las reacciones electroquímicas. [83,84].

Dentro de la gran variedad de compuestos orgánicos que se pueden emplear en el desarrollo de sensores, cabe destacar el uso de *macrociclos aromáticos*, entre los que se encuentran las **ftalocianinas** (Pcs). Son sistemas aromáticos con estructuras altamente conjugadas, que se coordinan con iones metálicos, originando las metalofalocianinas (MPcs). Una de las características más relevantes, es su versatilidad ya que pueden presentar sustituyentes en sus anillos aromáticos, lo que permite modular sus propiedades [85]. Tienen excelentes propiedades redox y electrocatalíticas, por lo que han sido



ampliamente utilizados como material sensible en el desarrollo de sensores electroquímicos [86].

Recientemente, la utilización de **nanoestructuras de metales** de transición, óxidos metálicos o aleaciones se ha convertido en una estrategia muy prometedora para la fabricación de sensores y biosensores electroquímicos ya que estos nanomateriales exhiben propiedades ópticas, eléctricas, térmicas y catalíticas excepcionales. Una de las características principales de los mismos es la gran variedad de tamaños, formas y composiciones disponibles. Además, cabe destacar sus propiedades de biocompatibilidad, lo que les dota de la capacidad de actuar como mediadores en reacciones de transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo [71]. Entre la gran diversidad de nanoestructuras existentes, los nanomateriales metálicos de baja dimensión (entre los que se encuentran las nanopartículas de 0D, los nanohilos o nanotubos de 1D) han desempeñado un papel importante en el desarrollo de sensores electroquímicos por sus atractivas propiedades químicas y físicas en aplicaciones de electroanálisis. Estos nanomateriales presentan grandes áreas de superficie activa donde tienen lugar las reacciones electroquímicas, y además, favorecen la transferencia acelerada de electrones debido a su elevada conductividad eléctrica y rendimiento catalítico [87].

Las **nanopartículas metálicas** de metales como el oro (AuNPs), la plata (AgNPs) o el platino (PtNPs), son las más empleadas en el desarrollo de sensores y biosensores [31,88] ya que, además de sus propiedades electrocatalíticas, proporcionan un ambiente adecuado para la inmovilización de material biológico [89].

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado sensores basados en **nanohilos de plata** (AgNWs), nanomateriales que presentan una mayor relación de aspecto que las nanopartículas, así como una alta relación superficie/volumen, lo que proporciona un incremento en la velocidad de transferencia de electrones de las reacciones electroquímicas [90]. A pesar de ello, apenas se han utilizado en el desarrollo de plataformas electroquímicas y solo existe un número reducido de trabajos previos que incluyen el uso de nanohilos de oro (AuNWs). También se ha propuesto su combinación con otros nanomateriales, tales como CNTs o grafeno y derivados, [91,92] aprovechando las sinergias que se producen al combinar estos materiales. También se han combinado con proteínas [93,94] para conseguir biosensores con mayor selectividad y con elevada sensibilidad en el análisis de compuestos fenólicos.

2.1.3. *Enzimas. Elementos de biorreconocimiento*

La integración de enzimas en los dispositivos sensores permite obtener dispositivos biosensores altamente específicos para compuestos tales como azúcares, fenoles, ácidos grasos o urea (entre muchos otros) lo que resulta sumamente interesante en el control de calidad y seguridad de alimentos y bebidas. El principal interés del uso de enzimas en los sensores electroquímicos se basa en su especificidad, la cual está determinada por la reacción que ocurre en su sitio activo, donde el sustrato específico es retenido por el biorreceptor [72]. Además, es importante su capacidad para catalizar la reacción sin consumirse [95].

Las enzimas son proteínas globulares con un tamaño en torno a los 10-400 kDa, que pueden clasificarse en diferentes categorías según el tipo de reacción que catalizan, siendo las oxidorreductasas, liasas e hidrolasas las más utilizadas en el ámbito de los biosensores [96]. Las oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidación/reducción de diferentes especies como azúcares o fenoles. En concreto, en los sensores amperométricos o voltamperométricos, la enzima se inmoviliza sobre la superficie del electrodo y es un producto de la reacción enzimática el que sufre un proceso redox que puede determinarse mediante métodos electroquímicos. Existe una amplia variedad de oxidorreductasas para la detección de antioxidantes donde se consigue un excelente acoplamiento eléctrico entre la enzima y el transductor. La lacasa o tirosinasa son las enzimas preferidas para el análisis de antioxidantes, especialmente para la detección de compuestos fenólicos [95]. La glucosa oxidasa o la galactosa oxidasa, son ampliamente utilizadas para la detección de azúcares [53].

Por otra parte, cabe destacar que el rendimiento de los biosensores está directamente relacionado con el pH, la temperatura, la cantidad y tipo de enzima. Además, en algunos casos es necesaria la acción de cofactores (tipo FAD o NAD), que complementan la actividad de la enzima en la oxidación del sustrato.

En esta Tesis se han utilizado diversas oxidasas, entre otras, destacan la tirosinasa, lacasa o galactosa oxidasa, donde el sitio activo contiene iones cobre que tienen un papel fundamental en el acoplamiento entre la enzima y el sustrato y que además intervienen en los procesos enzimáticos de oxidorreducción [96–99].

El campo de los biosensores ha tenido un desarrollo muy rápido y el diseño de los sensores ha evolucionado siguiendo diversas estrategias:



Los sensores de primera generación, que consisten en dispositivos en los que las enzimas se depositan directamente sobre el sustrato conductor. Durante la reacción enzimática, el sustrato se reduce mientras que la enzima se oxida. Para regresar a su estado inicial, la enzima reacciona con el O_2 del aire y se produce H_2O_2 . En estos sensores se detecta el O_2 consumido o el H_2O_2 producido. En los sensores de primera generación, la regeneración de la enzima es un proceso difícil. Con el fin de facilitararlo, se desarrollaron los biosensores de segunda generación, que utilizan mediadores redox (en solución o inmovilizados con la biomolécula) para mejorar la transferencia de electrones. En los sensores de segunda generación, se han utilizado una gran variedad de mediadores electrónicos (ferrocianuro, polímeros conductores, etc.). Además, en los últimos años se ha demostrado que los nanomateriales son excelentes mediadores electrónicos y excelentes sustratos para inmovilizar enzimas sin pérdida de actividad. Así, la combinación de nanomateriales biocompatibles con enzimas puede lograr límites de detección bajos con alta estabilidad y especificidad [10,17].

Y finalmente, los sensores de tercera generación se basan en la transferencia directa de electrones (DET) entre los sitios activos redox de la enzima y la superficie del electrodo en ausencia de mediador electrónico [9,100]. En el caso de los biosensores de tercera generación, la posibilidad de obtener la transferencia eléctrica directa depende de la interacción entre las enzimas redox y los electrodos, que a su vez va ligada a factores y propiedades de la enzima como son: la ubicación del sitio activo o la orientación de la enzima sobre la superficie del electrodo. Pero, también depende de factores como la energía de reorganización, que refleja la rigidez estructural del sitio redox en sus formas oxidada y reducida; o la fuerza motriz termodinámica de la transferencia de electrones, que fluctuará en función de la sincronía entre el potencial redox de la proteína y la polarización de la superficie del electrodo [101].

Un aspecto de enorme importancia en el desarrollo de biosensores es la correcta inmovilización de la enzima sobre el sustrato, lo que implica que la enzima quede bien adherida a la superficie, con la correcta orientación para que el centro activo no quede bloqueado y evitando la desnaturalización. Las enzimas pueden inmovilizarse mediante diferentes interacciones físicas o químicas. Uno de los métodos más habituales es el atrapamiento de la enzima en matrices poliméricas o en membranas semipermeables (formando microcápsulas) [102,103].

Por otro lado, la inmovilización de enzimas mediante una reacción química puede incluir la unión a diferentes soportes o la reticulación. El enlace se puede formar mediante enlaces débiles tipo Van der Waals, incluidas las interacciones π - π entre anillos aromáticos o enlaces de hidrógeno, o mediante enlaces covalentes utilizando los grupos carboxilo, amina o tiol de los aminoácidos. La reticulación es otro método común en el desarrollo de biosensores debido a la alta estabilización que aporta a las enzimas. En esa técnica se utilizan compuestos bifuncionales como el glutaraldehído para provocar enlaces intermoleculares irreversibles en enzimas capaces de resistir condiciones de pH o temperatura más extremas sin desnaturalizarse [102,104,105].

En numerosas ocasiones, es necesario proteger y fijar la enzima con una capa polimérica, por ejemplo, el Nafion, que permite el intercambio de iones, a la vez que retiene la enzima sobre la superficie del electrodo.

2.1.4. Preparación de sensores y biosensores. Modificación de la superficie

Para preparar sensores es necesario disponer de técnicas que permitan depositar materiales, nanomateriales o enzimas sobre la superficie de un electrodo. Estas técnicas comprenden una amplia variedad de metodologías desde las más sencillas a técnicas sofisticadas, que permiten la formación de películas ordenadas y/o nanoestructuradas [7].

Los métodos de recubrimiento de electrodos más sencillos incluyen técnicas como el **drop-casting**, el **dip-coating**, el **spin-coating** y el **doctor blade-coating** representadas en la Figura 1.

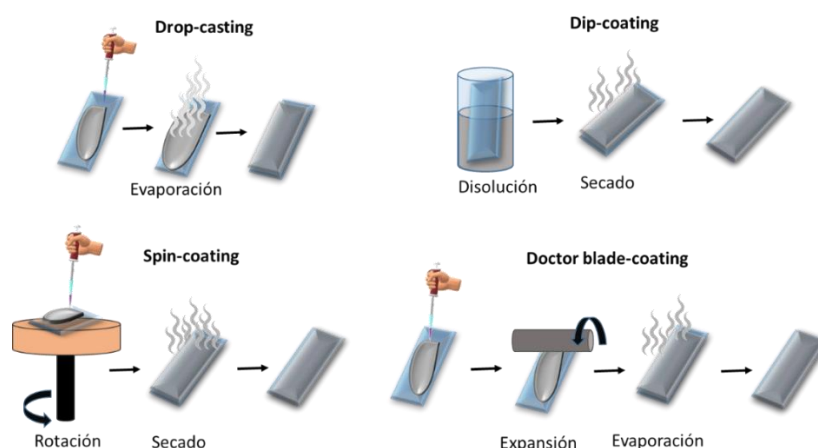


Figura 1: Representación esquemática del método de desarrollo de diferentes técnicas de recubrimiento de sensores.



El método drop-casting consiste en depositar una disolución de los materiales o compuestos biológicos directamente sobre la superficie del electrodo, donde finalmente se secan los aglutinantes y elimina el disolvente por evaporación [106,107]. La técnica dip-coating se basa en la inmersión del electrodo en una solución del material que se adhiere a la superficie del electrodo mediante fuerzas débiles, recubriéndola con una capa muy fina de material sensible; en esta técnica los tiempos de inmersión, la concentración, la velocidad de inmersión-emersión del sustrato y la temperatura son factores cruciales para el correcto desarrollo de películas uniformes [108].

En el método spin-coating, la disolución del material se deposita sobre la superficie del electrodo y se aplica un giro que provoca la evaporación del disolvente, formándose una película altamente homogénea. Tanto la velocidad de giro como la concentración y viscosidad de material añadido son parámetros que hay que fijar cuidadosamente para controlar el espesor de las películas. Esta técnica se caracteriza porque a pesar de su rapidez y simplicidad, proporciona buena reproducibilidad y por ello, se utiliza ampliamente en la industria para obtener películas de materiales orgánicos [30,109].

El método doctor-blade es otro método simple, a partir del cual se obtienen capas delgadas y uniformes cuando la solución de nanomaterial se extiende sobre la superficie del electrodo mediante una cuchilla afilada colocada a una distancia fija de la superficie del electrodo. La solución de recubrimiento se coloca frente a la cuchilla y ésta se desplaza sobre la superficie creando una película homogénea. La tensión superficial, la viscosidad, la humectación, la velocidad y el tipo de disolvente son parámetros relevantes que determinan la uniformidad de las películas [110].

Los métodos expuestos hasta este momento son métodos sencillos pero eficaces y permiten controlar el espesor de las películas. Sin embargo, no se consigue una completa homogeneidad en las películas debido a que no se puede controlar el orden molecular y, por tanto, es muy difícil obtener películas totalmente reproducibles. No obstante el uso de estas técnicas ha sido un método interesante en el desarrollo de sensores y biosensores porque estas películas pueden usarse como una plataforma ideal para la unión con compuestos biológicos, gracias a la buena adsorción de la enzima sobre el material sensible en la superficie del electrodo [111]. La gran ventaja de estas técnicas, es la gran variedad de materiales que pueden depositarse sobre las superficies de los electrodos. Entre ellos, cabe destacar la utilización de materiales como AuNPs [14], CNTs [15,16], MPcs [16], grafeno [30], y un largo etcetera.

Otras formas de preparación de películas basadas en procesos más complejos se muestran en la Figura 2. Concretamente, el método de **deposición electroquímica** se basa en recubrir la superficie del electrodo mediante técnicas electroquímicas. Se puede aplicar con materiales poliméricos, metales u óxidos metálicos que son depositados sobre la superficie de electrodo sumergido en una disolución, gracias a la aplicación de una corriente/potencial eléctrico. Para ello se utiliza una celda electroquímica con un sistema de tres electrodos, donde se aplica corriente de suficiente intensidad o un potencial adecuado para reducir los iones metálicos o polimerizar los monómeros en la superficie del electrodo de trabajo. Este método se puede llevar a cabo utilizando diferentes técnicas electroquímicas (cronoamperometría, cronopotenciometría, voltametría cíclica, electroforesis, etc). Con ello se consigue controlar el espesor de la película optimizando parámetros como el potencial, la corriente, la temperatura, el pH, la concentración y el tiempo de deposición. Estos parámetros permiten controlar la velocidad y extensión del proceso de deposición/polimerización, lo que condiciona las propiedades químicas y físicas de la película resultante. Otra ventaja importante es la obtención de películas delgadas porosas con una elevada superficie específica [112,113].

El método **electrospinning** se aplica para preparar películas de fibras de materiales derivados de carbono, materiales inorgánicos o polímeros de forma sencilla y versátil. En esta técnica, el material de partida se funde y se hace pasar por una punta con un pequeño orificio. El material entonces, se somete a un campo eléctrico de modo que al ser cargado es atraído hacia una superficie, cargada opuestamente, en la que se encuentra el sustrato. Con ello se pueden obtener diferentes morfologías de fibras de forma continua con una superficie muy porosa.

Una técnica similar es la **deposición electrospray**, en la que la disolución del material de partida se pulveriza sobre una superficie. La solución cargada eléctricamente se dispersa en forma de gotas cargadas de pequeño tamaño que son esparcidas mediante fuerzas de dispersión. La uniformidad de la película depende del tamaño, la carga y la velocidad de las gotas del material utilizado [114,115].

Los métodos de **deposición física en fase vapor (PVD Physical Vapor Deposition)** y **deposición química en fase vapor (CVD Chemical Vapor Deposition)**, también se utilizan en la modificación de la superficie de electrodos. La técnica PVD consiste en la formación de un vapor del material que se deposita sobre la superficie del electrodo, formando una película. La realización de dicho proceso requiere vacío para

facilitar la evaporación de los precursores. En el caso de la técnica CVD, los precursores en fase vapor, se inyectan en una cámara y al alcanzar la superficie del electrodo, reaccionan, formándose una película del material producto de la reacción [113,115].

La **técnica de serigrafía (screen-printed)** es uno de los métodos más ampliamente utilizado en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos. Consiste en la transferencia del material de impresión a los electrodos a través de una plantilla que presenta un patrón determinado. Una vez depositado, el material se sinteriza dando lugar a una película del mismo, que sigue el patrón de la plantilla. Con ello se obtienen películas gruesas del material de interés sobre el sustrato modificado. La técnica de la serigrafía ha tenido un gran éxito en el campo de los sensores electroquímicos. De hecho, existen varias compañías que comercializan dispositivos en los que se han serigrafiado los tres electrodos (referencia, contraelectrodo y electrodo de trabajo) a partir de diversos materiales. Además, permiten la deposición de nanomateriales o agentes biológicos directamente sobre las superficies de los electrodos, mejorando su rendimiento. Estos electrodos se han utilizado con éxito en el análisis de productos lácteos y vitivinícolas [22,37,111,116,117] entre otros.

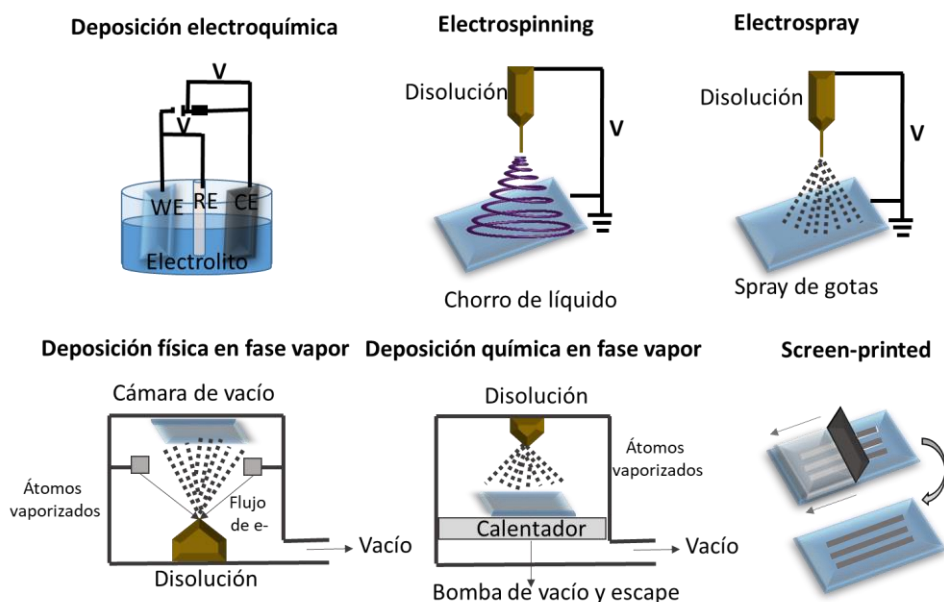


Figura 2: Representación esquemática de diferentes métodos de deposición directa de materiales sobre la superficie de electrodos.

Finalmente, la modificación de los electrodos se puede llevar a cabo utilizando técnicas más sofisticadas, que permiten preparar películas nanoestructuradas de espesor controlado (Figura 3). La técnica **self-assembled monolayers** (SAMs) se basa en la preparación de monocapas bidimensionales altamente ordenadas mediante adsorción química sobre la superficie de los electrodos. La afinidad entre el electrodo y la molécula a depositar, es fundamental en el proceso de adsorción y autoensamblado. Actualmente, se han descrito diversos sistemas en los que se produce el fenómeno de autoensamblado entre los que incluyen alquiltioles sobre oro o alquilsilanoles sobre vidrio. No obstante, existen otros sistemas compatibles con el desarrollo de SAMs. Además, es bien conocida la gran afinidad de los biomateriales (enzimas, anticuerpos o DNA) hacia el oro, lo que abre una interesante línea de investigación en el desarrollo de biosensores con aplicación industrial [118–120].

Layer by Layer (LbL) es un método simple y efectivo para obtener películas formadas por materiales como polímeros, biomoléculas o compuestos inorgánicos entre otros, utilizando interacciones electrostáticas [121]. Este método se basa en la adsorción de compuestos catiónicos y aniónicos o polielectrolitos iónicos alternando capas de diferente carga eléctrica en la superficie del electrodo formando multicapas. Este método de autoensamblaje es fácil, rápido y permite controlar con precisión la composición y grosor de las películas que conforman las monocapas. Otra ventaja de este método, es la posibilidad de trabajar con sustancias solubles en agua lo que permite la inmovilización directa de biomateriales, haciendo que los electrodos sean más sensibles y específicos [66,122–124].

Las estructuras SAMs o LbL a menudo dificultan el transporte de electrones entre el sustrato y el analito debido a su arquitectura compacta [125]. Es por este motivo que resulta imprescindible el aumento del área activa superficial. Además, la técnica permite utilizar combinaciones de materiales con funcionalidades complementarias, con el objetivo de mejorar las propiedades analíticas de los sensores, y en el caso de los biosensores, facilitar la transferencia electrónica para potenciar la actividad biocatalítica de las enzimas inmovilizadas en la superficie [126,127].

A lo largo de esta Tesis se demuestra la importancia de la selección de los componentes de las películas basadas en el método LbL, dónde las interacciones entre distintos materiales sensibles y/o electrocatalíticos resultan esenciales para favorecer los mecanismos de transferencia electrónica en la superficie del electrodo.



Langmuir Blodgett (LB) es un método para formar multicapas nanoestructuradas, en el que se puede controlar el grosor y el orden de las películas en la superficie del electrodo. Este método consiste en la dispersión de moléculas, generalmente anfifílicas, sobre una superficie de agua. Las moléculas tienden a orientarse con las cabezas hidrofílicas hacia la superficie del agua y las colas hidrofóbicas lejos de ella. Tras la evaporación del disolvente, la monocapa formada se comprime para orientar las moléculas, de modo que se obtiene una monocapa ordenada en la interfase aire-agua. Esta monocapa se puede transferir a un electrodo que se sumerge en la fase acuosa que contiene la monocapa flotante ordenada. La inmersión del electrodo en la subfase de agua se puede repetir un determinado número de veces para desarrollar una película ordenada multicapa de espesor controlado. Este tipo de películas tiene la ventaja de que permite preparar películas con diversos componentes, lo que favorece sinergias. Además, las películas formadas se asemejan a la estructura de las membranas biológicas. Por esta razón, se puede utilizar para inmovilizar enzimas en un entorno biomimético en el que se preserva la funcionalidad enzimática [121,128–130].

La técnica basada en **polímeros de impresión molecular (MIPs)** es una técnica que permite reconocer una molécula huésped gracias a la presencia de cavidades específicas impresas en una membrana polimérica depositada en la superficie del electrodo. La película molde (host) se prepara por polimerización del monómero en presencia de la molécula plantilla (guest). Después de la impresión, se elimina dicha molécula de modo que se generan cavidades que mantienen su configuración, lo cual permite identificar posteriormente al analito en disolución. La electropolimerización de monómeros poliméricos es de especial interés en la detección electroquímica en la industria alimentaria porque permiten la inmovilización de materiales sensibles en la membrana, con un control preciso, lo que sirve para mejorar el rendimiento analítico del sensor MIP. La gran ventaja de esta técnica, es que se consigue elevada especificidad sin necesidad de inmovilizar material biológico [18,19,131,132]. Para la construcción de MIPs, se necesitan polímeros que tengan afinidad por analitos de interés, que tengan posibilidad de acoger la molécula plantilla y que sean capaces de sufrir modificaciones químicas. Se han desarrollado varios tipos sensores utilizando MIPs, como sensores electroquímicos, colorimétricos, fluorescentes, etc [133].

Dado el éxito de los sensores electroquímicos basados en la técnica MIP debido a su simplicidad, sensibilidad, facilidad de implementación y costes de medición

generalmente bajos, en esta Tesis se han desarrollado sensores electroquímicos basados en la impresión molecular de quitosano. Estudios previos han informado de los buenos rendimientos obtenidos con sensores electroquímicos combinados con quitosano impreso molecularmente, dichos trabajos han mostrado una buena respuesta lineal con un límite de detección bajo, buena selectividad, reproducibilidad, estabilidad y capacidad de reutilización. Los procedimientos de preparación de los sensores son relativamente simples y proporcionan métodos de detección rápidos para diferentes analitos como pesticidas [134] medicamentos [135], metabolitos como la glucosa [136] urea [137] o compuestos fenólicos como el catecol [75,138].

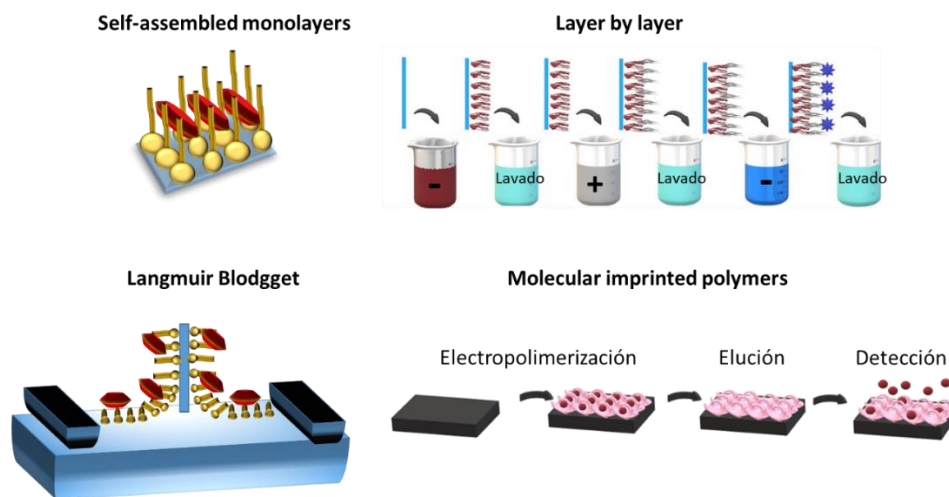


Figura 3: Representación esquemática de diferentes métodos de deposición de películas ultra-finas y nanoestructuradas sobre la superficie de electrodos.



2.2. Sensores en la Industria Alimentaria

La industria de la alimentación necesita cumplir con los estrictos requisitos del sector en materia de calidad y seguridad. Además, debe adoptar medidas de control que permitan lograr la satisfacción del consumidor en todos los aspectos de seguridad, confianza, comodidad y calidad. Por ello, resulta necesario establecer controles de calidad que permitan procesar los productos alimenticios en tiempo real, de manera fácil y económica.

Las técnicas de análisis químico clásico, son complejas, costosas y los análisis requieren tiempos largos [23]. Por esta razón, es necesario encontrar alternativas que permitan reducir los tiempos de análisis y llevarlos a cabo de manera on-line. Para cubrir esta necesidad, se están desarrollando dispositivos electroquímicos tales como sensores y biosensores, que son una alternativa interesante en el análisis de alimentos y bebidas debido a su portabilidad, capacidad de miniaturización y bajo precio [17]. En los últimos años, estamos asistiendo al desarrollo de nuevos avances en el campo de los sensores y biosensores electroquímicos, lo que incluye el uso de nanomateriales, la combinación de nanomateriales con enzimas y otros materiales biológicos y el diseño de lenguas electrónicas, en las que una red de sensores se combina con un software de reconocimiento de patrones.

Dentro de la variedad de bebidas existentes en el mercado, aquí nos centraremos en dos productos de interés como son el vino y la leche con los que se ha trabajado a lo largo de esta Tesis Doctoral. A continuación, se reporta una breve revisión basada en el desarrollo de nuevos sensores y biosensores electroquímicos para el análisis de fenoles normalmente presentes en vinos y azúcares característicos de los productos lácteos.

2.2.1. Sensores y biosensores para la detección de compuestos fenólicos

El vino es una matriz acuosa compleja que se obtiene de la fermentación alcohólica del zumo de uvas maduras. El vino contiene compuestos derivados de la uva y de los procesos bioquímicos involucrados en todos los procesos de vinificación (desde la fermentación alcohólica hasta el envejecimiento) donde las variaciones en factores como temperatura, pH, densidad o acidez, y deben cuantificarse íntegramente para garantizar la calidad y el sabor del vino.

Para salvaguardar la calidad del vino, es necesario evaluar el producto final, por lo que se debe comprobar la composición y específicamente el contenido de componentes como etanol, glucosa, ácido málico, ácido láctico, fenoles, sulfitos, etc. [22]. Entre ellos, la presencia de antioxidantes en vino es de especial relevancia ya que no solo afecta a la calidad sino también a sus características organolépticas. Al mismo tiempo, aportan beneficios para la salud, ya que su consumo reduce el riesgo de trastornos cardiovasculares, debido a que son capaces de reducir el daño oxidativo en las células producido por los radicales libres. Por lo tanto, la cuantificación del contenido en compuestos fenólicos en los vinos es fundamental para poder determinar su calidad.

Los compuestos fenólicos incluyen una gran diversidad de compuestos químicos que se caracterizan por poseer al menos un núcleo bencénico, sustituido con uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional. Su reactividad se debe tanto al carácter ácido de la función fenólica como al carácter nucleofílico que le otorga la alta densidad electrónica del anillo bencénico, lo que les confiere una marcada actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos se clasifican en compuestos flavonoides y compuestos no flavonoides. Los compuestos flavonoides (antocianos, flavanoles flavonoles, flavonas,) y no flavonoides (ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos y estilbenos) son los fenoles más característicos presentes en vino [9,56,139].

La composición polifenólica de los vinos depende de la variedad de la uva y de otros factores que afectan al desarrollo de la uva, tales como el suelo, la localización geográfica y las condiciones climáticas, los métodos de vinificación utilizados, el tipo de envejecimiento, etc. Los compuestos fenólicos tienen un papel muy importante en los procesos de vinificación y los cambios en composición que se producen influyen en las características finales del vino.

Aunque existen diversos métodos para detectar la presencia de fenoles y de la capacidad antioxidante de los vinos, dichas técnicas requieren largos tiempos de análisis y por tanto no son adecuadas para ensayos de rutina a nivel industrial. Estas limitaciones pueden ser solventadas con el uso de sensores y biosensores electroquímicos o con el de dispositivos multisensores [56]. Entre la amplia variedad de métodos electroquímicos empleados en el desarrollo de sensores y biosensores para la detección de fenoles, los métodos amperométricos o voltamperométricos son los más eficientes ya que en ellos los procesos de oxidación/reducción dan lugar a picos de corriente cuya la intensidad es proporcional a la concentración del analito. Son por ello una herramienta cuantitativa,



simple y rápida cuyos resultados son comparables a los obtenidos mediante otras técnicas analíticas como Folin-Ciocalteu o HPLC, demostrando una elevada sensibilidad y selectividad en su detección [140,141].

Los sensores más sencillos son los sensores amperométricos basados en electrodos metálicos [142,143] o en electrodos de carbono vítreo (GCE) que se han utilizado en el análisis de compuestos como ácido cafeico [144], ácido gálico [145], catequina [31], catecol [146], hidroquinona y resorcinol [147] entre otros. Sin embargo, en las últimas décadas se están desarrollando nuevos sensores y biosensores basados en la modificación química de una amplia diversidad de soportes. El hecho de poder modificar la superficie del sensor, permite mejorar la sensibilidad y la selectividad de los sensores electroquímicos. En el caso del análisis de los compuestos fenólicos, se han reportado sensores electroquímicos basados en una amplia variedad de materiales, que han permitido mejorar la respuesta electroquímica de las plataformas. Entre ellos cabe destacar el uso de materiales con propiedades electrocatalíticas tipo polímeros conductores como el polipirrol [142,148,149], las ftalocianinas [69,122,150,151] o los nanomateriales tales como nanomateriales de carbono (nanotubos, grafeno, óxido de grafeno, etc.) [13,151] o NPs metálicas o de óxidos metálicos [31,69,88,143]. Además, la combinación de materiales y/o nanomateriales puede dar lugar a efectos sinérgicos que pueden ocasionar un aumento notable de la sensibilidad y que permiten alcanzar límites de detección de fenoles extremadamente bajos [152].

La detección de fenoles por medios electroquímicos, también puede realizarse utilizando biosensores basados en enzimas tipo fenol-oxidasas (tirosinasa, lacasa, peroxidasa, etc.), que catalizan la oxidación de los fenoles a su forma quinoide y estos procesos redox se pueden detectar por métodos amperométricos [72]. La obtención de biosensores requiere inmovilizar la enzima en la superficie del sustrato, siendo ésta una etapa de máxima importancia, debido a que es necesario elegir un método que permita que la enzima mantenga su funcionalidad. Si el método no es apropiado, la actividad enzimática puede reducirse o incluso puede llegar a producirse su inactivación. Como ya se ha comentado, existen varios métodos para inmovilizar las enzimas sobre soportes sólidos, que incluyen entre otros, la deposición directa de la disolución sobre un sustrato de carbono vítreo o diamante [153,154], la incorporación de la enzima en una pasta de carbono [155], o métodos más sofisticados como el screen-printing [156] o la inmovilización covalente mediante entrecruzamiento [157]. También es posible depositar

las enzimas en películas nanoestructuradas tipo películas SAM [158], películas LbL [159], o películas LB [160–162]. Estas películas permiten la adsorción enzimática en membranas lipídicas semejantes a las membranas celulares, lo cual ayuda a preservar la actividad enzimática. Por ejemplo, se ha comprobado que la peroxidasa de rábano inmovilizada en una película LB aumenta su actividad un 23% respecto a la actividad observada en disolución [163].

Por otra parte, es bien conocido que la sensibilidad de los biosensores aumenta cuando se combina la enzima con un mediador electrónico, cuya misión es facilitar la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato. En la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos de materiales que actúan como mediadores electrónicos, como son las ftalocianinas (macrociclos aromáticos) [69,122,150,151,159,164] o los polímeros conductores [149,165–169]. Asimismo, muchos nanomateriales (nanopartículas, nanotubos de carbono, grafeno, etc) tienen una marcada capacidad electrocatalítica, facilitando la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato, a la vez que tienen una alta capacidad para adsorber las enzimas generando un entorno adecuado para su inmovilización. Es decir, tienen la doble función de atrapar e inmovilizar enzimas y actuar como mediadores electrónicos [13,31,69,143,151,169–171].

En los siguientes párrafos se recogen algunos ejemplos de sensores y biosensores electroquímicos modificados químicamente con materiales usados en esta Tesis utilizados en la detección de fenoles.

Tal y como se ha argumentado en el apartado anterior, las **metaloftalocianinas** son un grupo de materiales sensibles que han sido ampliamente utilizados para la detección de fenoles gracias a sus excelentes propiedades electrocatalíticas. Entre los trabajos publicados, se pueden encontrar una amplia gama de ftalocininas coordinadas con diferentes metales centrales, normalmente metales de transición. En particular, las bisftalocianinas de lantánidos (como la bistalocianina de lutecio) han demostrado tener unas propiedades electrocatalíticas particularmente interesantes y han dado resultados excelentes como materiales sensibles para la detección de fenoles [172]. Se han desarrollado numerosos sensores electroquímicos en los que se combinan ftalocianinas con otros materiales electrocatalíticos como CNTs, o nanopartículas metálicas, habiéndose encontrado efectos sinérgicos que amplifican las señales de manera muy importante [164,173,174]. Dado el éxito de las ftalocianinas en la detección de fenoles,



estos materiales se han utilizado como material base de lenguas electrónicas para el análisis de vinos. Estos sensores se han preparado utilizando diferentes técnicas que van desde electrodos simples de pasta de carbono [175] o screen printed [176] a electrodos más sofisticados preparados mediante técnicas como Layer by Layer [151] o Langmuir-Blodgett [173], técnicas que han permitido introducir fenoloxidasas específicas para la detección de fenoles en un entorno biomimético [177]. Cabe destacar las investigaciones pioneras realizadas por nuestro grupo, en los que se han aplicado redes de sensores y lenguas electrónicas basadas en ftalocianinas al análisis de vinos en función de parámetros tales como: variedad de uva, añada de la vendimia o madurez de la uva [178], envejecimiento [179], tipo de bodega utilizada en la maduración [180], calidad de la uva [181] entre otros.

Los **nanotubos de carbono (CNTs)**, tanto de pared sencilla (SWCNT) como de pared múltiple (MWCNT) han demostrado ser unos excelentes modificadores debido a que aumentan la conductividad del sustrato y aumentan su relación superficie/volumen. Para solventar algunos problemas que surgen de la inmovilización de ciertos nanomateriales, como son los CNTs y su dificultad de dispersión en agua es recomendable su funcionalización con el fin de mejorar la transferencia electrónica y aumentar su superficie activa [171]. Pero su principal ventaja es que son extraordinarios mediadores electrónicos ya que facilitan los procesos de oxidación/reducción de fenoles y polifenoles, reduciendo el sobrepotencial, mejorando así la sensibilidad de los sensores [182,183]. El funcionamiento de los sensores basados en CNTs se puede mejorar mediante dopaje con nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos ya que se establecen efectos sinérgicos entre ambos materiales. Estas mezclas proporcionan una mayor superficie de contacto a través de la cual, se generan más interacciones o canales de transporte entre el metal y los CNTs. Un reciente trabajo corrobora la sinergia entre AuNPs y CNTs en la preparación mediante SAMs de un composite de AuNPs-CNTs, para la detección de compuestos fenólicos como el catecol, hidroquinona, fenol y p-nitrofenol en muestras acuosas [184]. También se ha evaluado la eficiencia de diferentes sensores voltamétricos basados en CNTs en la determinación del contenido polifenólico en vino tinto con el objetivo de determinar la influencia de la forma de la nanoestructura, demostrándose que los SWCNTs presentan los mejores resultados en el caso analizado [146].

En la literatura también se reporta que las **NP metálicas** presentan una alta actividad catalítica en la oxidación/reducción electroquímica de diferentes especies fenólicas. La modificación de electrodos con NPs proporciona una gran interacción química entre el electrodo y el electrolito reduciendo la resistencia interfacial. Técnicas como la electrodeposición o el autoensamblaje permiten la incorporación de una variedad de NPs metálicas y de óxidos metálicos con diferentes composiciones, tamaños y formas dando lugar a sensores altamente estables y eficientes para la determinación de compuestos fenólicos, no solo en disoluciones patrón [112,185], sino también en bebidas como el té o el vino [31]. Por otro lado, también en este caso, la combinación de NPs con otras nanoestructuras es útil para favorecer los efectos sinérgicos como los ya mencionados. Por ejemplo, se ha demostrado que la electrodeposición de un composite de Au/PdNPs y grafeno permite obtener sensores altamente eficientes para la determinación de ácido cafeico en muestras de vinos [60]. También se ha demostrado que la inclusión de AgNPs en estructuras mesoporosas, permite mejorar la sensibilidad [186].

Como ya se ha mencionado, los biosensores basados en **fenoloxidasas** tienen la ventaja de la selectividad mejorada. Se han publicado numerosos artículos en los que se han inmovilizado diferentes fenoloxidasas (tirosinasa, lacasa, etc) en la superficie de nanotubos, grafeno o nanopartículas metálicas, ya que las enzimas tienen una gran afinidad hacia estas nanoestructuras permitiendo inmovilizar los biomateriales de manera eficiente, favoreciendo la actividad catalítica sin perder la bioactividad [31,89]. Además estos nanomateriales, actúan como mediadores electrónicos que facilitan la transferencia de electrones entre la proteína y el electrodo [12]. Existen numerosos ejemplos de biosensores que combinan fenoloxidasas con nanomateriales para la detección de fenoles. Entre ellos cabe destacar la combinación de NPs metálicas con tirosinasa [153] o lacasa [187]. La combinación de dos tipos de nanomateriales, como las AuNPs con grafeno para favorecer la inmovilización de la lacasa [14,188], o de tirosinasa [189], o incluso la combinación de varios nanomateriales como MWCNTs, grafeno y AuNPs ha dado lugar a excelentes biosensores enzimáticos para la detección de fenoles [12].

Otra posibilidad para fijar las enzimas al sustrato, es la utilización de matrices poliméricas y biopolímeros como el quitosano, que ofrecen excelentes características como agentes reticulantes [133]. Se ha investigado el uso de quitosano para favorecer la inmovilización de enzimas que catalizan reacciones redox de compuestos fenólicos [190]



y se ha comprobado que la presencia de quitosano mejora la inmovilización enzimática lo que permite aumentar la superficie activa de los biosensores [191].

Además estas matrices poliméricas pueden modificarse con nanomateriales como los CNTs o CNTs decorados con AuNPs para determinar la presencia de catecol e hidroquinona simultánea en disoluciones patrón [192]. La combinación de materiales catalíticos con polímeros naturales mejora la detección electroquímica debido a la sinergia establecida entre los materiales sensibles [180,181, 182].

Sin ser exhaustivos, algunos ejemplos de los detalles de diferentes métodos voltamperométricos desarrollados en investigaciones recientes, incluidos los enfoques basados en sensores y biosensores electroquímicos modificados para la determinación de compuestos fenólicos en el vino y otras matrices alimentarias, se pueden encontrar en la Tabla 1.

Tabla 1: Sensores y biosensores electroquímicos basados en la detección de fenoles en distintas variedades de vino blanco y/o tinto.

| Composición del sensor | Técnica Electroquímica | Analito | Sensibilidad ($\mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$) | LOD (μM) | Ref. |
|------------------------------------|------------------------|-------------------------|---|-----------------------|-------|
| GCE-SnO ₂ -rGO | DPV | Ácido cafeico | 2.77 | 0.08 | [59] |
| GCE-Au/PdNPs-rG | DPV | Ácido cafeico | --- | 0.006 | [60] |
| GCE-Chi-rGO-CB | CV/DPV /EIS | Ácido cafeico | 5.96 | $3.0\cdot 10^{-5}$ | [144] |
| GCE-PLM-MWCNTs | CA/CV/DPV | Ácido gálico | --- | $5.0\cdot 10^{-4}$ | [145] |
| GCE-pirrol | CV/DPV | 4-etilfenol | --- | 0.2 | [149] |
| GCE-(CNT/PEI) | CA | Ácido cafeico | 0.027 | 0.07 | [183] |
| | | Ácido gálico | 0.029 | 0.05 | |
| | | Ácido ferúlico | 0.055 | 0.08 | |
| | | Ácido cumárico | 0.056 | 0.09 | |
| CPE-CNTs | CV/DPV | Ácido gálico | --- | 0.3 | [182] |
| ESM-AuNPs-Tyr | EIS | Ácido gálico | 0.193 | 1.707 | [31] |
| | | Ácido cafeico | 0.082 | 0.752 | |
| | | Catequina | 0.073 | 0.714 | |
| AAc-MWCNTs-Tyr PMAAn-MWCNTs-Tyr | CV | Fenol | 0.050 | --- | [13] |
| GCE-AuNPs-Tyr | CV | Fenol | 1.28 | 0.21 | [153] |
| | | Catecol | 3.02 | 0.15 | |
| | | Ácido cafeico | 0.08 | 0.66 | |
| | | Ácido clorogénico | 0.08 | 0.62 | |
| | | Ácido gálico | $6.9\cdot 10^{-4}$ | 7.0 | |
| | | Aldehído protocatehuico | $5.8\cdot 10^{-4}$ | 2.0 | |
| GCE- Ecoli-Lac | CA | Catecol | 0.215 | 0.1 | [64] |
| GCE-Lac | CA | Ácido gálico | --- | 160.0 | [194] |
| SPCE-GNPI-AuNPs-Lac | CA | Hidroquinona | 0.0029 | 1.5 | [14] |

2.2.2. Sensores y biosensores para la detección de carbohidratos

La leche es una bebida de naturaleza química compleja y su consumo es fundamental en la dieta de los humanos porque entre otros motivos, sus proteínas contienen nueve aminoácidos esenciales. Además, su ingesta previene patologías cardiovasculares como la hipertensión o determinados tipos de cáncer. Los principales constituyentes de la leche de vaca, que es la de mayor consumo e interés, son agua,



hidratos de carbono (principalmente lactosa), grasas, proteínas (caseína o suero de leche), minerales (como el calcio) y una larga lista de otros constituyentes como vitaminas o pigmentos [195].

La calidad de la leche depende de factores como la alimentación de las vacas, el THI (índice de temperatura y humedad de las granjas), la salud y la genética del ganado lechero, etc. Se pueden determinar distintos parámetros de interés en el control de calidad de la leche, entre los que se incluyen el contenido en proteínas, contenido graso, contenido en urea, presencia de antibióticos, adulterantes, carga microbiológica, niveles de ácido láctico o recuento de células somáticas (sirven para controlar el nivel de salud de las glándulas mamarias).

La evaluación de la calidad es una cuestión importante en todos los pasos de la cadena de suministro en la industria láctea, tanto en la determinación de los componentes normalmente presentes en leche, así como la evaluación de adulterantes o componentes no deseados o prohibidos, como la melamina o los antibióticos. Por ello, es necesario que los ganaderos e industrias evalúen la composición y calidad de la leche desde su obtención hasta su consumo [195]. Esto incluye el control en las etapas de producción, procesamiento, distribución y almacenamiento del producto final. Además, hay que tener en cuenta la existencia de una gran variabilidad en los productos lácteos (deshidratados, líquidos, ricos en grasas, congelados, fermentados o coagulados entre otros), sin embargo, todos tienen algo en común, deben ser nutritivos y económicos. Por este motivo, resulta imprescindible el desarrollo de dispositivos capaces de solventar de forma precisa, rápida y económica las necesidades del sector [195–198].

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas clásicas para el análisis de leches. La mayoría de ellas requieren equipos grandes y costosos, así como personal cualificado [199,200]. Además, no es posible realizar análisis *in-situ* porque éstas técnicas demandan largos períodos de preparación, análisis e interpretación de resultados. Por tanto, resulta de interés introducir el uso de sensores y biosensores electroquímicos en la industria láctea. Además, estos dispositivos son capaces de medir en muestras de leche cruda sin pretratar, a pesar de la complejidad de su composición [196]. No obstante, para conseguir buenos resultados es necesario optimizar las capacidades analíticas de los sensores, mejorando sus límites de detección y aumentando su sensibilidad.

Concretamente el uso de biosensores electroquímicos basados en el empleo de las enzimas responsables de la catálisis de los carbohidratos de interés, permite obtener

respuestas fiables en tiempos breves [201]. Por otra parte, existen investigaciones que se centran en el desarrollo de otros tipos de sensores para la detección de vitaminas [202], aditivos [203], aminoácidos [204] o antibióticos [205], entre otros componentes presentes en productos lácteos.

El principal carbohidrato presente en la leche es la lactosa (un disacárido formado por dos hexosas, la glucosa y la galactosa), aunque la mayoría de los diferentes tipos de leche contienen una pequeña cantidad de los precursores biosintéticos de ésta, la glucosa y la galactosa, en forma libre [206]. La presencia de estas especies en la leche es ocasionalmente un problema. En el caso de la glucosa, un alto consumo de azúcar en las dietas puede estar asociado a consecuencias crónicas para la salud como obesidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares, entre otras. El contenido de lactosa y galactosa en productos lácteos también puede dar lugar a problemas de salud como intolerancias o trastornos hereditarios en neonatos. Por estos motivos, la industria láctea requiere de una profunda investigación en el desarrollo de dispositivos capaces de detectar glucosa, galactosa o lactosa en productos lácteos con alta sensibilidad [207].

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se indaga en el análisis de glucosa, galactosa y lactosa en distintas variedades de leche, mediante el empleo de biosensores electroquímicos. Estos dispositivos utilizan enzimas comerciales cuyo mecanismo consiste en la actuación de la enzima como catalizador de la reacción de oxidación de los azúcares correspondientes.

A modo de descripción general, la detección de galactosa se realiza utilizando como enzima la galactosa oxidasa que cataliza la oxidación de galactosa en ácido galactónico y H_2O_2 . La detección de glucosa se lleva a cabo utilizando la glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de glucosa en ácido glucónico y H_2O_2 . Durante estos procesos, las enzimas pasan a su estado reducido. La actividad enzimática se recupera gracias a la reacción de la enzima reducida con el oxígeno circundante para restaurar su estado de oxidación original [208,209]. En cuanto a la lactosa, no existen enzimas específicas para su oxidación, por lo que la detección de lactosa con biosensores requiere un cambio de estrategia. En este caso se utiliza una hidrolasa, la β -galactosidasa (o lactasa) que rompe el enlace glicosídico entre la glucosa y la galactosa. De tal modo que, el biosensor de β -galactosidasa se combina con biosensores que contienen glucosa oxidasa, galactosa oxidasa o ambas para detectar los productos de la hidrólisis [208]. Estos biosensores de β -galactosidasa, glucosa oxidasa y galactosa oxidasa pueden utilizarse por separado o en



sistemas multienzimáticos en los que las enzimas se combinan en un solo dispositivo, de modo que es posible detectar tanto la glucosa y galactosa presentes directamente en leche, así como la glucosa y galactosa resultantes de la hidrólisis de la lactosa.

Los métodos de detección de galactosa o glucosa en leche y sus derivados basados en biosensores han progresado a lo largo del tiempo pasando por las tres generaciones existentes, en función del mecanismo de transferencia electrónica que se expusieron anteriormente y ahora se explican de forma específica. Los sensores de primera generación miden la concentración de glucosa o galactosa detectando bien la liberación de H₂O₂ que acompaña la oxidación de los azúcares o bien el consumo de oxígeno (necesario para que la enzima vuelva a su estado de oxidación original). Los primeros sensores se realizaron inmovilizando enzimas en electrodos de Clark [210] o electrodos de platino [211,212]. Desde que se introdujeron los primeros biosensores de primera generación diseñados para la detección de carbohidratos, se han realizado múltiples investigaciones para mejorar el sistema de control basados en métodos más sofisticados [213].

Los sensores de segunda generación consisten en la introducción de mediadores electrónicos, cuya misión es facilitar la transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo, amplificando así la señal enzimática. Estos mediadores pueden encontrarse en disolución, donde se ha constatado que favorecen la reacción enzimática [214]. Sin embargo, actualmente se ha demostrado que las capacidades analíticas de los biosensores se ven altamente mejoradas cuando los mediadores electrónicos forman parte de la estructura del sensor [10]. Algunos ejemplos de mediadores electrónicos utilizados para aumentar la respuesta electroquímica de los biosensores basados en glucosa oxidasa o galactosa oxidasa incluyen: nanomateriales de carbono como grafeno o CNTs [66,215], NPs metálicas o de óxidos metálicos [21,57,216], metalomacrociclos aromáticos como las MPCs [15], polímeros conductores [123] o biopolímeros [63,129,207,217]. Entre los ejemplos aquí citados, en algunas ocasiones surge la necesidad de utilizar un agente dispersante para favorecer la adsorción de los nanomateriales en la superficie del electrodo y además favorecer la adsorción enzimática [215]. Por otro lado, se han demostrado los beneficios que originan los efectos sinérgicos producidos tras la combinación de varios materiales, facilitado la transferencia electrónica, mejorando así la sensibilidad del sensor [16]. Entre la gran cantidad de investigaciones que siguen esta estrategia, podría ponerse como ejemplo, el desarrollo de biosensores sobre GCE

modificados con un nanomaterial híbrido compuesto por AuNPs y MWCNTs aprovechando sus efectos sinérgicos en la detección catalítica del H_2O_2 tras la inmovilización de la glucosa oxidasa obteniendo excelentes resultados con elevada reproducibilidad y precisión [218,219]. De la misma manera, la combinación de otros materiales como grafeno, polímeros conductores y AuNPs ha permitido inmovilizar enzimas como la glucosa oxidasa mediante adsorción física, donde mediante métodos amperométricos, se ha cuantificado el consumo de oxígeno [220]. Ejemplos como los citados, manifiestan la gran variedad de este tipo de biosensores, en cuanto a naturaleza del mediador o técnicas de preparación, así como a métodos de medida, en los que la técnica de detección electroquímica puede variar de acuerdo a las necesidades del dispositivo.

Los biosensores de tercera generación utilizan enzimas que son capaces de establecer una transferencia directa de electrones (DET) entre su cofactor y la superficie del electrodo, sin necesidad de utilizar ninguna sustancia mediadora. Conseguir DET es difícil ya que la mayoría de las enzimas tienen el centro activo profundamente enterrado, y además no disponen de una vía de transferencia de electrones integrada que lo interconecte con la superficie de la proteína [9,101]. En el caso de la glucosa oxidasa y la galactosa oxidasa, la transferencia directa de electrones entre la enzima y electrodos convencionales (platino, ITO, carbono, etc) es extremadamente difícil, ya que el sitio activo redox de las enzimas, el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) (en el caso de la glucosa oxidasa), o centro multi-cobre (en el caso de la galactosa oxidasa), está embebido dentro de las matrices enzimáticas. Es por este motivo que, para facilitar la transferencia electrónica directa, se hace imprescindible la modificación de la superficie de los electrodos con nanomateriales. A pesar de las grandes ventajas analíticas que ofrece el desarrollo de biosensores de tercera generación en la detección de glucosa o galactosa en matrices complejas, solo unos pocos autores han conseguido determinar glucosa o galactosa utilizando DET [66,221]. Estos trabajos ponen de manifiesto la importancia de encontrar el efecto sinérgico adecuado que, al fusionar las propiedades de transporte de electrones de nanomateriales como el grafeno, CNTs o nanopartículas, con la especificidad proporcionada por la enzima, se pueden obtener muy bajos límites de detección en la detección de éstos azúcares. Para asegurar los mecanismos DET mediante técnicas como voltamperometría cíclica, han de apreciarse los picos redox asociados con la reacción del centro activo enzimático. Concretamente, se ha determinado que en el caso



de la glucosa oxidasa, el pico catódico en torno a -0.4 V se asigna a la conversión de FAD a FADH₂, mientras que el pico anódico en torno a -0.3 V se atribuye a la conversión de FADH₂ a FAD [66,222–224].

Mientras que en el caso de los sensores de galactosa oxidasa, el potencial del pico anódico observado a aproximadamente 0.2 V y el potencial del pico catódico en torno a 0.1 V, se corresponden con los mecanismos del par redox del centro activo de la enzima (Cu²⁺/Cu⁺), lo que indica la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo modificado con nanomateriales, debido a que estos últimos consiguen disminuir la distancia entre el centro activo de la enzima y el electrodo y, por lo tanto, aceleran la transferencia de electrones [221,225,226].

Hasta ahora, se ha profundizado en el análisis de glucosa y galactosa. Por su parte la lactosa, es uno de los principales carbohidratos presentes en la leche. Por tanto, el contenido en lactosa, es un indicador básico en controles rutinarios. Además es una fuente de problemas en las personas con intolerancias alimentarias [198]. La determinación de lactosa por vía enzimática se puede llevar a cabo siguiendo diferentes estrategias. Por una parte, usando biosensores enzimáticos electroquímicos basados en la inmovilización de enzimas como la β -galactosidasa (comúnmente conocida como lactasa) o la celobiosa deshidrogenasa, que son capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos entre la glucosa y la galactosa. En este caso, los sensores detectan cambios en la composición de la disolución y esto da lugar a variaciones de la corriente de fondo que produce el sensor. Estos sensores son sencillos, pero bastante inespecíficos, ya que los cambios de composición pueden deberse a diferentes factores [101,208]. Por esta razón, se han desarrollado biosensores capaces de cuantificar lactosa por un método indirecto que consiste en utilizar sistemas multienzimáticos en cascada, en los que la β -galactosidasa promueve la hidrólisis de la lactosa en sus componentes, glucosa y galactosa, y posteriormente se analizan los productos de la hidrólisis, gracias a la actuación de las oxidorreductasas correspondientes, que catalizan la oxidación de la glucosa y galactosa obtenidas [53].

Al igual que en el resto de casos, el mecanismo de actuación de los biosensores electroquímicos enzimáticos para la determinación de lactosa ha progresado a lo largo de tres generaciones. Existe una gran cantidad de investigaciones que mediante sistemas

enzimáticos de primera generación son capaces de detectar los productos de hidrólisis de la lactosa en rangos de detección del orden milimolar en productos lácteos [208].

En cuanto a los biosensores de segunda generación para la detección de lactosa, el mecanismo de actuación consiste, por norma general, en una reacción enzimática en cascada basado en la inmovilización de la β -galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa produciendo glucosa y galactosa, y la posterior actuación de la glucosa oxidasa o la galactosa oxidasa. Se han empleado distintos tipos de mediadores redox artificiales como azul de Prusia y polímeros conductores [124] o nanomateriales de carbono [227], capaces de mejorar los mecanismos de transferencia de electrones entre la glucosa oxidasa o la galactosa oxidasa y la superficie del electrodo y se continúa detectando el H_2O_2 generado o cualquier otro subproducto de la reacción.

En el caso de la lactosa, solo se ha conseguido DET utilizando celobiosa deshidrogenasa gracias a la presencia de dos dominios redox en su interior. Esta enzima normalmente cataliza los procesos de degradación de la celulosa, no obstante, se ha demostrado su actividad catalítica en la degradación de carbohidratos como la lactosa. Sin embargo, los mecanismos son complejos y presentan numerosas dificultades [228].

En resumen, los trabajos comentados, indican la posibilidad de detectar lactosa, glucosa, galactosa u otros azúcares en muestras complejas como la leche y derivados con biosensores muy diferentes. Algunas de las investigaciones recientes basadas en la detección de carbohidratos en productos lácteos utilizando diferentes técnicas electroquímicas tanto en la deposición de materiales como en la propia determinación de analitos, se resumen en la Tabla 2.



Tabla 2: Sensores y biosensores electroquímicos basados en la detección de carbohidratos en distintas variedades de leche.

| Composición del sensor | Técnica Electroquímica | Analito | Sensibilidad ($\mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$) | LOD (μM) | Ref. |
|--|------------------------|-----------|---|-----------------------|-------|
| CPE-rG-CuNPs | CV/CA | Manitol | 0.0975 | 0.29 | [57] |
| | | Sacarosa | 0.1247 | 0.42 | |
| | | Lactosa | 0.1320 | 0.43 | |
| | | Glucosa | 0.1033 | 0.37 | |
| | | Fructosa | 0.1158 | 0.51 | |
| Au-[VO(acac) ₂]-PATP | CA | Glucosa | $3.72\cdot 10^{-3}$ | 0.1 | [62] |
| GCE-Ni(OH) ₂ /rGO-MWCNTs | CA | Glucosa | 2.042 | 2.7 | [61] |
| grafito-PFLA-MWCNT-ZnPc-GOx | CA | Glucosa | $3.78\cdot 10^{-3}$ | 18.0 | [15] |
| SPCE-MXene-PANI-Pt-LOx | CV/CA | Lactato | $6.2\cdot 10^{-4}$ | 5.0 | [54] |
| ITO-(GPDDA/GPSS) ₁ /(GPDDA-GOx) ₂ | CA | Glucosa | $2.47\cdot 10^{-3}$ | 13.4 | [66] |
| ITO-P3HT/SA/GaOx | CA | Galactosa | --- | $5.5\cdot 10^{-4}$ | [129] |
| GCE-MWCNTs-BCS/Cu-GOx | CA | Glucosa | 0.0477 | 2.0 | [215] |
| ITO-TiO ₂ -AuNPs-g-C ₃ N ₄ -MnO ₂ -GOx-β-gal | fotoelectroquímico | Glucosa | $7.31\cdot 10^{-5}$ | 0.12 | [216] |
| | | Lactosa | $7.88\cdot 10^{-5}$ | 0.23 | |
| GCE-MWCNTs-PEI/AuNPs-B(OH) ₂ -GOx | CV/CA | Glucosa | $3.26\cdot 10^{-3}$ | 0.8 | [218] |
| rG /PFLO/AuNPs-GOx | CA | Glucosa | $3.85\cdot 10^{-4}$ | 81.0 | [220] |

2.3. Sistemas multisensores. Lenguas electrónicas

Según la IUPAC, una lengua electrónica (LE) se define como un instrumento analítico que incluye una red de sensores químicos no selectivos con especificidad parcial para diferentes componentes, que funciona de forma conjunta con un software de reconocimiento de patrones, capaz de reconocer, discriminar y clasificar soluciones simples y complejas [229]. Las lenguas electrónicas tienen aplicación en la industria alimentaria como alternativa a técnicas analíticas tradicionales. Por ello, resultan ser una opción útil ya que permiten realizar una evaluación rápida de la calidad de los analitos [102,230].

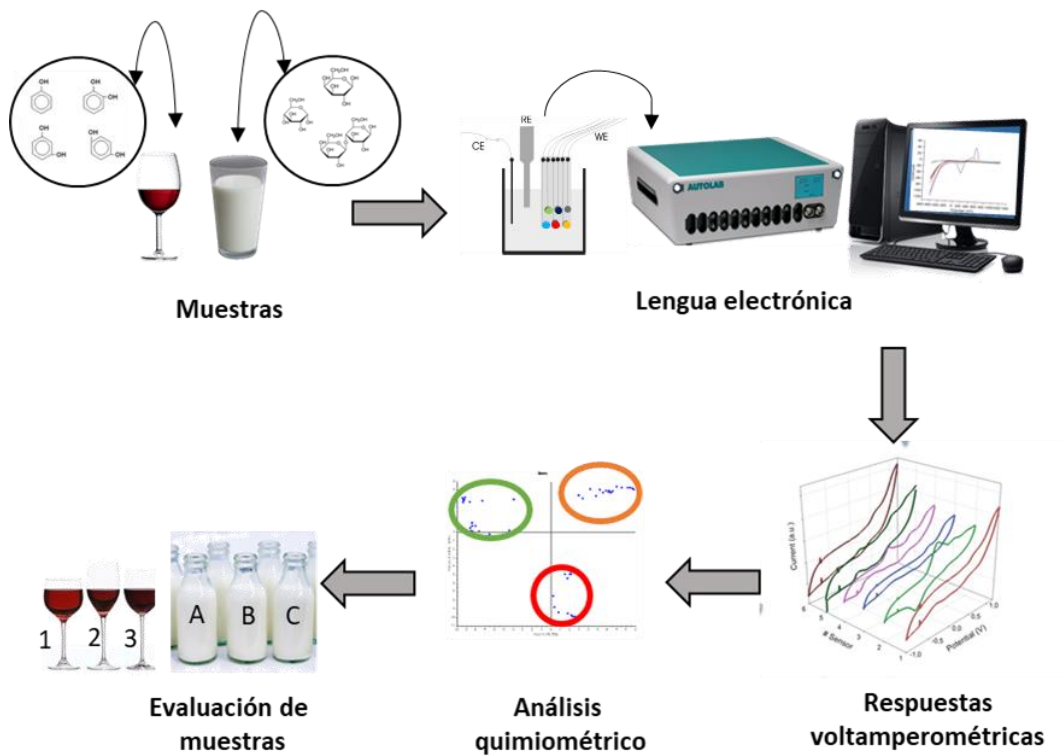


Figura 4. Representación esquemática de una lengua electrónica.

En los últimos años, se han realizado numerosos avances en el campo de lenguas electrónicas para el análisis de alimentos y bebidas tanto en lo referente a los sensores como en el campo del tratamiento de datos [230,231]. Así, mediante la adecuada selección de sensores y técnicas quimiométricas, se ha conseguido diseñar dispositivos con una elevada capacidad para discriminar, analizar y clasificar muestras complejas como vinos o leches.



En cuanto a los avances en el campo de los sensores, los sensores electroquímicos (potenciométricos, amperométricos, voltamétricos o impedimétricos) son las unidades de detección más utilizadas para el análisis de alimentos [102,230].

Los trabajos pioneros utilizaban redes de sensores potenciométricos basados en membranas poliméricas de diferentes composiciones [232]. Recientemente, se han desarrollado una gran variedad de redes de sensores potenciométricos que incluyen nanomateriales como el grafeno o las nanopartículas metálicas en las membranas. También se han desarrollado sensores del tipo ISFET que han permitido miniaturizar las lenguas electrónicas mejorando su portabilidad [233]. En cuanto a las lenguas electrónicas basadas en sensores voltamperométricos e impedimétricos, se han realizado numerosos progresos utilizando electrodos químicamente modificados con una gran variedad de materiales electrocatalíticos como ftalocianinas o polímeros conductores [148,169,181,234]. Los mayores avances en este campo también se han realizado incorporando en las redes de sensores nanomateriales como materiales modificadores. Se ha demostrado que los nanotubos de carbono, el grafeno, o las nanopartículas metálicas, tienen unas excelentes propiedades electrocatalíticas que permiten mejorar la sensibilidad de los sensores de manera muy eficiente [235,236].

Por otra parte, se ha comprobado que, para mejorar las prestaciones de las lenguas electrónicas, es necesario desarrollar instrumentos para una aplicación concreta debido a las grandes diferencias que existen en la composición de las matrices a analizar (como el vino o la leche), así como a los diferentes problemas que hay que afrontar durante el análisis (como la presencia de etanol en el vino o de grasa en la leche). Por esta razón, en los últimos años se han desarrollado lenguas bioelectrónicas (bioLEs) que combinan sensores no específicos con biosensores específicos hacia ciertos compuestos químicos. Estas lenguas bioelectrónicas, proporcionan simultáneamente información global de la muestra (tal y como hacen las lenguas electrónicas clásicas), a la vez que proporcionan información específica sobre los compuestos diana de los biosensores incluidos en la red. Estos dispositivos tienen por tanto, la ventaja de cuantificar parámetros químicos concretos mediante la elección adecuada tanto de biosensores como de técnicas quimiométricas [237,238].

En este sentido, el grupo en el que se ha desarrollado esta Tesis, tiene experiencia en el desarrollo de bioLE para el análisis de vinos y mostos que combinan fenoloxidasas

y glucosa oxidasa con nanomateriales. Estos sistemas han demostrado tener una alta capacidad de discriminación entre muestras con diferentes características, a la vez que son capaces de determinar múltiples parámetros químicos (pH, contenido polifenólico total, glucosa, etc) de manera simultánea [234,239].

El desarrollo de sistemas multisensores formados por diferentes combinaciones de enzimas y nanomateriales es un campo de investigación muy activo y es en el que se encuadra esta Tesis.

Como ya se ha comentado, una lengua electrónica consiste en una red de sensores acoplada a un sistema de tratamiento de datos multivariante. Las matrices de datos que se generan son muy complejas, contienen una gran cantidad de datos que han de ser simplificados para poder extraer la información útil del resto de datos superfluos, que no proporcionan información representativa de las muestras analizadas. Por esta razón, antes de realizar el tratamiento de datos propiamente dicho, se realiza un pre-procesado de los datos. En esta etapa se realizan procesos como el normalizado y/o escalado de la matriz de datos original para maximizar las variaciones más relevantes obtenidas mediante el sistema multisensor, así como la detección y eliminación de valores atípicos “outliers” y/o ruido. En algunos casos, la cantidad de datos obtenidos con los sensores es muy alta, lo que hace necesario reducir el número de variables. Existen varias técnicas para reducir el número de datos de la matriz sin perder información útil, como por ejemplo la utilización de kernels, algoritmos genéticos (GA), transformación por wavelet o por transformada de Fourier [143,240].

Una vez pre-procesada la señal, se emplean métodos estadísticos para realizar una reducción dimensional de variables. Gracias a ello, se reduce el número de variables iniciales y se generan nuevas variables latentes representativas de la varianza del sistema, reduciendo sus dimensiones para facilitar la identificación o clasificación de las muestras. Entre las técnicas más comunes empleadas en la reducción dimensional destacan métodos no supervisados como la utilización del Análisis de Componentes Principales (PCA), que permite discriminar entre muestras con distintas características. No obstante, los modelos de clasificación también pueden construirse utilizando técnicas supervisadas como es el análisis discriminante lineal (LDA), el modelado independiente de analogía de clases (SIMCA) o las redes neuronales artificiales (ANN), entre otras, capaces de resolver el problema de identificar una muestra desconocida y asignarla a un determinado conjunto



de muestras categorizadas previamente [241]. La reducción dimensional de los datos conseguida, se puede utilizar además con fines de predicción y/o regresión. En este sentido, las respuestas obtenidas por la red de sensores se representan mediante variables independientes frente a un segundo conjunto de variables (como son los parámetros físico-químicos de las muestras), para establecer modelos de regresión con el objetivo de predecir diferentes propiedades o parámetros físico-químicos. Los modelos más comunes establecidos para realizar este análisis son: mínimos cuadrados parciales (PLS), regresión de componentes principales (PCR), regresión de máquinas de vectores de soporte (SVMR) y regresión múltiple lineal (MLR) entre otros [242].

En los siguientes párrafos se recogen algunos ejemplos de redes de sensores y biosensores electroquímicos modificados químicamente para el análisis de muestras de vino y leche. Se presta especial atención a la importancia que tiene la modificación de la superficie de los electrodos con diferentes materiales sensibles en el funcionamiento y capacidades de los sistemas multisensores.

2.3.1. Lenguas electrónicas en la industria vitivinícola

Durante el proceso de elaboración del vino, se requiere un control exhaustivo de todas las etapas para, de ese modo, poder garantizar la calidad del producto final. A pesar de la gran complejidad que presenta la composición química de los vinos, estos dispositivos han permitido discriminar y clasificar vinos en función de factores como la variedad, origen y estado de madurez de la uva, las reacciones que se producen durante el proceso de vinificación, el tratamiento post-fermentativo, la crianza del vino y la calidad del producto final, así como la identificación de la marca o la detección de adulteraciones [148,180,243].

A continuación se realiza una revisión de los trabajos realizados con lenguas electrónicas aplicadas en las distintas etapas del proceso de elaboración del vino desde el control de las uvas de origen, pasando por la preparación de los mostos, fermentación, envejecimiento hasta el embotellado de los vinos [244].

La calidad de la uva es un factor fundamental que determina la calidad del vino. Por este motivo, los controles rutinarios en la industria vitivinícola, comienzan por el análisis de las uvas, siendo parámetros fundamentales para el control de su calidad el contenido en azúcar y en polifenoles [20,230]. Estos parámetros se analizan normalmente por métodos químicos tradicionales. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado

lenguas electrónicas o bioelectrónicas aplicadas al control de la calidad de las uvas. Concretamente, se han usado diferentes tipos de lenguas electrónicas que incluyen lenguas potenciométricas [245] o voltamperométricas [88] para monitorizar su estado de madurez. Asimismo, se ha estudiado la calidad de uvas mediante la combinación de una lengua electrónica con un ojo electrónico, lo que permite analizar a la vez, el contenido polifenólico desde un punto de vista electroquímico y espectrofotométrico [246]. También, se han desarrollado métodos alternativos para monitorizar la madurez fenólica de las uvas, modificando electrodos con las propias pieles de uvas para obtener información sobre su contenido fenólico mediante técnicas voltamperométricas. Estos sensores han sido capaces de discriminar en función de la variedad y maduración de las uvas desde el envero hasta la cosecha, obteniéndose además muy buenas correlaciones con los valores químicos obtenidos por métodos clásicos [247].

Los trabajos más recientes y novedosos en este campo están relacionados con el desarrollo de lenguas electrónicas compuestas por redes de sensores y/o biosensores electroquímicos nanoestructurados. Como se ha descrito, estos dispositivos han permitido discriminar uvas en función del grado de madurez, la añada y la variedad de uva [178,181,248]. De este modo, ha sido posible monitorizar el grado de madurez de las uvas a partir de la concentración de azúcares y el contenido fenólico, mediante la modificación de las redes de sensores con nanomateriales como las NPs de óxidos metálicos, obteniendo límites de detección extremadamente bajos [88].

De la misma manera, la inclusión de fenoloxidasas, hace de las lenguas electrónicas, dispositivos capaces de discriminar en función del estado de las uvas según su grado de madurez [178]. Gracias a las lenguas bioelectrónicas que incluyen fenoloxidasas y glucosa oxidasa combinadas con AuNPs ha sido posible establecer correlaciones entre las señales de los sensores que forman la red y los datos del contenido fenólico y de azúcares, obtenidos mediante análisis químicos tradicionales. Esto ha permitido realizar una calibración capaz de predecir el contenido fenólico y de glucosa de las uvas en una sola medida. Además, estos sistemas brindan la posibilidad de establecer correlaciones entre las características de las uvas y las de los vinos elaborados a partir de ellas [234].

El vino, es el resultado de la fermentación del zumo de uva o de los mostos. Por ello, una vez evaluadas las características de las uvas, la siguiente etapa en el control de calidad, es el control de los procesos de fermentación. En el vino tinto, la fermentación



consta de dos etapas, la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica. En la primera se transforma la glucosa en etanol, mientras que en la segunda el ácido málico se transforma en ácido láctico. Existen diversas investigaciones en las que se han desarrollado lenguas electrónicas para monitorizar los procesos de fermentación de los vinos [249–251]. Algunos autores, han combinado lenguas electrónicas y narices electrónicas con medidas ópticas para establecer correlaciones entre mostos con distintos grados de fermentación [251] .

Una vez se ha llevado a cabo el proceso fermentativo del vino, la siguiente etapa, consiste en la maduración y envejecimiento del producto. Para mejorar sus características organolépticas, los vinos tintos son envejecidos en barricas de roble o utilizando astillas de madera en depósitos de acero inoxidable microoxigenados, antes de ser embotellados [230,232]. Por ello, el tiempo de envejecimiento, así como el tipo de barrica y su grado de porosidad son factores cruciales en la calidad del vino. Concretamente, las características organolépticas del vino están directamente relacionadas con la retención y liberación de compuestos volátiles durante el proceso de envejecimiento. Por este motivo, se han desarrollado lenguas electrónicas voltamperométricas capaces de monitorizar el envejecimiento de los vinos, y de clasificar y discriminar entre vinos en función de su grado de envejecimiento y tipo de barrica [180,252–254]. Entre ellos, algunos autores han puesto de manifiesto que la modificación de lenguas electrónicas con materiales electrocatalíticos como las bisftalocianinas, mejora la respuesta electroquímica frente a vinos [179,253].

Tras la evaluación de los procesos de envejecimiento del vino en barrica, es necesaria la revisión de la calidad de los vinos después de su embotellado. El empleo de lenguas electrónicas ha resultado muy útil para controlar los orígenes geográficos, variedades de vino, el año de cosecha, etc. [181,255–257]. Por otra parte, prácticas ilegales como la dilución con agua, la adición de sustancias exógenas (alcohol, azúcares, conservantes, colorantes), el uso de uvas de regiones diferentes a las declaradas o el uso de métodos de crianza no permitidos, que se realizan con el fin de reducir costes [148,258] hace necesario confirmar la veracidad de la información declarada en la etiqueta a los consumidores y las autoridades. Con este fin, los sistemas multisensores electroquímicos se han usado con éxito para detectar adulteraciones [232]. Por ejemplo, el empleo de redes de sensores basados en CPEs modificados con ftalocianinas y polímeros conductores ha

sido de gran utilidad para determinar adulterantes como etanol, SO₂, acetaldehído, sacarosa, ácido acético, tartárico o tánico en vino tinto [148].

En conclusión, la aplicación de las lenguas electrónicas en controles de calidad, permite obtener información cualitativa sobre la muestra y además permite predecir la concentración de determinados compuestos químicos o detectar determinadas características organolépticas. Debido a sus excelentes respuestas, resultan adecuadas para controlar todo el proceso de elaboración del vino desde la cosecha hasta el envejecimiento. Como se ha expuesto, las estrategias futuras pretenden incluir el diseño de redes de sensores o biosensores formadas por nuevos materiales con selectividad y sensibilidad mejoradas, en muchos casos vinculados a la nanotecnología.

2.3.2. Lenguas electrónicas en la industria láctea

La leche es un producto complejo en el que coexiste un medio acuoso con una alta proporción de grasas además de proteínas y otros componentes. La alta concentración de grasas dificulta enormemente los análisis, ya que su presencia interfiere en muchas técnicas analíticas. Además, la calidad de la leche se altera rápidamente debido a diferentes fenómenos como la oxidación de ácidos grasos o la evaporación de compuestos volátiles además del crecimiento microbiano, que podrían afectar a la calidad del producto [244].

A pesar de estas dificultades, en los últimos años se han desarrollado lenguas electrónicas capaces de analizar la calidad de productos lácteos. La tarea no es fácil ya que la presencia de grasa altera la superficie de los sensores, y obliga a extremar los procesos de limpieza entre medidas. La complejidad del medio también limita el tipo de sensores a utilizar en la red y por esta razón, la mayoría de trabajos en este campo se han realizado utilizando redes de sensores potenciométricos, aunque también existen precedentes de éxito en los que se han utilizado lenguas electrónicas voltamperométricas. La aplicación de lenguas electrónicas permite determinar las diferencias en la composición de la leche según el origen animal [259], las tecnologías de procesamiento aplicadas durante la producción de leche [260], la marca [261,262], el contenido graso [263–265] o el tiempo de almacenamiento [263]. 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 [266,267]. Los resultados obtenidos muestran que, a pesar de la



complejidad de los productos lácteos, es posible categorizar y analizar muestras de manera muy eficiente.

En los siguientes párrafos se detallan los trabajos realizados en los que se han aplicado lenguas electrónicas al análisis de diferentes aspectos de la calidad de la leche.

En un trabajo pionero en el campo, se desarrolló una LE potenciométrica basada en sensores compuestos por membranas poliméricas lipídicas, con la que fue posible diferenciar sabores como salinidad, amargor o acidez [268]. Utilizando el mismo tipo de LE, se ha estudiado el sabor en distintos tipos de muestras de leche (UHT o cruda) expuestas a diferentes condiciones [269,270].

La clasificación de la leche también puede variar en función de su origen. Es por este motivo que varios trabajos han demostrado la capacidad de las lenguas electrónicas en el análisis cualitativo para diferenciar y discriminar entre productos lácteos de distinta procedencia. Para ello se han diseñado lenguas potenciométricas [241,261,271] y voltamétricas [272] e incluso se han combinado con narices electrónicas [262]. Así mismo cabe destacar la capacidad de estos dispositivos en la discriminación de leche de origen vegetal [273].

Otra de las características más destacables de la leche, es su contenido graso. La industria láctea ofrece diferentes variedades de leche alterando el nivel de grasa, para obtener leche sin grasa o leche reducida en grasa, mediante la eliminación total de la grasa de la leche y la posterior adición de la cantidad requerida. Así mismo, el contenido en materia grasa también puede verse alterado tras la modificación genética de las vacas y la cría selectiva [196,244]. A lo largo de los años se ha avanzado en el desarrollo de dispositivos potenciométricos portátiles capaces de discriminar entre leches, en función de su contenido graso, nutricional o por su marca. Estos trabajos demuestran la capacidad de los dispositivos para predecir la calidad de la leche y proporcionar información sobre su composición química [272,274].

La composición química de la leche puede variar con el tiempo debido a la presencia de microorganismos. Para evaluar dichas variaciones, se hace necesaria la caracterización objetiva de su presencia en la leche [244]. En uno de los trabajos pioneros en el campo de las lenguas electrónicas, se desarrolló una LE voltamperométrica para el análisis del proceso de envejecimiento en zumos de frutas y leche, evaluando el deterioro

de su calidad, debido al crecimiento microbiano cuando la leche se almacenaba a temperatura ambiente [275]. Continuando con la misma línea de trabajo, un estudio subsiguiente permitió desarrollar una LE voltamperométrica para la determinación de bacterias en leche fresca durante su almacenamiento [212]. Un trabajo más reciente, en el que se usaron electrodos serigrafados, permitió discriminar entre diferentes muestras de productos lácteos en presencia y ausencia de colonias bacterianas [276]. Con ello fue posible determinar la estabilidad de almacenamiento de la leche, que es inversamente proporcional a la cantidad de su población microbiana. En investigaciones posteriores, cabe destacar trabajos en los que se ha podido clasificar leche fermentada probiótica según el sabor mediante LEs potenciométricas [277,278].

Del mismo modo, se han desarrollado lenguas voltamperométricas con las que se han detectado adulteraciones con urea, formaldehído o melamina [266,267] en productos lácteos, así como adulteraciones con H₂O₂ en muestras de leche pasteurizada [279]. También, se han diseñado lenguas electrónicas potenciométricas, que por ejemplo, han sido capaces de detectar adulteraciones de leche de cabra con leche bovina, permitiendo distinguir entre los grupos de leche de cabra, vaca y mezcla, con alta sensibilidad y especificidad [259].

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas en la industria para la conservación de productos lácteos y potenciación de su sabor, consiste en su fermentación a través de diversas bacterias del ácido láctico. Las leches fermentadas poseen propiedades características como son el sabor, olor, color, apariencia y textura y, por tanto, características nutricionales diferentes. La problemática que surge al trabajar con microorganismos, tal y como se ha explicado, es que pequeñas alteraciones pueden modificar la calidad del producto final [280].

Una lengua electrónica basada en electrodos metálicos ha permitido diferenciar el estado de fermentación y la naturaleza de los microorganismos [281]. También el desarrollo de lenguas voltamperométricas ha demostrado la capacidad de reconocimiento satisfactoria para la predicción de diferentes categorías de yogur, estableciendo buenas correlaciones con las propiedades físicas de las muestras [282]. Por otro lado, se han evaluado las propiedades organolépticas de muestras de leche fermentadas mediante la determinación simultánea de contenido de etanol, acetaldehído, ácido láctico, ácido



acético y ácido cítrico en la leche mediante una LE basada en sensores potenciométricos [277]. La misma LE, también se ha aplicado para la clasificación de yogures [261].

En resumen, el empleo de dispositivos multisensores ha permitido obtener información cualitativa y cuantitativa muy útil sobre muestras extremadamente complejas como son los productos lácteos. La mayoría de los estudios aquí presentados han desarrollado distintos prototipos de LE capaces de evaluar la frescura de la leche o el crecimiento microbiano, así como realizar estudios de control de calidad y detección de adulteraciones con gran precisión. Estos trabajos han puesto de manifiesto las capacidades de dichos dispositivos para trabajar *in-situ* en la industria alimentaria, reemplazando o al menos complementado técnicas de análisis clásico. Sin embargo, la aplicación directa de LEs en la industria láctea aún sigue siendo un desafío. Superar estos desafíos en el desarrollo de LEs que además sean robustas, estables y sensibles, podría solventarse mediante el uso de nuevos materiales, tal como los nanomateriales, que permitan ampliar las capacidades de los dispositivos desarrollados [238].

Capítulo 3

Resultados

Este capítulo se divide en tres bloques que recogen las investigaciones desarrolladas a lo largo de esta Tesis Doctoral. En cada bloque se presenta una breve introducción que argumenta la motivación de la investigación, así como los objetivos perseguidos. Además, se presenta una síntesis de los puntos clave de los trabajos desarrollados. Finalmente se muestran los artículos publicados en distintas revistas indexadas internacionales.

**El primer bloque muestra tres artículos en los que se han diseñado biosensores voltamétricos basados en la técnica de LbL para la detección de compuestos de interés en la industria alimentaria. Estos trabajos han permitido desarrollar una lengua bioelectrónica que se ha aplicado con éxito en muestras de interés industrial. A tal efecto, se describen los resultados más relevantes obtenidos durante las investigaciones.*

**El segundo bloque recoge dos artículos, cuya temática común es la utilización de nanopartículas de plata (AgNPs) y nanohilos de plata (AgNWs) como mediadores electrónicos para la detección de antioxidantes y azúcares. Se indaga sobre la influencia de la relación de aspecto en los mecanismos de detección. Asimismo, se describe el desarrollo de dos lenguas bioelectrónicas cuya aplicación práctica será explorada.*

**El tercer bloque recoge la información relativa a los dos trabajos desarrollados durante la estancia internacional y la subsiguiente colaboración que surgió a raíz de la misma. Se exponen dos investigaciones paralelas fundamentadas en el desarrollo de sensores basados en polímeros de impresión molecular (MIPs) para la detección de compuestos fenólicos.*

This chapter is divided into three sections that collect the research developed throughout this Doctoral Thesis. In each section, a brief introduction stating the motivation of the research, as well as the objectives pursued, is presented. Finally, the articles published in different international indexed journals are shown.

**The first section shows three articles in which voltammetric biosensors based on the LbL technique, have been designed for the detection of compounds of interest in the food industry. These works have allowed the development of a bioelectronic tongue that has been successfully applied in samples of industrial interest. To this end, the most relevant results obtained during the investigations are described.*

**The second section includes two articles, whose common theme is the use of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) as electronic mediators for the detection of antioxidants and sugars. The influence of the aspect ratio on the detection mechanisms is investigated. Likewise, the development of two bioelectronic tongues, whose practical application will be explored, is described.*

**The third section collects the information related to the two works developed during the international stay and the subsequent collaboration that arose as a result of the stay. Two parallel investigations based on the development of sensors based on molecular imprinted polymers (MIPs) for the detection of phenolic compounds are presented. In addition, a synthesis of the key points of the developed works is presented.*



3.1. Biosensores electroquímicos basados en LbL. Efectos sinérgicos

Este bloque engloba tres artículos publicados en distintas revistas internacionales. En ellos se presentan los resultados de dos líneas de investigación, una básica, en la que se ha indagado en las propiedades analíticas de los sensores desarrollados y sus características, en función de su composición y estructura, y una línea aplicada, en la que se ha desarrollado una bioLE, basada en dichos sensores, para el análisis de muestras complejas.

Como se ha desarrollado a lo largo de la parte teórica, una posibilidad para mejorar las prestaciones de los sensores, es modificar la superficie de los electrodos con películas nanoestructuradas que permitan aumentar su relación superficie/volumen y, por tanto, el número de sitios activos accesibles. Por otra parte, el control del espesor de las películas (normalmente del orden nanométrico), favorece la reversibilidad de los procesos electroquímicos que ocurren en el interior de la película. Existen diversas técnicas para preparar películas nanoestructuradas, tal y como se describe en el apartado 2.2.4., entre ellas destacan técnicas como SAM, LB, o la técnica LbL. Por otra parte, los materiales seleccionados para modificar la superficie del electrodo deben ser capaces de interactuar con el analito de modo que en el análisis voltamétrico se produzca un incremento de la señal (aumento de la intensidad) y/o se mejore la reversibilidad de la respuesta.

En estos trabajos, se ha decidido utilizar la técnica LbL que permite preparar monocapas alternas de compuestos con carga opuesta de forma simple y con bajo coste. Esta técnica además tiene la ventaja de permitir combinar en una sola película materiales con funcionalidades complementarias. La peculiaridad de los artículos abordados en este capítulo reside en la composición de las películas nanoestructuradas que conforman el sensor. En concreto, sobre electrodos de ITO, se han combinado materiales con diferentes funcionalidades: materiales electrocatalíticos como la ftalocianina de cobre sulfonada (CuPc) o las nanopartículas de oro (AuNPs), para favorecer la transferencia electrónica; un material conductor, como es el líquido iónico (IL) que permite incrementar la conductividad eléctrica de las monocapas y, finalmente, un material capaz de fijar y retener enzimas en la superficie de los sensores, como es el quitosano.

Además, la investigación aquí descrita demuestra la gran relevancia que tiene la adecuada combinación de materiales en la obtención de efectos sinérgicos, para alcanzar

propiedades que mejoran los resultados obtenidos con electrodos modificados con los materiales de forma individual. Con ello se ha conseguido una potente herramienta en aplicaciones de biodetección, mejorándose la sensibilidad y selectividad.

Una vez desarrollado el método para combinar materiales sensibles y obtener plataformas excelentes para la inmovilización de enzimas, se ha evaluado la posibilidad de desarrollar una bioLE para el análisis de bebidas de interés en la industria de la alimentación.

El artículo 1 describe el desarrollo de un biosensor novedoso basado en una película compuesta por quitosano, CuPcs e IL. Para comenzar, se ha puesto a punto el método para depositar películas con diferentes estructuras, es decir, diferentes combinaciones de materiales y distinto orden en la alternancia de capas. Asimismo, se ha evaluado la influencia en el número de capas que componen la película, demostrándose que un aumento en el grosor de ésta, no amplifica los mecanismos de transferencia electrónica y, por tanto, se ha considerado un fenómeno superficial. Se ha comprobado que estas películas detectan de forma eficiente catecol, debido a que ocurren efectos sinérgicos entre los diferentes componentes que aumentan la intensidad de las respuestas. Una vez preparadas, se ha evaluado qué combinación proporciona los efectos electrocatalíticos más intensos y reproducibles, seleccionándose una bicapa en la que se han combinado quitosano e IL en una monocapa y se ha alternado con una monocapa de CuPc. Posteriormente, estas películas LbL se han utilizado como plataformas para inmovilizar la enzima lacasa (una fenoloxidasa que cataliza la oxidación de fenoles de interés en la industria alimentaria) sobre la superficie de la película seleccionada. El crecimiento de las películas se ha caracterizado mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y técnicas espectroscópicas como son FTIR y UV-vis, y se ha analizado la respuesta del biosensor frente a catecol en disoluciones patrón mediante dos técnicas electroquímicas, la voltametría cíclica (CV) y la cronoamperometría. El valor del límite de detección (LOD) alcanzado de $8.9 \cdot 10^{-10}$ M, así como su buena repetitividad, 4.7%, han confirmado su gran eficiencia; además, el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_M) obtenido, 3.16 μ M, ha demostrado la excelente afinidad de la enzima por el sustrato. A la vista de los resultados, esta nueva estrategia ha resultado ser una propuesta prometedora en el análisis de alimentos y bebidas dada su elevada sensibilidad.



Siguiendo la misma línea de trabajo, en el artículo 2, se ha evaluado la respuesta electroquímica de sensores basados en películas con una nueva composición. Concretamente, se han combinado monocapas de quitosano con películas alternas de dos materiales electrocatalíticos, AuNPs y CuPcs. Además, se han estudiado los efectos en la respuesta electrocatalítica del sensor en función de la enzima empleada. Para ello se han inmovilizado diferentes oxidorreductasas apropiadas para la detección de fenoles, la lacasa o la tirosinasa. Se ha evidenciado que la actividad óptima de ambas enzimas está ligada a la composición del sensor y, como era de esperar, la combinación de materiales ha resultado ser un punto crítico para favorecer la aparición de efectos sinérgicos que facilitan los procesos de transferencia electrónica. Este aspecto, ha sido evidenciado mediante la caracterización estructural de las películas mediante AFM, que ha revelado una gran variación estructural en función de las combinaciones propuestas para el desarrollo de las películas. La caracterización electroquímica, ha permitido determinar la composición óptima para mejorar la transferencia electrónica en la detección de catecol, así como la importancia en la elección de la enzima. Tras analizar los resultados, se ha determinado que la composición de las películas más favorable consiste en una bicapa de quitosano-AuNPs-quitosano-CuPc, es decir, cuando la última monocapa está formada por ftalocianina de cobre se mejora la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo, debido a que la superficie activa del sensor es mayor en comparación con aquellos en los que las AuNPs conforman la última capa y, por tanto, se favorece la adsorción enzimática. En cuanto a LOD se refiere, se ha conseguido obtener un valor de $8.5 \cdot 10^{-10}$ M con el biosensor compuesto por tirosinasa, sin embargo, para la misma estructura, el valor de LOD al inmovilizar lacasa en el sensor, es dos órdenes de magnitud mayor, $1.8 \cdot 10^{-8}$ M, concluyéndose, por tanto, la mayor efectividad de la enzima tirosinasa en la plataforma diseñada para la detección de catecol. Otra de las mejoras conseguidas con respecto al trabajo anterior ha sido la repetitividad, obteniéndose un coeficiente de variación de 1.07%.

Con ambos trabajos se han conseguido desarrollar biosensores estructuralmente diferentes mediante la misma técnica y se ha demostrado que existe una fuerte interacción entre los componentes que forman la película nanoestructurada. Dado el excelente comportamiento de los biosensores, se ha examinado la posibilidad de integrarlos en una aplicación industrial siguiendo una línea de investigación aplicada.

En el artículo 3 se detalla la elaboración de una lengua electrónica para el análisis de muestras de leche. A este respecto, se ha seleccionado la estructura descrita en el artículo 1 para la preparación de la película, ya que, al comparar los resultados obtenidos con los del artículo 2 para la misma enzima, se obtuvo un LOD dos órdenes de magnitud inferior. Sin embargo, teniendo en cuenta la aplicación en el sector lácteo se ha elegido la galactosa oxidasa como enzima. El propósito de la red formada, ha consistido en la integración de un sensor no enzimático inespecífico junto con un biosensor específico, para la detección de galactosa. En cuanto a la caracterización estructural y electroquímica, se ha procedido de la misma manera que en los artículos previos, y se ha comprobado la eficiencia del método de deposición de los materiales, así como de la actividad electrocatalítica de ambos sensores. Se han calculado valores de LODs de $3.6 \cdot 10^{-9}$ M para el sensor y de $9.4 \cdot 10^{-11}$ M para el biosensor para la detección de galactosa, demostrándose la especificidad que supone la incorporación de la enzima en la determinación de este azúcar, traducándose en un aumento en la sensibilidad del biosensor. Finalmente, el sistema bi-sensor desarrollado se ha empleado en la clasificación y discriminación de muestras de leche con distinto contenido nutricional. Mediante un análisis quimiométrico, se ha podido discriminar entre muestras de leche basadas en su contenido en lactosa y además se han podido clasificar en función de su grado de envejecimiento.

El sistema de detección elaborado ha conseguido ser un método de análisis simple, rápido, sensible y novedoso para discriminar matrices complejas sin pretratamiento previo, lo cual es indicativo de su gran capacidad para realizar análisis *in-situ*. En consecuencia, se propone la integración de estos sistemas como parte de los métodos de detección requeridos en la Industria 4.0 con el propósito de mejorar los métodos de análisis clásicos que aún muestran impedimentos para ser incorporados en la industria alimentaria.



3.1.1. Artículo 1

*Promoting laccase sensing activity for catechol detection using LBL
assemblies of chitosan/ionic liquid/ phthalocyanine as immobilization
surfaces*

*C.Salvo-Comino, C.Garcia-Hernandez, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodriguez-
Mendez, C. Garcia-Cabezon.*

Bioelectrochemistry, 132 (2020) 107407

DOI: 10.1016/j.bioelechem.2019.107407

Factor Impacto:5.373, Q1, Biophys



3.1.2 Artículo 2

*Biosensors Platform Based on Chitosan/AuNPs/Phthalocyanine
Composite Films for the Electrochemical Detection of Catechol. The Role
of the Surface Structure*

*C.Salvo-Comino, A. González-Gil, J. Rodríguez-Valentin, C. Garcia-Hernandez,
F. Martin-Pedrosa, A. C. Garcia-Cabazon, M.L. Rodríguez-Mendez.*

Sensors, 20, (2020) 2152

DOI: 10.3390/s20072152

Factor Impacto: 3.576, Q1, Instrument and Instrumentation



3.1.3. Artículo 3

Discrimination of milks with a Multisensor system based on Layer-by-Layer films

C. Salvo-Comino, C.Garcia-Hernandez, C. Garcia-Cabazon, M.L. Rodriguez-Mendez.

Sensors, 18 (2018), 2716-2728

DOI: 10.3390/s18082716

Factor Impacto: 3.302, Q1, Instrument and Instrumentation

3.2. Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales de plata.

Influencia de la relación de aspecto

A lo largo de este bloque se hace referencia a dos artículos, publicados en revistas indexada internacionales de alto impacto. Al igual que en el capítulo anterior, se han llevado a cabo dos líneas de investigación complementarias, una de ciencia básica y otra de aplicación industrial. En primera instancia, se ha investigado el desarrollo de biosensores voltamperométricos basados en la combinación de nanomateriales de plata con distinta relación de aspecto (superficie/volumen), nanohilos de plata (AgNWs) o nanopartículas de plata (AgNPs), capaces de proporcionar una gran interacción electroquímica entre el electrodo y el analito elevando la sensibilidad del sensor. Además de ello, con el fin de elevar la selectividad de los sensores, se han incorporado enzimas específicas para la detección de compuestos de interés industrial. En estos trabajos las técnicas de modificación de electrodos de ITO con nanomateriales empleadas han sido spin-coating y drop-casting. Se han determinado las propiedades analíticas de los biosensores en la detección de compuestos fenólicos y azúcares tanto en disoluciones patrón como en muestras de interés en la industria alimentaria. Posteriormente, se ha examinado la influencia del tipo de nanoestructura en las propiedades electrocatalíticas de los biosensores. En segunda instancia, se han desarrollado dos bioLEs, basadas en dichos nanomateriales y en diferentes enzimas de interés en la industria láctea, para así obtener dos redes de biosensores cuyo funcionamiento se ha podido comparar para evaluar los beneficios del empleo de AgNWs frente al de AgNPs. Se ha comprobado que la selección del material es esencial en la respuesta electroquímica y se han obtenido biosensores de tercera generación basados en mecanismos de transferencia electrónica directa (DET).

La selección de nuevos materiales capaces de mejorar la intensidad de las señales, la especificidad y la sensibilidad de los sensores electroquímicos es un gran desafío científico al que intentamos dar respuesta. En algún trabajo se ha explorado el uso de NWs metálicos en la obtención de sensores y los resultados parecen apuntar que la alta relación de aspecto que presentan, podría ser una ventaja para la mejora de las prestaciones de los biosensores. Sin embargo, no existen trabajos previos en los que se hayan utilizado nanohilos de plata en la fabricación de biosensores dedicados al análisis



de azúcares o fenoles en muestras alimentarias, con lo que la investigación llevada a cabo es ciertamente novedosa.

El artículo 4 describe el desarrollo de un biosensor basado en la preparación de una película de AgNWs o AgNPs mediante spin-coating sobre la que se ha inmovilizado la enzima tirosinasa para la detección electroquímica de catecol. Una vez elaborados los biosensores, y caracterizada la estructura de las películas mediante diferentes técnicas se ha comprobado la correcta inmovilización enzimática sobre la superficie de los electrodos mediante AFM. La respuesta electroquímica de los biosensores construidos con AgNWs ha proporcionado un valor de LOD de $2.7 \cdot 10^{-6}$ con una sensibilidad en torno a $200 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$, mientras que para los desarrollados con AgNPs el valor superior de LOD, $3.2 \cdot 10^{-5}$ M, confirma la mayor eficiencia de los AgNWs frente a las AgNPs como mediadores electrónicos. Además, se ha realizado un estudio de AFM acoplado con electroquímica que revela las capacidades de los AgNWs en la prevención de ensuciamiento de la superficie del electrodo tras la aplicación de sucesivos ciclos de voltaje, evitando adsorciones inespecíficas sobre el biosensor. Posteriormente, se ha evaluado la buena selectividad de los biosensores propuestos ante la presencia de diferentes interferentes fenólicos, así como su reproducibilidad y repetitividad, obteniéndose una desviación estándar inferior al 1.65% para los biosensores basados en AgNWs. Finalmente, a la vista de los resultados, los biosensores desarrollados se han utilizado para el análisis de catecol en muestras de vino. Gracias a los buenos resultados obtenidos con el biosensor desarrollado, se ha valorado la posibilidad de implementarlos en una bioLE para el análisis de matrices complejas como el vino o la leche.

El artículo 5, continúa con la filosofía del trabajo anterior, si bien en una vertiente más práctica, se ha trabajado en el desarrollo de dos bioLEs basadas en AgNWs y AgNPs como materiales sensibles con el fin de seleccionar aquella que proporcione la mayor mejora en cuanto a la discriminación y clasificación de muestras de leche con diferentes características nutricionales. Para ello, se han estudiado los efectos de la relación superficie/volumen de los nanomateriales en la actividad de tres enzimas que catalizan las reacciones relacionadas con compuestos presentes en la leche como son: la galactosa, la glucosa y la lactosa. La investigación ha puesto de manifiesto que la actividad óptima de las enzimas está relacionada con la afinidad por la nanoestructura que compone el sensor, y, por ende, la selección del nanomaterial utilizado es decisiva en la capacidad de

discriminación entre diferentes tipos de leche. También en este caso, se ha analizado la estructura de la superficie de los sensores mediante AFM, así como la conductividad de las películas mediante EIS. En cuanto a las respuestas electroquímicas de los biosensores, se ha comprobado que la presencia de AgNWs ha mejorado la actividad catalítica de las enzimas, aumentando el número de sitios activos y, en consecuencia, mejorando los mecanismos de transferencia electrónica directa (DET).

Para la mayoría de los biosensores desarrollados, los valores de LOD obtenidos se encuentran en el rango nanoMolar, siendo más bajos para la red de sensores modificada con AgNWs. Finalmente, la capacidad de discriminación y clasificación de las dos redes de biosensores se ha analizado utilizando muestras de leche con diferente contenido graso y con distinto contenido nutricional. Mediante un análisis estadístico detallado utilizando análisis de componentes principales (PCA), se ha comprobado que, gracias a la especificidad conferida por las enzimas ambas redes tienen una buena capacidad para discriminar entre muestras de leche. Así mismo, se ha aplicado el análisis discriminante lineal (LDA) para desarrollar un modelo de clasificación predictivo para clasificar las muestras de leche. Finalmente, se han establecido modelos de correlación entre las respuestas electroquímicas de las redes de biosensores y los parámetros físico-químicos de la leche analizada mediante regresiones de máquinas de vectores de soporte (SVMR). Sin embargo, a pesar de que ambos dispositivos funcionan correctamente, se ha concluido que la utilización de AgNWs como material sensible es la mejor opción, puesto que la bioLE fabricada con AgNWs, presenta una mayor capacidad de discriminación y mejores correlaciones con parámetros físico-químicos medidos por métodos tradicionales en las leches que la fabricada con nanopartículas.

De conformidad con los resultados obtenidos, tanto los biosensores electroquímicos individuales, como las bioLEs desarrolladas, satisfacen las estrictas necesidades de la industria alimentaria, no solo para fines de clasificación, sino también para obtener información cuantitativa del contenido de compuestos de interés en alimentos o bebidas mediante una única medida, siendo por tanto un método mucho más sencillo y rápido que los métodos tradicionales.



3.2.1 Artículo 4

Silver nanowires as electron transfer mediators in electrochemical catechol biosensors

C.Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. Garcia-Cabazon, M.L. Rodriguez-Mendez

Sensors, 21, (2021), 899

DOI: 10.3390/s21030899

3.2.2 Artículo 5

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

C.Salvo-Comino, P. Martín-Bartolome, J.L. Pura, C Gonzalez-Perez, F. Martín-Pedrosa, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez

Sensors and Actuators B-Chem, 364 (2022) 121877

DOI: 10.1016/j.snb.2022.131877



3.3. Sensores electroquímicos basados en MIP

En este capítulo se presentan dos trabajos que han dado lugar a sendos artículos publicados en revistas internacionales producto de la investigación pre-doctoral. El fundamento que rige a ambos artículos, es el desarrollo de nuevos sensores voltamétricos basados en la técnica de polímeros de impresión molecular (MIPs) para la detección de fenoles en muestras de vino.

La motivación que ha conducido a esta investigación viene dada por la necesidad de la industria agroalimentaria de determinar el contenido de antioxidantes en alimentos y bebidas. Pese a que existen múltiples técnicas específicas para determinar el contenido de antioxidantes, tal y como se ha indicado, la utilización de sensores y sistemas inteligentes ha generado un gran interés debido a sus excelentes propiedades en la detección de compuestos fenólicos o polifenólicos. Concretamente, la utilización de métodos electroquímicos parece ser una propuesta acertada dadas las propiedades redox que presentan estos compuestos.

Una de las técnicas de preparación de sensores capaz de aportar selectividad, sin necesidad de introducir material biológico (lo que hace mucho más simple el dispositivo), se basa en el desarrollo de polímeros de impresión molecular. El proceso de síntesis de los sensores basados en MIPs se realiza mediante la polimerización de un agente reticulante, cuya elección será clave en el diseño del sensor, en presencia de la molécula que se desea detectar, para obtener una plantilla del analito, que tras su eliminación permitirá su posterior reconocimiento. En estos trabajos se ha elegido como polímero base para la construcción del sensor el quitosano, ya que se trata de un biopolímero excelente para el diseño de sensores MIPs debido a su gran capacidad para formar, de modo sencillo, películas mediante electrodeposición y, además, es capaz de albergar la molécula plantilla sin deformar la cavidad diseñada. Aunque el interés del quitosano es indudable, han sido muy pocos los autores que han empleado dicho material en el desarrollo de sensores electroquímicos basados en MIP para la detección de fenoles, siendo por tanto esta una de las novedades de estos trabajos.

A pesar de las ventajas que la tecnología MIP ofrece, como la selectividad, o la estabilidad química y térmica, también presenta inconvenientes como son la posibilidad de encontrar heterogeneidad en los sitios de unión o el riesgo de eliminación parcial de la

molécula plantilla, desventajas que han sido un obstáculo en el desarrollo de sensores específicos, sensibles y fiables. En esta Tesis Doctoral se describe el escenario actual en el campo de la tecnología de impresión molecular y se sugieren propuestas para implementar dicha técnica en el desarrollo de sensores voltamétricos para análisis de fenoles en disoluciones patrón y en una muestra compleja de interés en la industria agroalimentaria como es el vino.

La investigación recogida en el Artículo 6 se centra en la optimización del método de electrodeposición de una película polimérica de quitosano sobre electrodos de diamante dopado con boro (BDD). Posteriormente, tal y como se describe en el Artículo 7 se ha explorado la posibilidad de incluir en la matriz de quitosano materiales con propiedades electrocatalíticas, con la intención de mejorar los mecanismos de transferencia electrónica entre el analito y el sustrato. Concretamente, el material encapsulado en la matriz polimérica ha sido un composite de MWCNTs decorado con AuNPs.

En ambas investigaciones, las impresiones de las redes de quitosano se han realizado mediante cronoamperometría tanto en presencia de la molécula plantilla (MIP), como en su ausencia (NIP). Para optimizar el proceso se han tenido en cuenta varios parámetros, como son la concentración de la molécula plantilla (catecol), la concentración del polímero base (quitosano), el tiempo de polimerización e incluso el agente eluyente empleado en la eliminación de la molécula plantilla de la matriz formada. Esta parte del proceso ha sido esencial para garantizar el correcto funcionamiento de los sensores. Tras la elución de la molécula plantilla, una vez generadas las cavidades específicas para la detección del catecol, se ha comprobado la eficiencia de los sensores MIPs que contienen dichos huecos en comparación con sensores NIPs que, al no contener las cavidades, son inespecíficos a la detección del analito de interés.

A continuación, se han evaluado las respuestas electroquímicas de los sensores mediante voltametría cíclica (CV), gracias a la capacidad del catecol para oxidarse y reducirse mediante la aplicación de un barrido de voltaje en disolución patrón. Con estos ensayos electroquímicos se han perseguido dos propósitos, en primer lugar, determinar la diferencia en la intensidad de la respuesta voltamperométrica entre un MIP y un NIP para confirmar las ventajas de la técnica al generar cavidades específicas para la detección de catecol. Los resultados han revelado que tanto las señales catódicas como las anódicas son más intensas en el caso de los MIPs, confirmando la mayor afinidad del analito hacia



los sensores con cavidades en las que albergarse. En segundo lugar, realizar un estudio cuantitativo sobre las respuestas de los sensores a concentraciones crecientes de catecol, demostrándose un aumento en la intensidad de los picos redox para los sensores MIPs.

Cabe destacar que, como se demuestra en el Artículo 7, la presencia de nanomateriales en la matriz de quitosano condiciona las respuestas electroquímicas, concretamente el LOD, la sensibilidad y la reproducibilidad obtenida. Para los sensores MIP de quitosano sin modificar los valores de LOD, sensibilidad y reproducibilidad obtenidos son $6.9 \cdot 10^{-7}$ M, $3972 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ y 4.1% respectivamente, con un intervalo lineal comprendido entre 0 y $80 \mu\text{M}$, mientras que en los sensores de MIP de quitosano electropolimerizado en presencia del nanocomposite (MWCNTs-AuNPs) se han obtenido datos LOD, sensibilidad y reproducibilidad de $3.6 \cdot 10^{-5}$ M y $339 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ y 4.5% respectivamente, con un intervalo lineal entre 75 y $1000 \mu\text{M}$. Los resultados revelan que, a pesar de que sería esperable que la introducción de un nanomaterial catalítico en la matriz de quitosano mejorase las respuestas, no se consigue un aumento significativo de la intensidad de la señal. Esto podría ser explicado teniendo en cuenta que la presencia de nanoestructuras rígidas en la red polimérica pudiera perturbar la formación de las cavidades de reconocimiento de catecol, originándose una pérdida de sensibilidad. Otra ventaja importante de estos sistemas MIPs es que, todos los sensores diseñados han demostrado ser reutilizables y tener buena repetitividad de modo que, al realizar un lavado posterior a la medida, los sensores han podido volver a usarse sin perder apenas sensibilidad. Otro aspecto destacable de los sensores desarrollados es su excelente selectividad en la detección de catecol ante la presencia de diferentes compuestos fenólicos que se han utilizado como interferentes. Finalmente, tras haber evaluado las propiedades analíticas de los sensores en la detección de catecol en disolución acuosa, los sensores diseñados se han aplicado en la detección de catecol en muestras de vino, para lo cual, tras haber diluido la muestra en una disolución de tampón fosfato salino, ha sido posible cuantificar, tanto con los sensores MIPs de quitosano como con los sensores MIPs de quitosano modificado con nanomateriales, el valor de la concentración de catecol estimada en las muestras de vino analizadas, para lo cual en este caso la presencia de los CNTs no ha afectado a la medida.

A la vista de los resultados obtenidos, resulta sugerente la idea planteada en el desarrollo de sensores electroquímicos basados en MIPs simples, novedosos y



biocompatibles para la detección cuantitativa de compuestos fenólicos en matrices complejas alcanzando elevada sensibilidad, selectividad y reproducibilidad.



3.3.1. Artículo 6

Voltammetric sensor based on electrodeposited molecularly imprinted chitosan film on BDD electrodes for catechol detection in buffer and in wine samples

C. Salvo-Comino, I. Rassas, S. Minot, F. Bessueille, M.L. Rodriguez-Mendez, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault

Materials Science and engineering C, 110 (2020) 110667

DOI: 10.1016/j.msec.2020.110667

Factor Impacto: 7.328, Q1, Materials, Science, Biomaterials



3.3.2. Artículo 7

*Voltammetric sensor based on molecularly imprinted chitosan-carbon
nanotubes decorated with gold nanoparticles nanocomposite deposited on
Boron Doped Diamond electrodes for catechol detection*

*C. Salvo-Comino, I. Rassas, S. Minot, F. Bessueille, M. Arab, V. Chevallier, M.L.
Rodriguez-Mendez, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault*

Materials, 13, 688, (2020) 1-11

DOI: 10.3390/ma13030688

Factor Impacto:3.623, Q2, Material Science (Miscellaneous)



Universidad de Valladolid

Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores y su aplicación en la industria alimentaria

Capítulo 4

Conclusiones y perspectivas futuras

Este capítulo recoge las conclusiones extraídas de los resultados experimentales que, a su vez, confirman la consecución de los objetivos propuestos para esta Tesis Doctoral. Así mismo, se contemplan las perspectivas futuras de las investigaciones desarrolladas.

This chapter contains the conclusions drawn from the experimental results that, in turn, confirm the achievement of the objectives proposed for this Doctoral Thesis. Likewise, the future perspectives of the developed investigations are contemplated.



4.1. Conclusiones/ Conclusions

Las conclusiones generales y específicas que comprenden el conjunto de resultados obtenidos en las investigaciones desarrolladas son:

1. Se ha desarrollado y puesto a punto una novedosa estrategia en la obtención de biosensores para la detección de compuestos de interés en la industria de la alimentación gracias a la combinación de materiales sensibles depositados mediante la técnica de Layer by Layer.

1.1. Películas delgadas nanoestructuradas de materiales con funcionalidades distintas han permitido desarrollar sensores electroquímicos para la detección de catecol. Para ello se han combinado materiales como líquido iónico (mejora la conductividad), ftalocianina de cobre o nanopartículas de oro (facilita la transferencia electrónica) y quitosano (mejora la inmovilización enzimática). Se ha demostrado la influencia del espesor de las películas, así como el orden y composición de las monocapas en la respuesta electroquímica.

1.2. Las películas nanoestructuradas obtenidas mediante LbL favorecen la inmovilización de dos enzimas oxidoreductasas, como son la lacasa y la tirosinasa, ya que facilitan la transferencia electrónica entre la superficie de los electrodos y las enzimas.

1.3. La mayor porosidad y rugosidad de la superficie de los electrodos permiten mejorar la absorción de las enzimas y favorecen los procesos de difusión, obteniéndose valores de límites de detección muy bajos, inferiores en el caso de los biosensores de tirosinasa, y un aumento notable de los sitios activos.

1.4. Esta estrategia ha sido igualmente útil en el diseño de biosensores nanoestructurados para la detección de azúcares como la galactosa. Para ello, tras la inmovilización de la enzima galactosa oxidasa, se ha confirmado una mejora en la respuesta electroquímica del biosensor modificado.

- 1.5. *Se ha diseñado una lengua electrónica a partir de sensores nanoestructurados mediante LbL enzimáticos y no enzimáticos para el análisis de leche. Se ha conseguido clasificar muestras de leche en función de su contenido en lactosa y de su grado de envejecimiento mediante PCA. Los modelos de correlación obtenidos mediante PLS entre las señales voltamétricas y sus parámetros físico-químicos, permiten predecir con muy bajo margen de error el contenido en lactosa y otros parámetros de interés como el contenido graso, acidez, etc.*

2. *Se ha comprobado la influencia que tiene la relación de aspecto de distintos nanomateriales de plata utilizados como mediadores electrónicos en la respuesta electroquímica de biosensores en la detección de fenoles y azúcares.*
 - 2.1. *Electrodos de ITO modificados con nanohilos de plata presentan mayor afinidad por enzimas como la tirosina en comparación con los modificados con nanopartículas de plata en la detección de catecol.*

 - 2.2. *La caracterización mediante AFM confirma una distribución homogénea de la enzima sobre los nanomateriales, lo cual maximiza la superficie de contacto. Se ha comprobado mediante análisis simultáneo de AFM acoplado con el estudio electroquímico que, los biosensores permanecen inalterados tras la aplicación de un número elevado de ciclos voltamétricos sin que se observen signos de ensuciamiento, ofreciendo excelentes valores de repetitividad y reproducibilidad.*

 - 2.3. *La mayor relación superficie/volumen y la mayor conductividad de los nanohilos de plata en relación con las nanopartículas de plata promueven una mejora en la transferencia electrónica y como consecuencia se obtienen límites de detección inferiores.*

 - 2.4. *Los biosensores de tirosinasa modificados con nanohilos de plata muestran una alta sensibilidad a la molécula de catecol frente a interferentes como catequina, vainillina, quercetina y pirogalol, fenoles presentes en el vino. Asimismo, se ha comprobado su capacidad para detectar catecol en matrices complejas como el vino.*



- 2.5. *Los nanomateriales de plata se han utilizado también de modo satisfactorio para la modificación de electrodos BDD. Se han desarrollado biosensores para la detección de azúcares y se ha demostrado que los biosensores modificados con nanomateriales tienen mejor sensibilidad que los electrodos modificados únicamente con enzimas tales como β -galactosidasa, glucosa oxidasa, y galactosa oxidasa.*
- 2.6. *La modificación de los sensores con nanopartículas y nanohilos de plata ha permitido obtener sensores de tercera generación con mecanismo de transferencia directa de electrones (DET). Esta transferencia electrónica es más rápida en los sensores modificados con nanohilos de plata, lo que sugiere una vez más la importancia de la relación de aspecto. La modificación de los biosensores con nanohilos permite obtener límites de detección un orden de magnitud menor que los obtenidos con nanopartículas de plata.*
- 2.7. *Se han diseñado dos lenguas bioelectrónicas específicas para el análisis de leches a partir de los biosensores modificados en un caso con nanopartículas de plata y en otro caso con nanohilos de plata. Se ha observado mediante PCA que la capacidad de discriminación de la lengua bioelectrónica construida a partir de biosensores modificados con nanohilos es sensiblemente superior a la diseñada a partir de nanopartículas.*
- 2.8. *La lengua bioelectrónica diseñada a partir de nanohilos de plata y enzimas es capaz de discriminar entre nueve tipos de leches en función de su contenido graso y su contenido nutricional. Además, mediante SVM se han obtenido excelentes coeficientes de correlación entre los resultados electroquímicos de la lengua electrónica y los datos físico-químicos comúnmente utilizados en el control de calidad de la leche. Por tanto, la lengua bioelectrónica permite, además de discriminar y clasificar, predecir con muy bajo error múltiples parámetros físico-químicos de interés de forma cuantitativa.*

3. Se ha diseñado y optimizado el desarrollo de sensores no enzimáticos basados en la técnica de polímeros de impresión molecular (MIP) para la cuantificación de catecol en muestras de vino.

3.1. La electrodeposición de un biopolímero, el quitosano, sobre electrodos BDD ha permitido la detección específica y selectiva de catecol en ausencia de material enzimático. Del mismo modo, se ha comprobado que la encapsulación de un material electrocatalítico en la red polimérica, concretamente nanotubos de carbono modificados con nanopartículas de oro, obstaculiza las respuestas electroquímicas, debido a que la rigidez estructural perturba la formación de las cavidades de reconocimiento de catecol, disminuyendo la sensibilidad del sensor.

3.2. Las capacidades analíticas de los sensores tipo MIP en presencia y ausencia de nanomateriales revelan una aceptable sensibilidad y reproducibilidad, así como una buena selectividad en la detección de catecol en presencia de interferentes, como el 4-tert-butilcatecol, 4-aminotiofenol, bisfenol-A, 2-nitrofenol o 4-nitrofenol.

3.3. Se ha demostrado una gran eficiencia durante los procesos de elución de la molécula plantilla, lo cual ha permitido la reutilización de los sensores sin pérdida de sensibilidad y selectividad en la detección de catecol. Además, la aplicación de los sensores en la cuantificación de catecol en muestras complejas como es el vino, ha permitido en todos los casos, estimar la concentración de catecol tras adiciones internas sobre la muestra, lo cual manifiesta las excelentes capacidades analíticas de los sensores.



The general and specific conclusions that comprise the set of results obtained in the investigations carried out are:

1. A novel strategy has been developed and fine-tuned for obtaining biosensors for the detection of compounds of interest in the food industry thanks to the combination of sensitive materials deposited using the Layer by Layer technique.

1.1. Nanostructured thin films of materials with different functionalities have allowed the development of electrochemical sensors for catechol detection. For this, materials such as ionic liquid (improves conductivity), copper phthalocyanine or gold nanoparticles (facilitates electronic transfer) and chitosan (improves enzymatic immobilization) have been combined. The influence of the thickness of the films, as well as the order and composition of the monolayers on the electrochemical response has been demonstrated.

1.2. The nanostructured films obtained by means of LbL improve the immobilization of two oxidoreductase enzymes, such as laccase and tyrosinase, since they facilitate the electronic transfer between the surface of the electrodes and the enzymes.

1.3. The greater porosity and roughness of the surface of the electrodes improve the absorption of enzymes and favor diffusion processes, obtaining very low detection limit values, lower in the case of the tyrosinase biosensors, and a notable increase in active sites.

1.4. This strategy has been equally useful in the design of nanostructured biosensors for the detection of sugars such as galactose. For this, after the immobilization of the galactose oxidase enzyme, an improvement in the electrochemical response of the modified biosensor has been confirmed.

1.5. An electronic tongue has been designed from enzymatic and non-enzymatic LbL nanostructured sensors for milk analysis. It has been possible to classify milk samples according to their lactose content and their degree of aging by means of PCA. The correlation models obtained by means of PLS between the voltammetric signals and their physical-chemical parameters allow the lactose content and other

parameters of interest, such as fat content, acidity, etc., to be predicted with a very low margin of error.

2. The influence of the aspect ratio of different silver nanomaterials, used as electronic mediators in the electrochemical response of biosensors in the detection of phenols and sugars, has been verified.
 - 2.1. *ITO electrodes modified with silver nanowires have a higher affinity for enzymes such as tyrosine compared to those modified with silver nanoparticles in the detection of catechol.*
 - 2.2. *Characterization by AFM confirms a homogeneous distribution of the enzyme on the nanomaterials, which maximizes the contact surface. It has been verified by means of simultaneous analysis of AFM, coupled with the electrochemical study, that the biosensors remain unchanged after the application of a high number of voltammetric cycles without signs of fouling being observed, offering excellent repeatability and reproducibility values.*
 - 2.3. *The higher surface-to-volume ratio and higher conductivity of silver nanowires relative to silver nanoparticles promote enhanced electron transfer, resulting in lower detection limits.*
 - 2.4. *Tyrosinase biosensors modified with silver nanowires show a high sensitivity to the catechol molecule against interfering agents such as catechin, vanillin, quercetin and pyrogallol, phenols present in wine. Likewise, its ability to detect catechol in complex matrices such as wine has been verified.*
 - 2.5. *Silver nanomaterials have also been used successfully to modify BDD electrodes. Biosensors for the detection of sugars have been developed and biosensors modified with nanomaterials have been shown to have a better sensitivity than electrodes modified exclusively with enzymes such as β -galactosidase, glucose oxidase, and galactose oxidase.*



- 2.6. *The modification of the sensors with silver nanoparticles and nanowires has made it possible to obtain third-generation sensors with a direct electron transfer (DET) mechanism. This electron transfer is faster in sensors modified with silver nanowires, again suggesting the importance of the aspect ratio. The modification of biosensors with nanowires allows detection limits an order of magnitude lower than those obtained with silver nanoparticles to be obtained.*
- 2.7. *Two specific bioelectronic tongues have been designed for the analysis of milk from biosensors, modified in one case with silver nanoparticles and in the other with silver nanowires. It has been observed, by means of PCA, that the discrimination capacity of the bioelectronic tongue built from biosensors modified with nanowires is significantly higher than that designed from nanoparticles.*
- 2.8. *The bioelectronic tongue designed from silver nanowires and enzymes is capable of discriminating between nine types of milk based on the fat and nutritional content. In addition, excellent correlation coefficients have been obtained using SVM between the electrochemical results of the electronic tongue and the physicochemical data commonly used in milk quality control. Therefore, the bioelectronic tongue allows, in addition to discriminating and classifying, multiple physicochemical parameters of interest to be quantitatively predicted with very low error.*
3. The development of non-enzymatic sensors based on the molecular imprinted polymer (MIP) technique for the quantification of catechol in wine samples has been designed and optimized.
- 3.1. *The electrodeposition of a biopolymer, chitosan, on BDD electrodes has allowed the specific and selective detection of catechol in the absence of enzymatic material. Likewise, the encapsulation of an electrocatalytic material in the polymeric network, specifically carbon nanotubes modified with gold nanoparticles, hinders the electrochemical responses, because the structural rigidity disturbs the formation of catechol recognition cavities, decreasing the sensitivity of the sensor.*

- 3.2. *The analytical capabilities of MIP-type sensors, with and without the presence of nanomaterials reveal acceptable sensitivity and reproducibility, as well as good selectivity in the detection of catechol in the presence of interferents, such as 4-tert-butylcatechol, 4-aminothiophenol, bisphenol- A, 2-nitrophenol or 4-nitrophenol.*
- 3.3. *A high efficiency has been demonstrated during the elution processes of the template molecule, which has allowed the reusability of the sensors without loss of sensitivity or selectivity in the detection of catechol. In addition, the application of the sensors in the quantification of catechol in complex samples such as wine has allowed, in all cases, the concentration of catechol to be estimated after internal additions to the sample, which shows the excellent analytical capabilities of the sensors.*



4.2. Perspectivas futuras/ future perspectives

En los últimos años, la nanociencia y la nanotecnología han adquirido gran importancia en el progreso de la ciencia actual. Por este motivo, se prevé que el alcance de los avances nanotecnológicos será tal, que permitirá desarrollar tecnologías totalmente novedosas para ser implementadas en todo tipo de industrias.

En lo que a la industria alimentaria respecta, las aplicaciones más prometedoras están relacionadas con procesamiento y control de calidad de alimentos. Los mayores esfuerzos están enfocados al desarrollo de dispositivos automatizables capaces de realizar un diagnóstico *in-situ*, de las propiedades de un alimento. Para este fin, la implementación de la nanotecnología en el desarrollo de sensores y biosensores resulta una valiosa herramienta. De la misma manera la combinación de la selectividad cruzada ofrecida por los sistemas multisensores junto con un tratamiento estadístico adecuado de los datos, hace de las lenguas electrónicas, sistemas ideales para ser utilizados en muestras de naturaleza química compleja. Las aplicaciones de las lenguas electrónicas tienen un gran alcance, ya que permiten el control de la calidad desde las materias primas de procedencia, pasando por controlar los procesos de producción y almacenamiento de los alimentos, así como los procesos de envejecimiento de los mismos.

Se ha puesto de manifiesto la elevada selectividad, sensibilidad y especificidad de las lenguas bioelectrónicas basadas en nanomateriales y enzimas, aquí diseñadas. La capacidad de éstas en la clasificación y discriminación de muestras de leche con distintas composiciones y propiedades, demuestra el interés por desarrollar dispositivos capaces de realizar medidas en tiempo real sin necesidad de realizar un pretratamiento de las muestras. Por este motivo, a lo largo de esta Tesis Doctoral, se ha comenzado una investigación para la que se pronostica un futuro prometedor. Sensores modificados con distintos materiales sensibles, se han utilizado para el diseño lenguas bioelectrónicas capaces de clasificar y discriminar diferentes parámetros en matrices complejas, por este motivo, las perspectivas futuras que surgen tras el éxito de los resultados obtenidos, se centran en el desarrollo de dispositivos portátiles, baratos y sencillos, capaces de evaluar muestras complejas con elevada precisión, complementando o incluso prescindiendo de técnicas clásicas de análisis, y su implementación en la industria de la alimentación.

In recent years, Nanoscience and Nanotechnology have gained great importance in the progress of current science. For this reason, it is expected that the scope of nanotechnological advances will allow the development of totally new technologies to be implemented in all types of industries.

As far as the food industry is concerned, the most promising applications are related to food processing and quality control. The greatest efforts are focused on the development of automatable devices capable of performing an *in-situ* diagnosis of the properties of a food. To this end, the implementation of Nanotechnology in the development of sensors and biosensors is a valuable tool. In the same way, the combination of the cross selectivity offered by multisensor systems together with an adequate statistical treatment of the data, makes electronic tongues ideal systems to be used in samples of a complex chemical nature. The applications of electronic tongues have a wide scope, since they allow quality control from the raw materials of origin, through the control of food production and storage processes, as well as their aging processes.

The high selectivity, sensitivity and specificity of bioelectronic tongues based on nanomaterials and enzymes, designed here, have been shown. Their ability to classify and discriminate milk samples with different compositions and properties demonstrates the interest in developing devices capable of real-time measurements without the need for pre-treating the samples. For this reason, the research that has commenced with this Doctoral Thesis would seem to have a promising future. Sensors modified with different sensitive materials have been used for the design of bioelectronic tongues capable of classifying and discriminating different parameters in complex matrices. Thus, the future perspectives that arise after the success of the results obtained focus on the development of portable, cheap and simple devices capable of evaluating complex samples with high precision, complementing or even dispensing with classical analysis techniques, and their implementation in the food industry.



Universidad de Valladolid

Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores para su aplicación en la industria alimentaria

Capítulo 5

Bibliografía

En este capítulo se recogen las referencias que apoyan a la presente Tesis Doctoral y que han servido de guía para realizar las investigaciones reportadas.

This chapter contains the references that support this Doctoral Thesis and that have served as a guide to carry out the reported investigations.



5.1. Bibliografía

- [1] Gobierno de España. Ministerio de Agricultura y Pesca. Alimentación y Medio Ambiente “Alimentación. Cifras de la industria alimentaria,” (2022). <http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/>.
- [2] S. Otlés, 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.
- [3] J. LePree, Smart sensors enable Industry 4.0, *Chem. Eng.* (2019) 3. <https://www.chemengonline.com/smart-sensors-enable-industry-4-0>.
- [4] A. Schütze, N. Helwig, T. Schneider, *Sensors 4.0 - Smart sensors and measurement technology enable Industry 4.0*, *J. Sensors Sens. Syst.* 7 (2018) 359–371. doi:10.5194/jsss-7-359-2018.
- [5] Spectral Engines. *Industry 4.0 and how smart sensors make the difference*, (2018). <https://www.spectralengines.com/articles/industry-4-0-and-how-smart-sensors-make-the-difference>.
- [6] H. Jafarizadeh-Malmiri, Z. Sayyar, N. Anarjan, A. Berenjian, *Nano-sensors in Food Nanobiotechnology*, *Nanobiotechnology Food Concepts, Appl. Perspect.* (2019) 81–94. doi:10.1007/978-3-030-05846-3_6.
- [7] M. Aliofkhaezai, A.S.H. Makhlof, *Handbook of Nanoelectrochemistry: Electrochemical Synthesis Methods, Properties, and Characterization Techniques*, 2016. doi:10.1007/978-3-319-15266-0.
- [8] K. Aghbolagh Sharifi, S. Pirsá, *Chemical Review and Letters Electrochemical sensors; Types and applications in the food industry*, *Chem Rev Lett.* 3 (2020) 192–201. http://www.chemrevlett.com/article_111275.html.
- [9] V.S. Manikandan, B.R. Adhikari, A. Chen, *Nanomaterial based electrochemical sensors for the safety and quality control of food and beverages*, *Analyst.* 143 (2018) 4537–4554. doi:10.1039/c8an00497h.
- [10] B. Pérez-López, A. Merkoçi, *Nanomaterials based biosensors for food analysis applications*, *Trends Food Sci. Technol.* 22 (2011) 625–639. doi:10.1016/j.tifs.2011.04.001.
- [11] J. Kochana, P. Nowak, A. Jarosz-Wilkolazka, M. Bieroń, *Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds*, *Microchem. J.* 89 (2008) 171–174. doi:10.1016/j.microc.2008.02.004.
- [12] G. Favero, G. Fusco, F. Mazzei, F. Tasca, R. Antiochia, *Electrochemical characterization of graphene and MWCNT screen-printed electrodes modified with AuNPs for laccase biosensor development*, *Nanomaterials.* 5 (2015) 1995–2006. doi:10.3390/nano5041995.
- [13] K.L. Kim, J.C. Lee, K. Robards, S.H. Choi, *Immobilization of tyrosinase in carboxylic and carbonyl group-modified MWNT electrode and its application for sensing phenolics in red wines*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 3790–3798. doi:10.1166/jnn.2010.1982.
- [14] I. Zrinski, K. Pungjunun, S. Martinez, J. Zavašnik, D. Stanković, K. Kalcher, E. Mehmeti, *Evaluation of phenolic antioxidant capacity in beverages based on laccase immobilized on screen-printed carbon electrode modified with graphene nanoplatelets and gold nanoparticles*, *Microchem. J.* 152 (2020) 104–282. doi:10.1016/j.microc.2019.104282.
- [15] E. Buber, A. Yuzer, S. Soylemez, M. Kesik, M. Ince, L. Toppare, *Construction and amperometric biosensing performance of a novel platform containing carbon nanotubes-zinc phthalocyanine and a conducting polymer*, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 61–69. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.020.



- [16] B. Dalkıran, P.E. Erden, E. Kılıç, Electrochemical biosensing of galactose based on carbon materials: graphene versus multi-walled carbon nanotubes, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4329–4339. doi:10.1007/s00216-016-9532-x.
- [17] F. Della Pelle, D. Compagnone, Nanomaterial-based sensing and biosensing of phenolic compounds and related antioxidant capacity in food, *Sensors.* 18 (2018) 462. doi:10.3390/s18020462.
- [18] S. Gao, W. Wang, B. Wang, Molecularly imprinted polymers as recognition elements in optical sensors, in: *Mol. Imprinted Mater. Sci. Technol.*, 2004: pp. 701–726. doi:10.1201/9781420030303.
- [19] T.N. Chatterjee, D. Das, R.B. Roy, B. Tudu, S. Sabhapondit, P. Tamuly, P. Pramanik, R. Bandyopadhyay, Molecular Imprinted Polymer Based Electrode for Sensing Catechin (+C) in Green Tea, *IEEE Sens. J.* 18 (2018) 2236–2244. doi:10.1109/JSEN.2018.2791661.
- [20] M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. De Saja, R. González-Antón, C. García-Hernández, C. Medina-Plaza, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, Electronic noses and tongues in wine industry, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4 (2016) 1–12. doi:10.3389/fbioe.2016.00081.
- [21] D. Tonelli, E. Scavetta, I. Gualandi, Electrochemical deposition of nanomaterials for electrochemical sensing, *Sensors.* 19 (2019) 1–28. doi:10.3390/s19051186.
- [22] A. Vasilescu, P. Fanjul-Bolado, A.M. Titoiu, R. Porumb, P. Epure, Progress in electrochemical (bio)sensors for monitoring wine production, *Chemosensors.* 7 (2019) 1–39. doi:10.3390/chemosensors7040066.
- [23] G.K. Mishra, A. Barfidokht, F. Tehrani, R.K. Mishra, Food safety analysis using electrochemical biosensors, *Foods.* 7 (2018) 1–11. doi:10.3390/foods7090141.
- [24] F. Malvano, R. Pilloton, D. Albanese, Label-free impedimetric biosensors for the control of food safety. A review, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 100 (2020) 468–491. doi:10.1080/03067319.2019.1667096.
- [25] H. Berg, *Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications, Bioelectrochemistry.* 59 (2003) 1–133. doi:10.1016/s1567-5394(03)00012-4.
- [26] L. Zeng, L. Peng, D. Wu, B. Yang, Electrochemical Sensors for Food Safety, in: *Nutr. Heal. Dis. - Our Challenges Now Forthcom. Time*, 2019: pp. 1–11. doi:10.5772/intechopen.82501.
- [27] B. Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, LTD, Northern Ireland, UK, 2007. doi:10.1002/9780470511305.
- [28] T. Bhardwaj, Review on biosensor technologies, 2015.
- [29] B. Wu, Z. Wang, D. Zhao, X. Lu, A novel molecularly imprinted impedimetric sensor for melamine determination, *Talanta.* 101 (2012) 374–381. doi:10.1016/J.TALANTA.2012.09.044.
- [30] K. Ghayedi Karimi, S.A. Mozaffari, M. Ebrahimi, Spin-coated ZnO–graphene nanostructure thin film as a promising matrix for urease immobilization of impedimetric urea biosensor, *J. Chinese Chem. Soc.* 65 (2018) 1379–1388. doi:10.1002/jccs.201800031.
- [31] S. Datta, B. Kanjilal, P. Sarkar, Electrochemical Sensor for Detection of Polyphenols in Tea and Wine with Differential Pulse Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy Utilizing Tyrosinase and Gold Nanoparticles Decorated Biomembrane, *J. Electrochem. Soc.* 164 (2017) B118–B126. doi:10.1149/2.0971704jes.
- [32] S. He, Y. Yuan, A. Nag, S. Feng, N. Afsarimanesh, T. Han, S.C. Mukhopadhyay, D.R. Organ, A review on the use of impedimetric sensors for the inspection of food quality, *Int.*



- J. Environ. Res. Public Health. 17 (2020) 1–30. doi:10.3390/ijerph17145220.
- [33] A. Riul, H.C. De Sousa, R.R. Malmegrim, D.S. Dos Santos, A.C.P.L.F. Carvalho, F.J. Fonseca, O.N. Oliveira, L.H.C. Mattoso, Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks, *Sensors Actuators, B Chem.* 98 (2004) 77–82. doi:10.1016/j.snb.2003.09.025.
- [34] C. Garcia-Hernandez, C. Salvo Comino, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, C. Garcia-Cabezón, Impedimetric electronic tongue based on nanocomposites for the analysis of red wines. Improving the variable selection method, *Sensors Actuators, B Chem.* 277 (2018) 365–372. doi:10.1016/j.snb.2018.09.023.
- [35] V.P. Scagion, L.A. Mercante, K.Y. Sakamoto, J.E. Oliveira, F.J. Fonseca, L.H.C. Mattoso, M.D. Ferreira, D.S. Correa, An electronic tongue based on conducting electrospun nanofibers for detecting tetracycline in milk samples, *RSC Adv.* 6 (2016) 103740–103746. doi:10.1039/c6ra21326j.
- [36] N.W. McCready, *Principles of chemical thermodynamics*, New York, McGraw-Hill Book Co, 1951. doi:10.1016/0016-0032(51)90556-x.
- [37] U.B. Trivedi, D. Lakshminarayana, I.L. Kothari, N.G. Patel, H.N. Kapse, K.K. Makhija, P.B. Patel, C.J. Panchal, Potentiometric biosensor for urea determination in milk, *Sensors Actuators, B Chem.* 140 (2009) 260–266. doi:10.1016/j.snb.2009.04.022.
- [38] J.F. Ping, J. Wu, Y.B. Ying, Screen-printed potentiometric strip for calcium ion determination in water and milk, *ASABE.* 56 (2013) 739–744. doi:10.13031/2013.42656.
- [39] R. Hernández, J. Riu, F.X. Rius, Determination of calcium ion in sap using carbon nanotube-based ion-selective electrodes, *Analyst.* 135 (2010) 1979–1985. doi:10.1039/c0an00148a.
- [40] E.W. Nery, L.T. Kubota, Integrated, paper-based potentiometric electronic tongue for the analysis of beer and wine, *Anal. Chim. Acta.* 918 (2016) 60–68. doi:10.1016/j.aca.2016.03.004.
- [41] Z. Sun, Y. Zhang, X. Xu, M. Wang, L. Kou, Determination of the total phenolic content in wine samples using potentiometric method based on permanganate ion as an indicator, *Molecules.* 24 (2019) 1–9. doi:10.3390/molecules24183279.
- [42] C. Jiang, X. Li, Y. Yao, Y. Ying, J. Ping, Fully Written Flexible Potentiometric Sensor Using Two-Dimensional Nanomaterial-Based Conductive Ink, *Anal. Chem.* 90 (2018) 13088–13095. doi:10.1021/acs.analchem.8b04334.
- [43] Z. Mousavi, J. Bobacka, A. Lewenstam, A. Ivaska, Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) doped with carbon nanotubes as ion-to-electron transducer in polymer membrane-based potassium ion-selective electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 633 (2009) 246–252. doi:10.1016/j.jelechem.2009.06.005.
- [44] M. Cuartero, G.A. Crespo, All-solid-state potentiometric sensors: A new wave for in situ aquatic research, *Curr. Opin. Electrochem.* 10 (2018) 98–106. doi:10.1016/j.coelec.2018.04.004.
- [45] T. Alizadeh, S. Nayeri, S. Mirzaee, A high performance potentiometric sensor for lactic acid determination based on molecularly imprinted polymer/MWCNTs/PVC nanocomposite film covered carbon rod electrode, *Talanta.* 192 (2019) 103–111. doi:10.1016/j.talanta.2018.08.027.
- [46] K. Haupt, Molecularly imprinted polymers: The next generation, *Anal. Chem.* 75 (2003) 376A–383A. doi:10.1021/ac031385h.
- [47] R. Liang, R. Zhang, W. Qin, Potentiometric sensor based on molecularly imprinted

- polymer for determination of melamine in milk, *Sensors Actuators, B Chem.* 141 (2009) 544–550. doi:10.1016/j.snb.2009.05.024.
- [48] M.A. Augustin, P.T. Clarke, Calcium ion activities of cooled and aged reconstituted and recombined milks, *J. Dairy Res.* 58 (1991) 219–229. doi:10.1017/S0022029900029769.
- [49] L. Dornelles Mello, L. Tatsuo Kubota, Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chem.* 77 (2002) 237–256. doi:10.1016/S0308-8146(02)00104-8.
- [50] K. Domanský, J. Janata, M. Josowicz, D. Petelenz, Present state of fabrication of chemically sensitive field effect transistors: Plenary lecture, *Analyst.* 4 (1993) 335–340. doi:10.1039/AN9931800335.
- [51] C.S. Lee, S. Kyu Kim, M. Kim, Ion-sensitive field-effect transistor for biological sensing, *Sensors.* 9 (2009) 7111–7131. doi:10.3390/s90907111.
- [52] J. X., K.H. J. Zhang, *Molecular Sensors and Nanodevices Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering A volume in Micro and Nano Technologies*, 2^o Edition, Elsevier Science, 2019.
- [53] N. Adányi, E.E. Szabó, M. Váradí, Multi-enzyme biosensors with amperometric detection for determination of lactose in milk and dairy products, *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999) 220–226. doi:10.1007/s002170050484.
- [54] S. Neampet, N. Ruecha, J. Qin, W. Wonsawat, O. Chailapakul, N. Rodthongkum, A nanocomposite prepared from platinum particles, polyaniline and a Ti3C2 MXene for amperometric sensing of hydrogen peroxide and lactate, *Microchim. Acta.* 186 (2019) 1–8. doi:10.1007/s00604-019-3845-3.
- [55] J.X.J. Zhang, K. Hoshino, Electrical transducers: Electrochemical sensors and semiconductor molecular sensors, in: *Mol. Sensors Nanodevices*, Elsevier, 2019: pp. 181–230. doi:10.1016/b978-0-12-814862-4.00004-1.
- [56] J. Sochor, J. Dobes, O. Krystofova, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, M. Pohanka, T. Jurikova, O. Zitka, V. Adam, B. Klejdus, R. Kizek, Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties, *Int. J. Electrochem. Sci.* 8 (2013) 8464–8489.
- [57] Q. Chen, L. Zhang, G. Chen, Facile preparation of graphene-copper nanoparticle composite by in situ chemical reduction for electrochemical sensing of carbohydrates, *Anal. Chem.* 84 (2012) 171–178. doi:10.1021/ac2022772.
- [58] C. Kalinke, P.R. de Oliveira, M. Bonet San Emeterio, A. González-Calabuig, M. del Valle, A. Salvio Mangrich, L. Humberto Marcolino Junior, M.F. Bergamini, Voltammetric Electronic Tongue Based on Carbon Paste Electrodes Modified with Biochar for Phenolic Compounds Stripping Detection, *Electroanalysis.* 31 (2019) 2238–2245. doi:10.1002/elan.201900072.
- [59] J.W. Zhang, K.P. Wang, X. Zhang, Fabrication of SnO₂ decorated graphene composite material and its application in electrochemical detection of caffeic acid in red wine, *Mater. Res. Bull.* 126 (2020) 110820. doi:10.1016/j.materresbull.2020.110820.
- [60] K. Thangavelu, N. Raja, S.M. Chen, W.C. Liao, Nanomolar electrochemical detection of caffeic acid in fortified wine samples based on gold/palladium nanoparticles decorated graphene flakes, *J. Colloid Interface Sci.* 501 (2017) 77–85. doi:10.1016/j.jcis.2017.04.042.
- [61] W. Gao, W.W. Tjiu, J. Wei, T. Liu, Highly sensitive nonenzymatic glucose and H₂O₂ sensor based on Ni(OH)₂/electroreduced graphene oxide-Multiwalled carbon nanotube film modified glass carbon electrode, *Talanta.* 120 (2014) 484–490. doi:10.1016/j.talanta.2013.12.012.



- [62] K. Barman, S. Jasimuddin, Non-enzymatic electrochemical sensing of glucose and hydrogen peroxide using a bis(acetylacetonato)oxovanadium(IV) complex modified gold electrode, *RSC Adv.* 6 (2016) 20800–20806. doi:10.1039/c5ra26534g.
- [63] M. Sharma, P. Yadav, M. Sharma, Novel electrochemical sensing of galactose using GaOxNPs/CHIT modified pencil graphite electrode, *Carbohydr. Res.* 483 (2019) 107749. doi:10.1016/j.carres.2019.107749.
- [64] Z. Zhang, J. Liu, J. Fan, Z. Wang, L. Li, Detection of catechol using an electrochemical biosensor based on engineered *Escherichia coli* cells that surface-display laccase, *Anal. Chim. Acta.* 1009 (2018) 65–72. doi:10.1016/j.aca.2018.01.008.
- [65] A. Casanova, M. Cuartero, Y. Alacid, C.M. Almagro, F. García-Cánovas, M.S. García, J.A. Ortuño, A sustainable amperometric biosensor for the analysis of ascorbic, benzoic, gallic and kojic acids through catechol detection. Innovation and signal processing, *Analyst.* 145 (2020) 3645–3655. doi:10.1039/c9an02523e.
- [66] D.B.T. Mascagni, C.M. Miyazaki, N.C. da Cruz, M.L. de Moraes, A. Riul, M. Ferreira, Layer-by-layer assembly of functionalized reduced graphene oxide for direct electrochemistry and glucose detection, *Mater. Sci. Eng. C.* 68 (2016) 739–745. doi:10.1016/j.msec.2016.06.001.
- [67] L. Rotariu, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, C. Bala, Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective, *TrAC Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 80–87. doi:10.1016/J.TRAC.2015.12.017.
- [68] D. Steinebrunner, G. Schnurpfeil, A. Wichmann, D. Wöhrle, A. Wittstock, D. Steinebrunner, G. Schnurpfeil, A. Wichmann, D. Wöhrle, A. Wittstock, Synergistic Effect in Zinc Phthalocyanine—Nanoporous Gold Hybrid Materials for Enhanced Photocatalytic Oxidations, *Catalysts.* 9 (2019) 555. doi:10.3390/catal9060555.
- [69] A.I. Ruiz-Carmuega, C. Garcia-Hernandez, J. Ortiz, C. Garcia-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, Á. Sastre-Santos, M.A. Rodríguez-Perez, M.L. Rodríguez-Mendez, Electrochemical sensors modified with combinations of sulfur containing phthalocyanines and capped gold nanoparticles: A study of the influence of the nature of the interaction between sensing materials, *Nanomaterials.* 9 (2019) 1506. doi:10.3390/nano9111506.
- [70] X. He, H.M. Hwang, Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 671–681. doi:10.1016/j.jfda.2016.06.001.
- [71] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures, *Anal. Chem.* 87 (2015) 230–249. doi:10.1021/ac5039863.
- [72] C. Medina-Plaza, *Sensor arrays for Enology applications: Using nanoscience for grape analysis*, University of Valladolid, 2016.
- [73] Y. Jiang, J. Wu, Recent development in chitosan nanocomposites for surface-based biosensor applications, *Electrophoresis.* 40 (2019) 2084–2097. doi:10.1002/elps.201900066.
- [74] J. V. Maciel, A.M.M. Durigon, M.M. Souza, R.F.N. Quadrado, A.R. Fajardo, D. Dias, Polysaccharides derived from natural sources applied to the development of chemically modified electrodes for environmental applications: A review, *Trends Environ. Anal. Chem.* 22 (2019) e00062. doi:10.1016/j.teac.2019.e00062.
- [75] C. Salvo-Comino, I. Rassas, S. Minot, F. Bessueille, M. Arab, V. Chevallier, M.L. Rodríguez-Mendez, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, Voltammetric sensor based on molecularly imprinted chitosan-carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles



- nanocomposite deposited on boron-doped diamond electrodes for catechol detection, *Materials* (Basel). 13 (2020) 1–11. doi:10.3390/ma13030688.
- [76] A. Sinha, Dhanjai, R. Jain, H. Zhao, P. Karolia, N. Jadon, Voltammetric sensing based on the use of advanced carbonaceous nanomaterials: a review, *Microchim. Acta.* 185 (2018) 1–30. doi:10.1007/s00604-017-2626-0.
- [77] R. Kour, S. Arya, S.-J. Young, V. Gupta, P. Bandhoria, A. Khosla, Review—Recent Advances in Carbon Nanomaterials as Electrochemical Biosensors, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020) 037555. doi:10.1149/1945-7111/ab6bc4.
- [78] F. Karimi, N. Zakariae, R. Esmaeili, M. Alizadeh, A.-M. Tamadon, Carbon Nanotubes for Amplification of Electrochemical Signal in Drug and Food Analysis; A Mini Review, *Curr. Biochem. Eng.* 6 (2020) 114–119. doi:10.2174/2212711906666200224110404.
- [79] H. Beitollahi, F. Movahedifar, S. Tajik, S. Jahani, A Review on the Effects of Introducing CNTs in the Modification Process of Electrochemical Sensors, *Electroanalysis.* 31 (2019) 1195–1203. doi:10.1002/elan.201800370.
- [80] R. Abdi, A. Ghorbani-HasanSaraei, H. Karimi-Maleh, S.N. Raeisi, F. Karimi, Determining caffeic acid in food samples using a voltammetric sensor amplified by Fe₃O₄ nanoparticles and room temperature ionic liquid, *Int. J. Electrochem. Sci.* 15 (2020) 2539–2548. doi:10.20964/2020.03.30.
- [81] F. Tahernejad-Javazmi, M. Shabani-Nooshabadi, H. Karimi-Maleh, 3D reduced graphene oxide/FeNi₃-ionic liquid nanocomposite modified sensor; an electrical synergic effect for development of tert-butylhydroquinone and folic acid sensor, *Compos. Part B Eng.* 172 (2019) 666–670. doi:10.1016/j.compositesb.2019.05.065.
- [82] S. Chaiyo, E. Mehmeti, W. Siangproh, T.L. Hoang, H.P. Nguyen, O. Chailapakul, K. Kalcher, Non-enzymatic electrochemical detection of glucose with a disposable paper-based sensor using a cobalt phthalocyanine–ionic liquid–graphene composite, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 113–120. doi:10.1016/j.bios.2017.11.015.
- [83] D. Wei, A. Ivaska, Applications of ionic liquids in electrochemical sensors, *Anal. Chim. Acta.* 607 (2008) 126–135. doi:10.1016/j.aca.2007.12.011.
- [84] M. Opallo, A. Lesniewski, A review on electrodes modified with ionic liquids, *J. Electroanal. Chem.* 656 (2011) 2–16. doi:10.1016/j.jelechem.2011.01.008.
- [85] F.H. Moser, A.L. Thomas, *The Phthalocyanines*, C.R.C. Press, Boca Ratón, Florida, 1983.
- [86] M.L. Rodríguez-Méndez, C. Apetrei, C. Medina-Plaza, R. Muñoz, J.A. De Saja, Sensor arrays based on phthalocyanines: New developments on nanostructured and biomimetic electrochemical sensors, in: *Multisens. Syst. Chem. Anal. Mater. Sensors*, C.R.C. Press, Boca Ratón, Florida, 2013: pp. 139–179. doi:10.4032/9789814411165.
- [87] H. Xu, H. Shang, C. Wang, Y. Du, Low-Dimensional Metallic Nanomaterials for Advanced Electrocatalysis, *Adv. Funct. Mater.* 30 (2020) 1–33. doi:10.1002/adfm.202006317.
- [88] C. Garcia-Hernandez, C. Medina-Plaza, C. Garcia-Cabezón, Y. Blanco, J.A. Fernandez-Escudero, E. Barajas-Tola, M.A. Rodríguez-Pérez, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Méndez, Monitoring the phenolic ripening of red grapes using a multisensor system based on metal-oxide nanoparticles, *Front. Chem.* 6 (2018) 1–8. doi:10.3389/fchem.2018.00131.
- [89] T. Islam, M.M. Hasan, A. Awal, M. Nurunnabi, A.J.S. Ahammad, Metal Nanoparticles for Electrochemical Sensing: Progress and Challenges in the Clinical Transition of Point-of-Care Testing, *Molecules.* 25 (2020) 8–13. doi:10.3390/molecules25245787.
- [90] Q. Zhao, M. Zhao, J. Qiu, W.Y. Lai, H. Pang, W. Huang, One Dimensional Silver-based



- Nanomaterials: Preparations and Electrochemical Applications, *Small*. 13 (2017) 1–18. doi:10.1002/smll.201701091.
- [91] S. Kurbanoglu, S.A. Ozkan, A Novel Enzymatic Biosensor for the Detection of Catechol Using Multi-walled Carbon Nanotubes and Gold Nanowires, *Electrocatalysis*. 9 (2018) 252–257. doi:10.1007/s12678-017-0408-4.
- [92] S.M. Abu Nayem, S. Shaheen Shah, N. Sultana, M.A. Aziz, A.J. Saleh Ahammad, Electrochemical Sensing Platforms of Dihydroxybenzene: Part 1 – Carbon Nanotubes, Graphene, and their Derivatives, *Chem. Rec.* 21 (2021) 1039–1072. doi:10.1002/tcr.202100043.
- [93] Y. Xie, T. Liu, Z. Chu, W. Jin, Recent advances in electrochemical enzymatic biosensors based on regular nanostructured materials, *J. Electroanal. Chem.* 893 (2021) 115328. doi:10.1016/j.jelechem.2021.115328.
- [94] J. Sabaté del Río, O.Y.F. Henry, P. Jolly, D.E. Ingber, An antifouling coating that enables affinity-based electrochemical biosensing in complex biological fluids, *Nat. Nanotechnol.* 14 (2019) 1143–1149. doi:10.1038/s41565-019-0566-z.
- [95] Y. Ye, J. Ji, Z. Sun, P. Shen, X. Sun, Recent advances in electrochemical biosensors for antioxidant analysis in foodstuff, *Trends Anal. Chem.* 122 (2020) 115718. doi:10.1016/j.trac.2019.115718.
- [96] A. Navaee, A. Salimi, *Enzyme-based electrochemical biosensors*, Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/B978-0-12-816491-4.00007-3.
- [97] R. Reiss, J. Ihssen, M. Richter, E. Eichhorn, B. Schilling, L. Thöny-Meyer, Laccase versus Laccase-Like Multi-Copper Oxidase: A Comparative Study of Similar Enzymes with Diverse Substrate Spectra, *PLoS One*. 8 (2013) e65633. doi:10.1371/journal.pone.0065633.
- [98] A.M. McMahon, E.M. Doyle, S. Brooks, K.E. O’Connor, Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1435–1441. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.10.020.
- [99] M.A. McGuirl, D.M. Dooley, Copper-containing oxidases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 138–144. doi:10.1016/S1367-5931(99)80025-8.
- [100] H. Fernández, F.J. Arévalo, A.M. Granero, S.N. Robledo, C.H.D. Nieto, W.I. Riberi, M.A. Zon, Electrochemical biosensors for the determination of toxic substances related to food safety developed in south America: Mycotoxins and herbicides, *Chemosensors*. 5 (2017) 1–20. doi:10.3390/chemosensors5030023.
- [101] D. Yang, *Fabricating third-generation lactose biosensors using cellobiose dehydrogenase on gold and glassy carbon electrodes*, 2017.
- [102] W. Putzbach, N.J. Ronkainen, Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review, *Sensors*. 13 (2013) 4811–4840. doi:10.3390/s130404811.
- [103] N. Kumara Swamy, S. Sandeep, A.S. Santhosh, Enzyme Immobilization Methods and Role of Conductive Polymers in Fabrication of Enzymatic Biosensors, 2 (2017) 1–5. doi:10.22607/IJACS.2017.S02001.
- [104] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: A review, *Adsorption*. 20 (2014) 801–821. doi:10.1007/s10450-014-9623-y.
- [105] R.N. Krishnaraj, R.K. Sani, *Bioelectrochemical interface engineering*, Wiley, 2019. doi:10.1002/9781119611103.
- [106] S. Khan, J.K. Goh, *Development of polymer-based chemical sensor to study the impact of*

- polymer concentration and freeze-thaw cycle on the detection of gallic acid, *Int. J. Electrochem. Sci.* 15 (2020) 2307–2325. doi:10.20964/2020.03.40.
- [107] A. Muhammad, N.A. Yusof, R. Hajian, J. Abdullah, Construction of an electrochemical sensor based on carbon nanotubes/gold nanoparticles for trace determination of amoxicillin in bovine milk, *Sensors*. 16 (2016) 1–13. doi:10.3390/s16010056.
- [108] Y. Yao, Y. Wen, J. Xu, L. Zhang, X. Duan, L. Lu, H. Xia, Poly(3,4-ethylenedioxythiophene): Poly(styrenesulfonate) composite electrode as sensing platform for the simultaneous electrochemical determination of dihydroxybenzene isomers, *Monatshefte Fur Chemie*. 145 (2014) 137–146. doi:10.1007/s00706-013-1003-x.
- [109] A. Maikap, K. Mukherjee, B. Mondal, N. Mandal, Zinc oxide thin film based nonenzymatic electrochemical sensor for the detection of trace level catechol, *RSC Adv.* 6 (2016) 64611–64616. doi:10.1039/c6ra09598d.
- [110] R. Rahmanian, S.A. Mozaffari, H.S. Amoli, M. Abedi, Development of sensitive impedimetric urea biosensor using DC sputtered Nano-ZnO on TiO₂ thin film as a novel hierarchical nanostructure transducer, *Sensors Actuators, B Chem.* 256 (2018) 760–774. doi:10.1016/j.snb.2017.10.009.
- [111] R. Ahmad, O.S. Wolfbeis, Y.B. Hahn, H.N. Alshareef, L. Torsi, K.N. Salama, Deposition of nanomaterials: A crucial step in biosensor fabrication, *Mater. Today Commun.* 17 (2018) 289–321. doi:10.1016/j.mtcomm.2018.09.024.
- [112] B.B. Song, Y.F. Zhen, H.Y. Yin, X.C. Song, Electrochemical Sensor Based on Platinum Nanoparticles Modified Graphite-Like Carbon Nitride for Detection of Phenol, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 19 (2019) 4020–4025. doi:10.1166/jnn.2019.16297.
- [113] A. Rengaraj, Y. Haldorai, C.H. Kwak, S. Ahn, K.J. Jeon, S.H. Park, Y.K. Han, Y.S. Huh, Electrodeposition of flower-like nickel oxide on CVD-grown graphene to develop an electrochemical non-enzymatic biosensor, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 6301–6309. doi:10.1039/c5tb00908a.
- [114] F.L. Migliorini, R.C. Sanfelice, L.A. Mercante, R.S. Andre, L.H.C. Mattoso, D.S. Correa, Urea impedimetric biosensing using electrospun nanofibers modified with zinc oxide nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 443 (2018) 18–23. doi:10.1016/j.apsusc.2018.02.168.
- [115] Q. Guo, M. Zhang, G. Zhou, L. Zhu, Y. Feng, H. Wang, B. Zhong, H. Hou, Highly sensitive simultaneous electrochemical detection of hydroquinone and catechol with three-dimensional N-doping carbon nanotube film electrode, *J. Electroanal. Chem.* 760 (2016) 15–23. doi:10.1016/j.jelechem.2015.11.034.
- [116] U. Rajaji, A. Muthumariappan, S.M. Chen, T.W. Chen, T.W. Tseng, K. Wang, D. Qi, J. Jiang, Facile sonochemical synthesis of porous and hierarchical manganese(III) oxide tiny nanostructures for super sensitive electrocatalytic detection of antibiotic (chloramphenicol) in fresh milk, *Ultrason. Sonochem.* 58 (2019) 104648. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104648.
- [117] P. Rocha, Â. Vilas-Boas, N. Fontes, D. Geraldo, F. Bento, Evaluation of Polyphenols in Wine by Voltammetric Techniques with Screen Printed Carbon Electrodes, *Electroanalysis*. 32 (2020) 159–165. doi:10.1002/elan.201900392.
- [118] Y. Li, S. Feng, Y. Zhong, Y. Li, S. Li, Simultaneous and Highly Sensitive Determination of Hydroquinone and Catechol Using Carboxyl Functionalized Graphene Self-Assembled Monolayers, *Electroanalysis*. 27 (2015) 2221–2229. doi:10.1002/elan.201500114.
- [119] X.P. Ji, X.R. Li, N. Wang, R.X. Ni, X.H. Liu, H.A. Xiong, Attachment of tyrosinase on mixed self-assembled monolayers for the construction of electrochemical biosensor, *Chinese Chem. Lett.* 21 (2010) 1239–1242. doi:10.1016/j.ccllet.2010.05.022.



- [120] C. Cheng, Y. Peng, J. Bai, X. Zhang, Y. Liu, X. Fan, B. Ning, Z. Gao, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in milk by self-assembled electrochemical immunosensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 190 (2014) 900–906. doi:10.1016/j.snb.2013.09.041.
- [121] K. Ariga, T. Nakanishi, T. Michinobu, Immobilization of biomaterials to nano-assembled films (self-assembled monolayers, langmuir-blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 2278–2301. doi:10.1166/jnn.2006.503.
- [122] E.G.R. Fernandes, L.C. Brazaca, M.L. Rodríguez-Mendez, J.A. de Saja, V. Zucolotto, Immobilization of lutetium bisphthalocyanine in nanostructured biomimetic sensors using the LbL technique for phenol detection, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4715–4719. doi:10.1016/j.bios.2011.05.032.
- [123] M. David, M.M. Barsan, C.M.A. Brett, M. Florescu, Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Sensors Actuators, B Chem.* 255 (2018) 3227–3234. doi:10.1016/j.snb.2017.09.149.
- [124] P.P. Campos, M.L. Moraes, D. Volpati, P.B. Miranda, O.N. Oliveira, M. Ferreira, Amperometric detection of lactose using α -galactosidase immobilized in layer-by-layer films, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 11657–11664. doi:10.1021/am5024463.
- [125] D.R. Bagal-Kestwal, B.H. Chiang, Exploration of chitinous scaffold-based interfaces for glucose sensing assemblies, *Polymers (Basel)*. 11 (2019) 1–36. doi:10.3390/polym11121958.
- [126] C. Jiang, Y. Yao, Y. Cai, J. Ping, All-solid-state potentiometric sensor using single-walled carbon nanohorns as transducer, *Sensors Actuators B Chem.* 283 (2019) 284–289. doi:10.1016/J.SNB.2018.12.040.
- [127] M.M. Barsan, C.M.A. Brett, Recent advances in layer-by-layer strategies for biosensors incorporating metal nanoparticles, *Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 286–296. doi:10.1016/j.trac.2015.11.019.
- [128] M.L. Rodríguez-Méndez, C. Medina-Plaza, C. García-Hernández, S. Rodríguez, C. García-Cabezón, D. Paniagua, M.A. Rodríguez-Pérez, J.A. De Saja, Improvement of electrocatalytic effect in voltammetric sensors based on phthalocyanines, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 20 (2016) 413–420. doi:10.1142/S1088424616500218.
- [129] S.K. Sharma, R. Singhal, B.D. Malhotra, N. Sehgal, A. Kumar, Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of galactose in milk, *Electrochim. Acta.* 49 (2004) 2479–2485. doi:10.1016/j.electacta.2004.01.024.
- [130] K.H. Wang, M.J. Syu, C.H. Chang, Y.L. Lee, Immobilization of glucose oxidase by Langmuir-Blodgett technique for fabrication of glucose biosensors: Headgroup effects of template monolayers, *Sensors Actuators, B Chem.* 164 (2012) 29–36. doi:10.1016/j.snb.2012.01.056.
- [131] M. Dabrowski, P. Lach, M. Cieplak, W. Kutner, Nanostructured molecularly imprinted polymers for protein chemosensing, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 17–26. doi:10.1016/j.bios.2017.10.045.
- [132] X. Zhao, L. Chen, B. Li, Magnetic molecular imprinting polymers based on three-dimensional (3D) graphene-carbon nanotube hybrid composites for analysis of melamine in milk powder, *Food Chem.* 255 (2018) 226–234. doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.078.
- [133] F. Zouaoui, S. Bourouina-Bacha, M. Bourouina, N. Jaffrezic-Renault, N. Zine, A. Errachid, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted chitosan: A review, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 130 (2020) 115982. doi:10.1016/j.trac.2020.115982.

- [134] J. Chen, H. Lian, X. Sun, B. Liu, Development of a chitosan molecularly imprinted electrochemical sensor for trichlorophon determination, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92 (2012) 1046–1058. doi:10.1080/03067319.2010.496054.
- [135] C. Zhao, G.P. Jin, L.L. Chen, Y. Li, B. Yu, Preparation of molecular imprinted film based on chitosan/nafion/nano- silver/poly quercetin for clenbuterol sensing, *Food Chem.* 129 (2011) 595–600. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.072.
- [136] H.X. Li, W. Yao, Q. Wu, W.S. Xia, Glucose molecularly imprinted electrochemical sensor based on chitosan and nickel oxide electrode, *Adv. Mater. Res.* 1052 (2014) 215–219. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.1052.215.
- [137] Y.P. Chen, B. Liu, H.T. Lian, X.Y. Sun, Preparation and Application of Urea Electrochemical Sensor Based on Chitosan Molecularly Imprinted Films, *Electroanalysis.* 23 (2011) 1454–1461. doi:10.1002/elan.201000693.
- [138] C. Salvo-Comino, I. Rassas, S. Minot, F. Bessueille, M.L. Rodriguez-Mendez, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, Voltammetric sensor based on electrodeposited molecularly imprinted chitosan film on BDD electrodes for catechol detection in buffer and in wine samples, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020) 110667. doi:10.1016/j.msec.2020.110667.
- [139] W. Du Toit, A. Oberholster, Antioxidants in Wine during Fermentation, in: *Process. Impact Antioxidants Beverages*, Academic Press, 2014: pp. 59–67. doi:10.1016/B978-0-12-404738-9.00007-6.
- [140] M. Šeruga, I. Novak, L. Jakobek, Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chem.* 124 (2011) 1208–1216. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.047.
- [141] C. Bleotu, C. Mambet, L. Matei, L.D. Dragu, Improving wine quality and safety through nanotechnology applications, in: *Nanoeng. Beverage Ind. Vol. 20 Sci. Beverages*, Elsevier Inc., 2019: pp. 437–458. doi:10.1016/B978-0-12-816677-2.00015-6.
- [142] R. Ramya, M. V. Sangaranarayanan, Polypyrrole microfibres synthesized with Quillaja Saponin for sensing of catechol, *Sensors Actuators, B Chem.* 173 (2012) 40–51. doi:10.1016/j.snb.2012.05.034.
- [143] C. Medina-Plaza, C. García-Hernández, J.A. de Saja, J.A. Fernández-Escudero, E. Barajas, G. Medrano, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes, *LWT - Food Sci. Technol.* 62 (2015) 940–947. doi:10.1016/j.lwt.2015.02.027.
- [144] K. Pandian, D. Mohana Soundari, P. Rudra Showdri, J. Kalaiyarasi, S.C.B. Gopinath, Voltammetric determination of caffeic acid by using a glassy carbon electrode modified with a chitosan-protected nanohybrid composed of carbon black and reduced graphene oxide, *Microchim. Acta.* 186 (2019) 1–9. doi:10.1007/s00604-018-3117-7.
- [145] Ç.C. Koçak, Ş.U. Karaberoğlu, Z. Dursun, Highly sensitive determination of gallic acid on poly (L-Methionine)-carbon nanotube composite electrode, *J. Electroanal. Chem.* 853 (2019) 113552. doi:10.1016/j.jelechem.2019.113552.
- [146] E.F. Newair, P.A. Kilmartin, F. Garcia, Square wave voltammetric analysis of polyphenol content and antioxidant capacity of red wines using glassy carbon and disposable carbon nanotubes modified screen-printed electrodes, *Eur. Food Res. Technol.* 244 (2018) 1225–1237. doi:10.1007/s00217-018-3038-z.
- [147] Y. Fu, Y. Lin, T. Chen, L. Wang, Study on the polyfurfural film modified glassy carbon



- electrode and its application in polyphenols determination, *J. Electroanal. Chem.* 687 (2012) 25–29. doi:10.1016/j.jelechem.2012.09.040.
- [148] V. Parra, Á.A. Arrieta, J.A. Fernández-Escudero, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. De Saja, Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines, *Sensors Actuators, B Chem.* 118 (2006) 448–453. doi:10.1016/j.snb.2006.04.043.
- [149] O. Domínguez-Renedo, A.M. Navarro-Cuñado, V. Arnáiz-Lozano, M.A. Alonso-Lomillo, Molecularly imprinted polypyrrole based electrochemical sensor for selective determination of 4-ethylphenol, *Talanta.* 207 (2020) 120351. doi:10.1016/j.talanta.2019.120351.
- [150] M. Gay Martín, J.A. de Saja, R. Muñoz, M.L. Rodríguez-Méndez, Multisensor system based on bisphthalocyanine nanowires for the detection of antioxidants, *Electrochim. Acta.* 68 (2012) 88–94. doi:10.1016/J.ELECTACTA.2012.02.042.
- [151] H. Wu, Z. Chen, L. Guo, Y. Wang, S. Du, Y. Wu, Z. Ren, Direct Coupling of Phthalocyanine Cobalt(II) and Graphene via Self-Driven Layer-by-Layer Assembly for Efficient Electrochemical Detection of Catechol, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020) 027533. doi:10.1149/1945-7111/ab6c54.
- [152] B.R. Patel, M. Noroozifar, K. Kerman, Review—Nanocomposite-Based Sensors for Voltammetric Detection of Hazardous Phenolic Pollutants in Water, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020) 037568. doi:10.1149/1945-7111/ab71fa.
- [153] V. Carralero Sanz, M.L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines, *Anal. Chim. Acta.* 528 (2005) 1–8. doi:10.1016/J.ACA.2004.10.007.
- [154] J. Zhao, J. Zhi, Y. Zhou, W. Yan, A tyrosinase biosensor based on ZnO nanorod clusters/nanocrystalline diamond electrodes for biosensing of phenolic compounds, *Anal. Sci.* 25 (2009) 1083–1088. doi:10.2116/analsci.25.1083.
- [155] K.R. Rogers, J.Y. Becker, J. Cembrano, Improved selective electrocatalytic oxidation of phenols by tyrosinase-based carbon paste electrode biosensor, *Electrochim. Acta.* 45 (2000) 4373–4379. doi:10.1016/S0013-4686(00)00544-2.
- [156] M. Rita Montoreali, W. Vastarella, L. Della Seta, R. Pilloton, Tyrosinase biosensor based on modified screen printed electrodes: Measurements of total phenol content, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85 (2005) 795–806. doi:10.1080/03067310500149775.
- [157] A. Boshoff, W. Edwards, W.D. Leukes, P.D. Rose, S.G. Burton, Immobilisation of polyphenol oxidase on nylon and polyethersulphone membranes: effect on product formation, *Desalination.* 115 (1998) 307–312. doi:10.1016/S0011-9164(98)00050-2.
- [158] S. Campuzano, B. Serra, M. Pedrero, F.J.M. De Villena, J.M. Pingarrón, Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors, *Anal. Chim. Acta.* 494 (2003) 187–197. doi:10.1016/S0003-2670(03)00919-X.
- [159] P. Alessio, C.S. Martín, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Mimetic biosensors composed by layer-by-layer films of phospholipid, phthalocyanine and silver nanoparticles to polyphenol detection, *Sensors Actuators B Chem.* 233 (2016) 654–666. doi:10.1016/j.snb.2016.04.139.
- [160] C. Medina-Plaza, L.N. Furini, C.J.L. Constantino, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Synergistic electrocatalytic effect of nanostructured mixed films formed by functionalised gold nanoparticles and bisphthalocyanines, *Anal. Chim. Acta.* 851 (2014) 95–102.

- doi:10.1016/j.aca.2014.08.049.
- [161] J. Cabaj, J. Sołoducho, A. Nowakowska-Oleksy, Langmuir–Blodgett film based biosensor for estimation of phenol derivatives, *Sensors Actuators B Chem.* 143 (2010) 508–515. doi:10.1016/J.SNB.2009.09.047.
- [162] F.J. Pavinatto, E.G.R. Fernandes, P. Alessio, C.J.L. Constantino, J.A. De Saja, V. Zucolotto, C. Apetrei, O.N. Oliveira, M.L. Rodriguez-Mendez, Optimized architecture for Tyrosinase-containing Langmuir-Blodgett films to detect pyrogallol, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 4995–5003. doi:10.1039/c0jm03864d.
- [163] V. Zucolotto, K.R.P. Daghanli, C.O. Hayasaka, A. Riul, P. Ciancaglini, O.N. Oliveira, Using Capacitance Measurements as the Detection Method in Antigen-Containing Layer-by-Layer Films for Biosensing, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2163–2167. doi:10.1021/ac0616153.
- [164] R. Gonzalez-Anton, M.M. Osipova, C. Garcia-Hernandez, T.V. Dubinina, L.G. Tomilova, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodriguez-Mendez, Subphthalocyanines as electron mediators in biosensors based on phenol oxidases: Application to the analysis of red wines, *Electrochim. Acta.* 255 (2017) 239–247. doi:10.1016/J.ELECTACTA.2017.09.168.
- [165] A. Herrera-Chacon, A. González-Calabuig, I. Campos, M. del Valle, Bioelectronic tongue using MIP sensors for the resolution of volatile phenolic compounds, *Sensors Actuators, B Chem.* 258 (2018) 665–671. doi:10.1016/j.snb.2017.11.136.
- [166] F. Krampa, Y. Aniweh, G. Awandare, P. Kanyong, F.D. Krampa, Y. Aniweh, G.A. Awandare, P. Kanyong, A Disposable Amperometric Sensor Based on High-Performance PEDOT:PSS/Ionic Liquid Nanocomposite Thin Film-Modified Screen-Printed Electrode for the Analysis of Catechol in Natural Water Samples, *Sensors.* 17 (2017) 1716. doi:10.3390/s17081716.
- [167] K. He, X. Wang, X. Meng, H. Zheng, S. Suye, Amperometric determination of hydroquinone and catechol on gold electrode modified by direct electrodeposition of poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Sensors Actuators B Chem.* 193 (2014) 212–219. doi:10.1016/J.SNB.2013.11.055.
- [168] J. Zhang, J. Xu, Y. Wen, Z. Wang, H. Zhang, W. Ding, Voltammetric determination of phytoinhibitor maleic hydrazide using PEDOT:PSS composite electrode, *J. Electroanal. Chem.* 751 (2015) 65–74. doi:10.1016/j.jelechem.2015.05.032.
- [169] C. Garcia-Hernandez, C. Salvo Comino, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodriguez-Mendez, C. Garcia-Cabezón, Impedimetric electronic tongue based on nanocomposites for the analysis of red wines. Improving the variable selection method, *Sensors Actuators, B Chem.* 277 (2018) 365–372. doi:10.1016/j.snb.2018.09.023.
- [170] M.L. Yola, V.K. Gupta, N. Atar, New molecular imprinted voltammetric sensor for determination of ochratoxin A, *Mater. Sci. Eng. C.* 61 (2016) 368–375. doi:10.1016/j.msec.2015.12.057.
- [171] S. Fu, Y. Zhu, Y. Zhang, M. Zhang, Y. Zhang, L. Qiao, N. Yin, K. Song, M. Liu, D. Wang, Recent advances in carbon nanomaterials-based electrochemical sensors for phenolic compounds detection, *Microchem. J.* 171 (2021) 106776. doi:10.1016/J.MICROC.2021.106776.
- [172] M.L. Rodriguez-Méndez, M. Gay, J.A. de Saja, New insights into sensors based on radical bisphthalocyanines, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 13 (2009) 1159–1167. doi:10.1142/S1088424609001509.
- [173] P. Alessio, F.J. Pavinatto, O.N. Oliveira, J.A. De Saja Saez, C.J.L. Constantino, M.L. Rodriguez-Mendez, Detection of catechol using mixed Langmuir-Blodgett films of a



- phospholipid and phthalocyanines as voltammetric sensors, *Analyst*. 135 (2010) 2591–2599. doi:10.1039/c0an00159g.
- [174] O. Koyun, S. Gorduk, M. Gencten, Y. Sahin, A novel copper(II) phthalocyanine-modified multiwalled carbon nanotube-based electrode for sensitive electrochemical detection of bisphenol A, *New J. Chem.* 43 (2018) 85–92. doi:10.1039/C8NJ03721C.
- [175] A. Arrieta, M.L. Rodríguez-Mendez, J.A. De Saja, Langmuir-Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste, *Sensors Actuators, B Chem.* 95 (2003) 357–365. doi:10.1016/S0925-4005(03)00438-6.
- [176] F. Matemadombo, C. Apetrei, T. Nyokong, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. de Saja, Comparison of carbon screen-printed and disk electrodes in the detection of antioxidants using CoPc derivatives, *Sensors Actuators B Chem.* 166 (2012) 457–466. doi:10.1016/j.snb.2012.02.088.
- [177] C. Apetrei, P. Alessio, C.J.L. Constantino, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Mendez, F.J. Pavinatto, G.R. Fernandes, V. Zucolotto, O.N. Oliveira, Biomimetic biosensor based on lipidic layers containing tyrosinase and lutetium bisphthalocyanine for the detection of antioxidants, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2513–2519. doi:10.1016/j.bios.2010.10.047.
- [178] C. Medina-Plaza, J.A. de Saja, J.A. Fernández-Escudero, E. Barajas, G. Medrano, M.L. Rodríguez-Mendez, Array of biosensors for discrimination of grapes according to grape variety, vintage and ripeness, *Anal. Chim. Acta.* 947 (2016) 16–22. doi:10.1016/j.aca.2016.10.032.
- [179] V. Parra, T. Hernando, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. De Saja, Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified carbon paste electrodes for discrimination of red wines, *Electrochim. Acta.* 49 (2004) 5177–5185. doi:10.1016/J.ELECTACTA.2004.06.031.
- [180] M. Gay, C. Apetrei, I. Nevares, M. Del Alamo, J. Zurro, N. Prieto, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine, *Electrochim. Acta.* 55 (2010) 6782–6788. doi:10.1016/j.electacta.2010.05.090.
- [181] M.L. Rodríguez-Mendez, C. García-Hernandez, C. Medina-Plaza, C. García-Cabezón, J.A. De Saja, Multisensor systems based on phthalocyanines for monitoring the quality of grapes, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 20 (2016) 889–894. doi:10.1142/S1088424616500796.
- [182] L.P. Souza, F. Calegari, A.J.G. Zarbin, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, Voltammetric Determination of the Antioxidant Capacity in Wine Samples Using a Carbon Nanotube Modified Electrode, *J Agric Food Chem.* 59 (2011) 7620–5. doi:10.1021/jf2005589.
- [183] A. Sánchez Arribas, M. Martínez-Fernández, M. Moreno, E. Bermejo, A. Zapardiel, M. Chicharro, Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes, *Food Chem.* 136 (2013) 1183–1192. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.027.
- [184] N.F. Atta, A. Galal, A.R.M. El-Gohary, Novel method of one pot preparation of thiourea self-assembled monolayers over gold nanoparticles-carbon nanotubes composite for sensing application of phenolic compounds, *J. Electroanal. Chem.* 902 (2021) 115795. doi:10.1016/J.JELECHEM.2021.115795.
- [185] C. García-Hernández, C. García-Cabezón, C. Medina-Plaza, F. Martín-Pedrosa, Y. Blanco, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Electrochemical behavior of polypyrrol/AuNP composites deposited by different electrochemical methods: sensing



- properties towards catechol, Beilstein J. Nanotechnol. 6 (2015) 2052–2061. doi:10.3762/bjnano.6.209.
- [186] T.C. Canevari, P.A. Raymundo-Pereira, R. Landers, S.A.S. Machado, Direct synthesis of Ag nanoparticles incorporated on a mesoporous hybrid material as a sensitive sensor for the simultaneous determination of dihydroxybenzenes isomers, Eur. J. Inorg. Chem. (2013) 5746–5754. doi:10.1002/ejic.201300879.
- [187] Y. Zhang, X. Li, D. Li, Q. Wei, A laccase based biosensor on AuNPs-MoS₂ modified glassy carbon electrode for catechol detection, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 186 (2020) 110683. doi:10.1016/J.COLSURFB.2019.110683.
- [188] L.A. Dinu Gugoasa, F. Pogacean, S. Kurbanoglu, L.-B. Tudoran, A.B. Serban, I. Kacso, S. Pruneanu, Graphene-Gold Nanoparticles Nanozyme-Based Electrochemical Sensor with Enhanced Laccase-Like Activity for Determination of Phenolic Substrates, J. Electrochem. Soc. 168 (2021) 067523. doi:10.1149/1945-7111/ac0c32.
- [189] X. Liu, R. Yan, J. Zhu, J. Zhang, X. Liu, Growing TiO₂ nanotubes on graphene nanoplatelets and applying the nanocomposite as scaffold of electrochemical tyrosinase biosensor, Sensors Actuators B Chem. 209 (2015) 328–335. doi:10.1016/J.SNB.2014.11.124.
- [190] İ. Polatoğlu, Electrochemical Sensing Platform Based on Tyrosinase Immobilized Magnetite Chitosan Nanobiocomposite Film and Its Application as Catechol Biosensor, J. Electrochem. Soc. 166 (2019) B1620–B1629. doi:10.1149/2.1041915jes.
- [191] M.T. Laranjo, F.M. Morawski, S.L.P. Dias, E. V. Benvenuti, L.T. Arenas, T.M.H. Costa, Silica/titania graphite composite modified with chitosan and tyrosinase employed as a sensitive biosensor for phenolic compounds, J. Braz. Chem. Soc. 30 (2019) 2660–2671. doi:10.21577/0103-5053.20190190.
- [192] Y. Shen, D. Rao, Q. Sheng, J. Zheng, Simultaneous voltammetric determination of hydroquinone and catechol by using a glassy carbon electrode modified with carboxy-functionalized carbon nanotubes in a chitosan matrix and decorated with gold nanoparticles, Microchim. Acta. 184 (2017) 3591–3601. doi:10.1007/s00604-017-2392-z.
- [193] T. Kokulnathan, N. Raja, S.-M. Chen, R. Sukanya, B. Thirumalraj, Chitosan Stabilized Multi-Walled Carbon Nanotubes for Electrochemical Determination of Dihydroxybenzene Isomers, J. Electrochem. Soc. 164 (2017) H958–H966. doi:10.1149/2.1571713jes.
- [194] J. Adamski, J. Kochana, P. Nowak, A. Parczewski, On the electrochemical biosensing of phenolic compounds in wines, J. Food Compos. Anal. 46 (2016) 1–6. doi:10.1016/j.jfca.2015.10.010.
- [195] A. Valero Diaz, R.M. Garcia Gimeno, The Dairy Industry, in: Descr. Food Sci., IntechOpen, 2018: p. 182. doi:http://dx.doi.org/105772/intechopen.73156.
- [196] J. Minj, A. Sudhakaran, A. Kumari, Dairy Processing: Advanced Research to Applications, Springer Singapore, 2020. doi:10.1007/978-981-15-2608-4.
- [197] G. Smit, Dairy Processing: Improving Quality, 1^o Edition, Elsevier, 2003. doi:10.1533/9781855737075.
- [198] A.Y. Tamime, Milk Processing and Quality Management, 2009. doi:10.1002/9781444301649.
- [199] L. Wang, D.W. Sun, H. Pu, J.H. Cheng, Quality analysis, classification, and authentication of liquid foods by near-infrared spectroscopy: A review of recent research developments, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 57 (2017) 1524–1538. doi:10.1080/10408398.2015.1115954.



- [200] J.A. Ohlsson, M. Johansson, H. Hansson, A. Abrahamson, L. Byberg, A. Smedman, H. Lindmark-Månsson, Å. Lundh, Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products, *Int. Dairy J.* 73 (2017) 151–154. doi:10.1016/j.idairyj.2017.06.004.
- [201] Z. Zhu, W. Guo, Recent developments on rapid detection of main constituents in milk: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61 (2021) 312–324. doi:10.1080/10408398.2020.1731417.
- [202] N.S. Prinith, J.G. Manjunatha, G. Tigari, Z.A. ALOthman, A.M. Alanazi, A. Pandith, Mechanistic Insights into the Voltammetric Determination of Riboflavin at Poly (Serine) Modified Graphite and Carbon Nanotube Composite Paste Electrode, *ChemistrySelect.* 6 (2021) 10746–10757. doi:10.1002/slct.202103184.
- [203] Y. Chen, G.I.N. Waterhouse, X. Qiao, Y. Sun, Z. Xu, Sensitive analytical detection of nitrite using an electrochemical sensor with STAB-functionalized Nb₂C@MWCNTs for signal amplification, *Food Chem.* 372 (2022) 131356. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.131356.
- [204] M. Mehmandoust, N. Erk, M. Alizadeh, S. Salmanpour, Voltammetric carbon nanotubes based sensor for determination of tryptophan in the milk sample, *J. Food Meas. Charact.* 15 (2021) 5288–5295. doi:10.1007/s11694-021-01100-8.
- [205] E.F. Amaral, D.N. da Silva, M.C. Silva, A.C. Pereira, Development of an Electrochemical Sensor Based on Nanocomposite of Fe₃O₄@SiO₂ and Multiwalled Carbon Nanotubes for Determination of Tetracycline in Real Samples, *Electrochem.* 2 (2021) 251–263. doi:10.3390/electrochem2020018.
- [206] G. Meurant, *Handbook of Milk Composition*, Elsevier, San Diego, California, 1995.
- [207] M. Artigues, J. Abellà, S. Colominas, Analytical parameters of an amperometric glucose biosensor for fast analysis in food samples, *Sensors.* 17 (2017). doi:10.3390/s17112620.
- [208] N. Kotia, N. Vasileva, Biosensors for determination of lactose by immobilized beta-galactosidase : A Review, *Sci. Pap. Univ. Russ.* 49 (2010) 23–30.
- [209] P. Kanyong, F.D. Krampa, Y. Aniweh, G.A. Awandare, Enzyme-based amperometric galactose biosensors: a review, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 3663–3671. doi:10.1007/s00604-017-2465-z.
- [210] M. Filipiak, K. Fludra, E. Gościmińska, Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 355–364. doi:10.1016/0956-5663(96)82731-X.
- [211] J.A. Hamid, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, Flow-through multi-enzyme electrodes for the determination of lactose, *Analyst.* 114 (1989) 1587–1592. doi:10.1039/AN9891401587.
- [212] F. Winquist, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström, Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry, *Meas. Sci. Technol.* 9 (1998) 1937–1946. doi:10.1088/0957-0233/9/12/002.
- [213] S.K. Sharma, Suman, C.S. Pundir, N. Sehgal, A. Kumar, Galactose sensor based on galactose oxidase immobilized in polyvinyl formal, *Sensors Actuators B Chem.* 119 (2006) 15–19. doi:10.1016/J.SNB.2005.11.046.
- [214] M. Tessema, T. Ruzgas, L. Gorton, T. Ikeda, Flow injection amperometric determination of glucose and some other low molecular weight saccharides based on oligosaccharide dehydrogenase mediated by benzoquinone systems, *Anal. Chim. Acta.* 310 (1995) 161–171. doi:10.1016/0003-2670(95)00111-C.
- [215] P. Gallay, M. Rodríguez, M. Eguílaz, G. Rivas, Doble role of bathocuproine disulfonic

- acid as multi-walled carbon nanotubes dispersing agent and copper preconcentration ligand: Analytical applications for the development of hydrogen peroxide and glucose electrochemical sensors, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 191 (2020) 113526. doi:10.1016/j.jpba.2020.113526.
- [216] B. Çakıroğlu, Y.C. Demirci, E. Gökgöz, M. Özacar, A photoelectrochemical glucose and lactose biosensor consisting of gold nanoparticles, MnO₂ and g-C₃N₄ decorated TiO₂, *Sensors Actuators, B Chem.* 282 (2019) 282–289. doi:10.1016/j.snb.2018.11.064.
- [217] N.C. Ricardi, E.W. de Menezes, E. Valmir Benvenuti, J. da Natividade Schöffer, C.R. Hackenhaar, P.F. Hertz, T.M.H. Costa, Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology, *Food Chem.* 246 (2018) 343–350. doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.026.
- [218] M. Eguílaz, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, N.F. Ferreyra, G.A. Rivas, Functionalization of bamboo-like carbon nanotubes with 3-mercaptophenylboronic acid-modified gold nanoparticles for the development of a hybrid glucose enzyme electrochemical biosensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 216 (2015) 629–637. doi:10.1016/j.snb.2015.03.112.
- [219] P. Salazar, I. Fernández, M.C. Rodríguez, A. Hernández-Creus, J.L. González-Mora, One-step green synthesis of silver nanoparticle-modified reduced graphene oxide nanocomposite for H₂O₂ sensing applications, *J. Electroanal. Chem.* 855 (2019) 113638. doi:10.1016/j.jelechem.2019.113638.
- [220] T.C. Gokoglan, M. Kesik, S. Soylemez, R. Yuksel, H.E. Unalan, L. Toppare, Paper Based Glucose Biosensor Using Graphene Modified with a Conducting Polymer and Gold Nanoparticles, *J. Electrochem. Soc.* 164 (2017) G59–G64. doi:10.1149/2.0791706JES/XML.
- [221] Z. Yin, J. Zhi, A photoelectrochemical biosensor based on the direct electron transfer to galactose oxidase, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 397 (2020) 112560. doi:10.1016/J.JPHOTOCHEM.2020.112560.
- [222] S. Palanisamy, C. Karuppiyah, S.M. Chen, Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite modified electrode, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 114 (2014) 164–169. doi:10.1016/J.COLSURFB.2013.10.006.
- [223] X. Zhang, D. Liu, L. Li, T. You, Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase on Novel Free-Standing Nitrogen-Doped Carbon Nanospheres@Carbon Nanofibers Composite Film, *Sci. Reports* 2015 51. 5 (2015) 1–11. doi:10.1038/srep09885.
- [224] J.H.T. Luong, J.D. Glennon, A. Gedanken, S.K. Vashist, Achievement and assessment of direct electron transfer of glucose oxidase in electrochemical biosensing using carbon nanotubes, graphene, and their nanocomposites, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 369–388. doi:10.1007/s00604-016-2049-3.
- [225] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A.I. Yaropolov, J.W. Whittaker, L. Gorton, Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2517–2554. doi:10.1016/J.BIOS.2004.10.003.
- [226] C. Figueiredo, A.L. De Lacey, M. Pita, Electrochemical studies of galactose oxidase, *Electrochem. Sci. Adv.* (2021) e2100171. doi:10.1002/ELSA.202100171.
- [227] A.R. de Brito, N. dos Santos Reis, P.C. Oliveira, D.V.B. Rezende, G.P. Monteiro, G.A. Soares, R.S. de Jesus, A.S. Santos, L.C. Salay, J.R. de Oliveira, M. Franco, Development of amperometric biosensor in modified carbon paste with enzymatic preparation based on lactase immobilized on carbon nanotubes, *J. Food Sci. Technol.* 57 (2020) 1342–1350. doi:10.1007/s13197-019-04168-9.



- [228] P. Bollella, L. Gorton, Enzyme based amperometric biosensors, *Curr. Opin. Electrochem.* 10 (2018) 157–173. doi:10.1016/J.COEELEC.2018.06.003.
- [229] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'Amico, Nonspecific sensor arrays (“electronic tongue”) for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 77 (2005) 1965–1983. doi:10.1351/pac200577111965.
- [230] K. Persaud, Electronic Noses and Tongues in the Food Industry, in: *Electron. Noses Tongues Food Sci.*, Elsevier Inc., 2016: pp. 3–14. doi:10.1016/B978-0-12-800243-8.00001-9.
- [231] Y. Tahara, K. Toko, Electronic tongues-a review, *IEEE Sens. J.* 13 (2013) 3001–3011. doi:10.1109/JSEN.2013.2263125.
- [232] E.I. Geană, C.T. Ciucure, C. Apetrei, Electrochemical Sensors Coupled with Multivariate Statistical Analysis as Screening Tools for Wine Authentication Issues: A Review, *Chemosensors.* 8 (2020) 59. doi:10.3390/CHEMOSENSORS8030059.
- [233] L. Moreno I Codinachs, J.P. Kloock, M.J. Schöning, A. Baldi, A. Ipatov, A. Bratov, C. Jiménez-Jorquera, Electronic integrated multisensor tongue applied to grape juice and wine analysis, *Analyst.* 133 (2008) 1440–1448. doi:10.1039/B801228H.
- [234] C. Garcia-Hernandez, C. Garcia-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, 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. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2019.03.107.
- [235] Q. Wang, M. Del Valle, Determination of Chemical Oxygen Demand (COD) Using Nanoparticle-Modified Voltammetric Sensors and Electronic Tongue Principles, *Chemosensors.* 9 (2021) 46. doi:10.3390/CHEMOSENSORS9030046.
- [236] T.A. da Silva, M.L. Braunger, M.A.N. Coutinho, L.R. do Amaral, V. Rodrigues, A. Riul, 3D-Printed Graphene Electrodes Applied in an Impedimetric Electronic Tongue for Soil Analysis, *Chemosensors.* 7 (2019) 50. doi:10.3390/CHEMOSENSORS7040050.
- [237] P. Skládal, Smart bioelectronic tongues for food and drinks control, *Trends Anal. Chem.* 127 (2020) 115887. doi:10.1016/J.TRAC.2020.115887.
- [238] T. Wasilewski, W. Kamysz, J. Gębicki, Bioelectronic tongue: Current status and perspectives, *Biosens. Bioelectron.* 150 (2020) 111923. doi:10.1016/j.bios.2019.111923.
- [239] C. Garcia-Cabezón, G.G. Teixeira, L.G. Dias, C. Salvo-Comino, C. García-Hernandez, M.L. Rodríguez-Mendez, F. Martín-Pedrosa, Analysis of Phenolic Content in Grape Seeds and Skins by Means of a Bio-Electronic Tongue, *Sensors.* 20 (2020) 4176. doi:10.3390/S20154176.
- [240] A. Riul, C.A.R. Dantas, C.M. Miyazaki, O.N. Oliveira, Recent advances in electronic tongues, *Analyst.* 135 (2010) 2481–2495. doi:10.1039/C0AN00292E.
- [241] P. Ciosek, E. Augustyniak, W. Wróblewski, Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitive electrode-based electronic tongue for qualitative analysis of beverages, *Analyst.* 129 (2004) 639–644. doi:10.1039/b401390e.
- [242] Sain S, V. V, The Nature of Statistical Learning Theory, *Technometrics.* 38 (1996) 409. doi:10.2307/1271324.
- [243] Á.A. Arrieta, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. De Saja, Voltametric electronic tongue application to wines classification and correlation study with the chemical and sensory characterization, *Quim. Nova.* 33 (2010) 787–793. doi:10.1590/s0100-40422010000400004.
- [244] K. Persaud, Electronic Noses and Tongues in the Food Industry, *Electron. Noses Tongues*

- Food Sci. (2016) 1–12. doi:10.1016/B978-0-12-800243-8.00001-9.
- [245] M. Gutiérrez-Capitán, J.L. Santiago, J. Vila-Planas, A. Llobera, S. Boso, P. Gago, M.C. Martínez, C. Jiménez-Jorquera, Classification and Characterization of Different White Grape Juices by Using a Hybrid Electronic Tongue, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 9325–9332. doi:10.1021/JF402960Q.
- [246] G. Orlandi, R. Calvini, G. Foca, L. Pigani, G. Vasile Simone, A. Ulrici, Data fusion of electronic eye and electronic tongue signals to monitor grape ripening, *Talanta*. 195 (2019) 181–189. doi:10.1016/J.TALANTA.2018.11.046.
- [247] R. Muñoz, C. García-Hernández, C. Medina-Plaza, C. García-Cabezón, J.A. Fernández-Escudero, E. Barajas, G. Medrano, M.L. Rodríguez-Méndez, A different approach for the analysis of grapes: Using the skin as sensing element, *Food Res. Int.* 107 (2018) 544–550. doi:10.1016/J.FOODRES.2018.02.060.
- [248] C. Medina-Plaza, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Mendez, Bioelectronic tongue based on lipidic nanostructured layers containing phenol oxidases and lutetium bisphthalocyanine for the analysis of grapes, *Biosens. Bioelectron.* 57 (2014) 276–283. doi:10.1016/j.bios.2014.02.023.
- [249] Y. Lan, J. Wu, X. Wang, X. Sun, R.M. Hackman, Z. Li, X. Feng, Evaluation of antioxidant capacity and flavor profile change of pomegranate wine during fermentation and aging process, *Food Chem.* 232 (2017) 777–787. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.030.
- [250] A. González-Calabuig, M. del Valle, Voltammetric electronic tongue to identify Brett character in wines. On-site quantification of its ethylphenol metabolites, *Talanta*. 179 (2018) 70–74. doi:10.1016/j.talanta.2017.10.041.
- [251] S. Buratti, D. Ballabio, G. Giovanelli, C.M.Z. Dominguez, A. Moles, S. Benedetti, N. Sinelli, Monitoring of alcoholic fermentation using near infrared and mid infrared spectroscopies combined with electronic nose and electronic tongue, *Anal. Chim. Acta.* 697 (2011) 67–74. doi:10.1016/J.ACA.2011.04.020.
- [252] C. Apetrei, I.M. Apetrei, I. Nevares, M. del Alamo, V. Parra, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. De Saja, Using an e-tongue based on voltammetric electrodes to discriminate among red wines aged in oak barrels or aged using alternative methods. Correlation between electrochemical signals and analytical parameters, *Electrochim. Acta.* 52 (2007) 2588–2594. doi:10.1016/j.electacta.2006.09.014.
- [253] I.M. Apetrei, M.L. Rodríguez-Méndez, C. Apetrei, I. Nevares, M. del Alamo, J.A. de Saja, Monitoring of evolution during red wine aging in oak barrels and alternative method by means of an electronic panel test, *Food Res. Int.* 45 (2012) 244–249. doi:10.1016/j.foodres.2011.10.034.
- [254] V. Parra, Á.A. Arrieta, J.A. Fernández-Escudero, M. Íñiguez, J.A. De Saja, M.L. Rodríguez-Méndez, Monitoring of the ageing of red wines in oak barrels by means of a hybrid electronic tongue, *Anal. Chim. Acta.* 563 (2006) 229–237. doi:10.1016/J.ACA.2005.09.044.
- [255] X. Cetó, F. Céspedes, M.I. Pividori, J.M. Gutiérrez, M. Del Valle, Resolution of phenolic antioxidant mixtures employing a voltammetric bio-electronic tongue, *Analyst*. 137 (2012) 349–356. doi:10.1039/c1an15456g.
- [256] L. Lvova, C. Di Natale, R. Paolesse, Electronic tongue based on porphyrins for Apulian red wines defects detection, in: *ISOEN 2017 - ISOCS/IEEE Int. Symp. Olfaction Electron. Nose, Proc.*, 2017: pp. 0–1. doi:10.1109/ISOEN.2017.7968917.
- [257] V. Merkyte, K. Morozova, E. Boselli, M. Scampicchio, Fast and Simultaneous Determination of Antioxidant Activity, Total Phenols and Bitterness of Red Wines by a



- Multichannel Amperometric Electronic Tongue, *Electroanalysis*. 30 (2018) 314–319. doi:10.1002/elan.201700652.
- [258] A. González-Calabuig, X. Cetó, M. Del Valle, A voltammetric electronic tongue for the resolution of ternary nitrophenol mixtures, *Sensors*. 18 (2018) 1–11. doi:10.3390/s18010216.
- [259] L.A. Dias, A.M. Peres, A.C.A. Veloso, F.S. Reis, M. Vilas-Boas, A.A.S.C. Machado, An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk, *Sensors Actuators, B Chem.* 136 (2009) 209–217. doi:10.1016/j.snb.2008.09.025.
- [260] I. Tazi, K. Triyana, D. Siswanta, A.C.A. Veloso, A.M. Peres, 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. doi:10.1007/s11694-018-9855-8.
- [261] M. Hruškar, N. Major, M. Krpan, I.P. Krbavčič, G. Šarić, K. Marković, N. Vahčić, Evaluation of milk and dairy products by electronic tongue, *Mljekarstvo*. 59 (2009) 193–200.
- [262] M. Bougrini, K. Tahri, Z. Haddi, N. El Bari, E. Llobet, N. Jaffrezic-Renault, B. Bouchikhi, 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. doi:10.1016/j.msec.2014.09.030.
- [263] S. Cavanillas, F. Winqvist, M. Eriksson, A self-polishing platinum ring voltammetric sensor and its application to complex media, *Anal. Chim. Acta*. 859 (2015) 29–36. doi:10.1016/j.aca.2014.11.039.
- [264] L.A. Mercante, V.P. Scagion, A. Pavinatto, R.C. Sanfelice, L.H.C. Mattoso, D.S. Correa, Electronic tongue based on nanostructured hybrid films of gold nanoparticles and phthalocyanines for milk analysis, *J. Nanomater.* 2015 (2015) 890637. doi:10.1155/2015/890637.
- [265] A.A. Arrieta, M.S. Palencia, O. Fuentes, Miniaturised multi-channel system of electrochemical measurements for an electronic tongue for milk samples, *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 12 (2018) 28–35.
- [266] Y. Yu, H. Zhao, G. Dong, R. Yang, L. Li, Y. Liu, H. Wu, W. Zhang, Discrimination of milk adulterated with urea using voltammetric electronic tongue coupled with PCA-LSSVM, *Int. J. Electrochem. Sci.* 10 (2015) 10119–10131.
- [267] L. Bueno, W.R. de Araujo, M.O. Salles, M.Y. Kussuda, T.R.L.C. Paixão, Voltammetric electronic tongue for discrimination of milk adulterated with urea, formaldehyde and melamine, *Chemosensors*. 2 (2014) 251–266. doi:10.3390/chemosensors2040251.
- [268] K. Toko, T. Iyota, T. Mizota, Yasumichi; Matsuno, T. Yoshioka, T. Doi, S. Iiyama, T. Kato, K. Yamafuji, R. Watanabe, Heat Effect on the Taste of Milk Studied Using a Taste Sensor., *Jpn. J. Appl. Phys.* 34 (1995) 6287–6291. doi:10.1143/JJAP.34.6287.
- [269] Y. Mizota, H. Matsui, M. Ikeda, N. Ichihashi, K. Iwatsuki, K. Toko, Flavor evaluation using taste sensor for UHT processed milk stored in cartons having different light permeabilities, *Milchwissenschaft*. 64 (2009) 143–146. doi:10.2/JQUERY.MIN.JS.
- [270] M. Yoshida, H. Shinohara, T. Sugiyama, M. Kumagai, H. Muto, H. Kodama, Taste of milk from inflamed breasts of breastfeeding mothers with mastitis evaluated using a taste sensor, *Breastfeed. Med.* 9 (2014) 92–97. doi:10.1089/BFM.2013.0084.
- [271] P. Ciosek, W. Wróblewski, Performance of selective and partially selective sensors in the recognition of beverages, *Talanta*. 71 (2007) 738–746. doi:10.1016/J.TALANTA.2006.05.022.



- [272] P. Ciosek, K. Brudzewski, W. Wróblewski, Milk classification by means of an electronic tongue and Support Vector Machine neural network, *Meas. Sci. Technol.* 17 (2006) 1379–1384. doi:10.1088/0957-0233/17/6/014.
- [273] L. Pascual, M. Gras, D. Vidal-Brotóns, M. Alcañiz, R. Martínez-Mañez, J. V. Ros-Lis, A voltammetric e-tongue tool for the emulation of the sensorial analysis and the discrimination of vegetal milks, *Sensors Actuators B Chem.* 270 (2018) 231–238. doi:10.1016/J.SNB.2018.04.151.
- [274] C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, L. Dias, M.A. Rodríguez-Perez, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez, Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors, *Front. Chem.* 9 (2021) 706460. doi:10.3389/fchem.2021.706460.
- [275] F. Winquist, P. Wide, I. Lundström, An electronic tongue based on voltammetry, *Anal. Chim. Acta.* 357 (1997) 21–31. doi:10.1016/S0003-2670(97)00498-4.
- [276] W.A. Collier, D.B. Baird, Z.A. Park-Ng, N. More, A.L. Hart, Discrimination among milks and cultured dairy products using screen-printed electrochemical arrays and an electronic nose, *Sensors Actuators, B Chem.* 92 (2003) 232–239. doi:10.1016/S0925-4005(03)00271-5.
- [277] M. Hruškar, N. Major, M. Krpan, N. Vahčić, Simultaneous determination of fermented milk aroma compounds by a potentiometric sensor array, *Talanta.* 82 (2010) 1292–1297. doi:10.1016/j.talanta.2010.06.048.
- [278] M. Hruškar, N. Major, M. Krpan, Application of a potentiometric sensor array as a technique in sensory analysis, *Talanta.* 81 (2010) 398–403. doi:10.1016/J.TALANTA.2009.12.015.
- [279] T.R.L.C. Paixão, M. Bertotti, Fabrication of disposable voltammetric electronic tongues by using Prussian Blue films electrodeposited onto CD-R gold surfaces and recognition of milk adulteration, *Sensors Actuators B Chem.* 137 (2009) 266–273. doi:10.1016/J.SNB.2008.10.045.
- [280] M. Peris, L. Escuder-Gilabert, On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: A review, *Anal. Chim. Acta.* 804 (2013) 29–36. doi:10.1016/J.ACA.2013.09.048.
- [281] F. Winquist, S. Holmin, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström, A hybrid electronic tongue, *Anal. Chim. Acta.* 406 (2000) 147–157. doi:10.1016/S0003-2670(99)00767-9.
- [282] Z. Wei, J. Wang, W. Jin, Evaluation of varieties of set yogurts and their physical properties using a voltammetric electronic tongue based on various potential waveforms, *Sensors Actuators B Chem.* 177 (2013) 684–694. doi:10.1016/J.SNB.2012.11.056.



Universidad de Valladolid

Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores para su aplicación en la industria alimentaria

Capítulo 6

Anexos

En esta sección se recogen todos los méritos de la autora de la Tesis Doctoral, entre los que se encuentran las publicaciones, asistencia a congresos o cursos, participación en proyectos, certificación de estancia pre-doctoral en el extranjero, becas e informes previos a la defensa de Tesis.

This section includes all the merits of the author of the Doctoral Thesis, among which are publications, attendance at conferences or courses, participation in projects, certification of pre-doctoral stay abroad, scholarships and external evaluator reports.



6.1. Publicaciones, congresos, cursos, participación en proyectos, estancia pre-doctoral y becas

Publicaciones:

1. E. Sánchez-Tirado, **C. Salvo**, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, F.Langa, J.M. Pingarrón. Electrochemical immunosensor for simultaneous determination of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in serum and saliva using dual screen printed electrodes modified with functionalized double-walled carbon nanotubes. *Analytica Chimica Acta*, 959 (2017) 66-73.
Factor Impacto: 5.123, Q1, Chemistry Analytical
2. **C.Salvo-Comino**, C.Garcia-Hernandez, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Discrimination of milks with a Multisensor system based on Layer-by-Layer films. *Sensors*, 18 (2018), 2716-2728.
Factor Impacto: 3.302, Q1, Instrument and Instrumentation.
3. C.Garcia-Hernandez, **C.Salvo-Comino**, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, C. Garcia-Cabezón. Impedimetric Electronic Tongue based on nanocomposites for the Analysis of red Wines. Improving the variable selection. *Sensors and Actuators B*. 277 (2018) 365-372.
Factor Impacto: 3.302, Q1, Instrument and Instrumentation.
4. **C.Salvo-Comino**, C.Garcia-Hernandez, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, C. Garcia-Cabezón. Promoting laccase sensing activity for catechol detection using LbL assemblies of chitosan/ionic liquid/ phthalocyanine as immobilization surfaces. *Bioelectrochemistry*, 132 (2020) 107407.
Factor Impacto: 5.373, Q1, Biophysic.
5. C.Garcia-Hernandez, **C.Salvo-Comino**, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, C. Garcia-Cabezón. Analysis of red wines using an electronic tongue and infrared spectroscopy. Correlations with phenolic content and color parameters. *LWT Food Science and Technology*, 118 (2020) 108785.
Factor Impacto: 4.952, Q1, Food, Science and Technology.
6. **C. Salvo-Comino**, I. Rassas, S. Minot, F. Bessueille, M.L. Rodríguez-Mendez, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault. Voltammetric sensor based on electrodeposited molecularly imprinted chitosan film on BDD electrodes for catechol detection in buffer and in wine samples. *Materials Science and engineering C*, 110 (2020) 110667.
Factor Impacto: 7.328, Q1, Materials, Science, Biomaterials.
7. **C. Salvo-Comino**, I. Rassas, S. Minot, F. Bessueille, M. Arab, V. Chevallier, M.L. Rodríguez-Mendez, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault. Voltammetric sensor based on molecularly imprinted chitosan-carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles nanocomposite deposited on Boron Doped Diamond electrodes for catechol detection. *Materials*, 13, 688, (2020) 1-11.
Factor Impacto: 3.623 Q2, Material Science (Miscellaneous)

8. **C. Salvo-Comino**, A. González-Gil, J. Rodríguez-Valentin, C. Garcia-Hernandez, F. Martín-Pedrosa, A. C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Biosensors Platform Based on Chitosan/AuNPs/Phthalocyanine Composite Films for the Electrochemical Detection of Catechol. The Role of the Surface Structure. *Sensors*, 20, (2020) 2152.
Factor Impacto: 3.576, Q1, Instrument and Instrumentation.
9. C. García-Cabezón, G. Gobbi Teixeira, L. Guimaraes Dias, **C. Salvo-Comino**, C. García-Hernandez, M.L. Rodríguez-Mendez, F. Martín-Pedrosa. Analysis of Phenolic Content in Grape Seeds and Skins by Means of a Bio-Electronic Tongue. *Sensors*, 20, (2020), 4176.
Factor Impacto: 3.576, Q1, Instrument and Instrumentation.
10. C. García-Cabezón, **C. Salvo-Comino**, C. García-Hernandez, M.L. Rodríguez-Mendez, F. Martín-Pedrosa. Nanocomposites of conductive polymers and nanoparticles deposited on porous material as a strategy to improve its corrosion resistance. *Surface and Coatings Technology*. 403 (2020) 126395.
Factor Impacto: 4.158, Q1, Surface and Coating Technology.
11. **C. Salvo-Comino**, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, M-L. Rodríguez-Mendez. Silver nanowires as electron transfer mediators in electrochemical catechol biosensors. *Sensors*, 21, (2021), 899.
12. C. Pérez-González, **C. Salvo-Comino**, L. Guimaraes-Dias, M.A. Rodríguez-Perez, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Analysis of milk using a portable potentiometric electronic tongue based on five polymeric membrane sensors. *Frontiers in Chemistry*, 9, (2021), 706460.
13. C. García-Cabezón, v. Godinho, **C. Salvo-Comino**, Y. Torres, F. Martín-Pedrosa. Improved corrosion behaviour and biocompatibility of porous titanium samples coated with bioactive chitosán-based nanocomposites. *Materials*, 14 (2021) 6322.
14. **C. Salvo-Comino**, P. Martín-Bartolome, J.L. Pura, C. Gonzalez-Perez, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Improving the performance of a bioelectronic tongue using silver nanowires. Application to milk analysis. *Sensors and Actuators B-Chem*, 364 (2022) 121877.



Congresos:

1. C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez. Sensores nanoestructurados por deposición de diferentes materiales sensibles. Técnica Layer by Layer. *Ibernam*. Tordesillas (España), 28-29/09/2017 (Póster)
2. C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, M.L. Rodriguez-Mendez. Nanostructured sensor fabricated by Layer by Layer assembly for electrochemical detection of catechol. *XVII Escuela Nacional de Materiales Moleculares*. Málaga (España), 11-15/02/2018 (Póster)
3. C. Garcia-Hernandez, C. Salvo-Comino, M.L. Rodriguez-Mendez. New Approach For Lysozyme Delivery Using AuNPs By Means Of Layer-By-Layer Technique. *XVII Escuela Nacional de Materiales Moleculares*. Málaga (España), 11-15/02/2018 (Oral)
4. C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, M.L. Rodriguez-Mendez. Nanostructured sensor fabricated by Layer by Layer assembly for electrochemical detection of catechol. *IV Jornada de Investigadoras de la UVa en Ciencia y Tecnología*. Valladolid (España), 02/03/2018. (Oral)
5. C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, M.L. Rodriguez-Mendez. Sensores nanoestructurados fabricados mediante ensamblaje layer by layer para la detección electroquímica de catecol. *IX Reunión de Jóvenes Investigadores Iberoamericanos*. Valladolid (España), 13/04/2018 (Póster)
6. C. Garcia-Hernandez, C. Salvo-Comino, M.L. Rodriguez-Mendez. New Approach For Lysozyme Delivery Using AuNPs By Means Of Layer-By-Layer Technique. *IX Reunión de Jóvenes Investigadores Iberoamericanos*. Valladolid (España), 13/04/2018 (Póster)
7. C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Méndez. Multisensor system based on layer by layer films. Discrimination of milks. *IX Franco-Spanish Workshop IBERNAM-CMC2*. Cataluña (España), 04-05/09/2018 (Oral)
8. C. Garcia-Hernandez, C. Salvo-Comino, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Méndez. Synergy in nanostructured voltammetric sensors. Applications in the food industry. *IX Franco-Spanish Workshop IBERNAM-CMC2*. Cataluña (España), 04-05/09/2018 (Oral)
9. M.L. Rodríguez-Méndez, C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa. Complementary study of red wines combining voltammetric sensors and spectroscopic techniques. *IX Franco-Spanish Workshop IBERNAM-CMC2*. Cataluña (España), 04-05/09/2018 (Oral)
10. C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodriguez-Mendez. Nanostructured biosensors fabricated by layer by layer

assembly for electrochemical detection of catechol. *11th Iberoamerican Conference Sensors*. Cataluña (España),17-20/09/2018 (Oral)

11. C. Garcia-Hernandez, C. Salvo-Comino, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez. In situ synthesis, stabilization and activity of lysozyme-gold nanoparticles for biosensing application. *11th Iberoamerican Conference Sensors*. Cataluña (España),17-20/09/2018 (P)
12. M.L. Rodríguez-Mendez. C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, C. C.Fernández-Blanco, A. Ruiz-Carmuega, R. Gonzalez-Antón, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, Y. Blanco. The role of synergy in nanostructured voltammetric sensors. Applications in the food industry. *11th Iberoamerican Conference Sensors*. Cataluña (España),17-20/09/2018 (Oral)
13. C. Garcia-Hernandez, C. Salvo-Comino, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Analysis of the Phenolic Content in Red Wines Using Three Multivariate Techniques: Electronic Tongue, FTIR and UV-Vis, 32nd Eurosensors Conference. Graz (Austria) 9-12/09/2018 (Póster)
14. A. Errachid, C. Salvo-Comino, I. Rassas, M.L. Rodríguez-Mendez, Nicole Jaffrezic-Renault. Voltammetric sensor based on electrodeposited molecularly imprinted chitosán film on BDD electrodes for catechol detection. *9th International Workshop on Biosensors*. Erfoud (Marruecos), 9-11/10/2019 (Póster)
15. C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, J. Rodríguez-Valentin, C. García-Cabezón, F. Martín Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez. Enzymatic biosensor based on silver nanowires modified electrode for the electrochemical detection of catechol. *XVI Ibernarn Workshop*. San Sebastian (España), 7-8/11/2019, (Póster y oral)
16. M.L. Rodríguez-Mendez, C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, C. García-Cabezón, F. Martín Pedrosa. Performance Improvement of an Impedimetric Electronic Tongue. *XVI Ibernarn Workshop*. San Sebastian (España), 7-8/11/2019, (Póster y oral)
17. ML Rodríguez-Mendez, C. Salvo-Comino, C. Garcia-Hernandez, J. Rodríguez-Valentin, C. Garcia-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, Multicomponent Layer-By-Layer Films of Chitosan/Phthalocyanine/AuNPs As Biosensing Platforms, *237th ECS Meeting with IMCS 2020* Montreal (Canadá) 10-14/05/ 2020 (Oral)
18. C. Salvo-Comino, C. Perez-Gonzalez, F. Martín Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Nanohilos de Plata: Mediadores electrónicos en la determinación de catecol. *VII Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología*. Valladolid (España) 15-16/4/2021 (Oral)
19. C. Perez-Gonzalez, C. Salvo-Comino, F. Martín Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Optimización de una lengua electrónica para la industria láctea. *VII Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología*. Valladolid (España) 15-16/4/2021 (Presentación Flash)
20. M.L. Rodríguez-Mendez, C. Salvo-Comino, C. Perez-Gonzalez, F. Martín Pedrosa,



- C. García-Cabezón, Multicomponent Layer-by-Layer films of chitosan/phthalocyanine/AuNPs as biosensing platforms. *239th ECS Meeting with the 18th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS)*. Online 30/5/2021-3/6/2021 (Oral)
21. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez Méndez Development of a bioelectronic tongue modified with gold nanoparticles for dairy analysis. *CDE2021 (13th Spanish Conference on Electronic devices)*. Online, 9-11/06/2021 (Póster)
22. C. Salvo-Comino, C. Pérez-González, C. García-Cabezón, F. Martín Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez. Silver nanomaterials as electron mediators in a bio-electronic tongue dedicated to the analysis of milks. The role of the aspect ratio of nanoparticles vs. Nanowires. *CSAC2021: 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry*. Online, 1-15/7/2021 (extended abstract)
23. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, C. García-Cabezón, F. Martín Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez. Development of a bioelectronic tongue modified with gold nanoparticles for dairy analysis. *CSAC2021: 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry*. Online, 1-15/7/2021 (extended abstract)
24. J.L. Pura Ruiz, C. Salvo-Comino C. Pérez-González, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. AFM characterization of AgNWs modified electrodes by Langmuir-Blodgett: the effect of electrochemical measurements. *Symposium of the Spanish Royal Society of Chemistry 20212*. Online, 27-30/9/2021
25. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, J.L. F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón , M.L. Rodríguez Méndez. Development of a bioelectronic tongue with gold nanoparticles and enzymes dedicated to milk analysis. *X Franco-Spanish Workshop IBERNAM-CMC2*. Arcachon (Francia), 25-26/11/2021 (Oral)
26. C. Salvo-Comino, C. Perez-Gonzalez, J.L. Pura, F. Martin-Pedrosa C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Improving a bioET capabilities based on silver nanomaterials as electron mediators. The influence of the nanostructure in the analysis of milk. *X Franco-Spanish Workshop IBERNAM-CMC2*. Arcachon (Francia), 25-26/11/2021 (Póster)

Cursos:

1. Curso: Movilidad del Investigador.
Entidad organizadora: ESDUVa, Universidad de Valladolid.
Fecha de inicio-fin: 22/05/2017 – 25/05/2017.
2. Curso: Aspectos Metodológicos de la Tesis Doctoral.
Entidad organizadora: ESDUVa, Universidad de Valladolid.
Fecha de inicio-fin: 29/05/2017 – 31/05/2017.
3. Curso: Nivel básico-unificación de firmas de autores, solicitar una corrección de artículo y firma de organizaciones.
Entidad organizadora: FECYT
Fecha de inicio-fin: 19/09/2017
4. Curso: buscar la producción científica de autores y la evaluación con métricos de cita.
Entidad organizadora: FECYT
Fecha de inicio-fin: 20/09/2017
5. Curso: Sesión de Formación “Gestor de Referencias Mendeley”
Entidad organizadora: FECYT
Fecha de inicio-fin: 14/09/2017
6. Comité organizador del ciclo de conferencias: Investigadoras de la UVA en La Aventura de la Ciencia y la Tecnología.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid- Grupo UVASENS
Fecha de inicio-fin: 2/03/2018
7. Escuela Nacional: XVII Escuela Nacional de Materiales Moleculares.
Entidad organizadora: Grupo Especializado de Nanociencia y Materiales Moleculares de la RSEQ.
Fecha de inicio-fin: 11/02/2018 – 15/02/2018.
8. Jornada: IV Investigadoras de la UVa en la aventura de la Ciencia y Tecnología.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid. Departamento de Química Física y Química Inorgánica.
Fecha de inicio-fin: 02/03/2018 - 02/03/2018.
9. Jornada: XI Reunión de Jóvenes Investigadores Iberoamericanos.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid – Centro “Tordesillas” de Relaciones con Iberoamérica.
Fecha de inicio-fin: 13/04/2018 - 13/04/2018.
10. Curso: The imposter syndrome.
Entidad organizadora: ESDUVa, Universidad de Valladolid.
Fecha Inicio-fin: 14/06/2018
11. Curso: Advanced use of Atomic Force Microscope on biological samples
Entidad organizadora: ISOM (Politécnica de Madrid)
Fecha Inicio-fin: 26/09/2018-27/09/2018



12. Seminario: Microsistemas y Nanotecnología y asamblea anual IBERNAM
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid – Centro “Casa del Tratado Tordesillas”
Fecha de inicio-fin: 28/09/2018 – 29/09/2018

13. Curso: Learning and operation course of the Atomic Force Microscope (AFM)
Entidad organizadora: Oxford Instruments GmbH
Fecha de inicio-fin: 01/10/19-03/10/19

14. Curso: Probing Nanoscale Structure & Properties of Polymers: Advances in Atomic Force Microscopy
Entidad organizadora: SelectScience
Fecha de inicio-fin: 16/10/2019

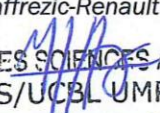
Participación en Proyectos:

- Proyectos I+D+i 2015, **Fondos Feder; Ministerio de Economía y Competitividad**. Prototipo de lengua electrónica basada en sensores nanoestructurados para el análisis de vinos y mostos. Correlaciones con otras técnicas. Investigador principal: María Luz Rodríguez Méndez. Referencia externa: *AGL2015-67482-R*.
- Proyectos I+D+i 2018, **Agencia Estatal de Investigación; Fondos Feder**. Desarrollo de un sistema multisensor nanoestructurado portátil para análisis de leche: En el camino hacia la industria 4.0. Investigadoras principales: María Luz Rodríguez Méndez y Ana Cristina García Cabezón. Referencia externa: *RTI2018-097990-B-I00*.



Estancia pre-doctoral:

CERTIFICADO DE ESTANCIA EN UNA INSTITUCIÓN EXTRANJERA
CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION

| |
|---|
| 1. Becario/ Applicant: |
| Nombre y apellidos/ Name: Coral Salvo Comino |
| D.N.I./ National identity Card: 03944804M |
| Centro de aplicación de la beca/ Home Institución: Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenieros Industriales, Dpto.: Química Física y Química Inorgánica. Valladolid (España) |
| 2. Centro en el que se ha realizado la estancia/ Host Institution: |
| Nombre/ Name: Institute of Analytical Sciences, University of Lyon |
| Dirección/ Adress: 5 Rue de la Dua, Villeurbane, 69100 |
| Localidad/ Country: France |
| 3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Responsible person in the Host |
| Institución/ Institution: Institute of Analytical Sciences, University of Lyon |
| Nombre/ Name: Nicole Jaffrezic-Renault |
| Cargo/ Post: Director of emeritus research CNRS |
| CERTIFICO: que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas: desde 12 / 03 / 2019 hasta 29/ 06/ 2019 THIS IS TO CERTIFY: that the above mentioned person has performed a stay in this Institution in the following dates: From: 12 /03 /2019 To: 29 /06 /2019 Lugar y fecha: Villeurbanne (Lyon, Francia), Viernes, 28 junio 2019 City and date: Villeurbanne (Lyon, France), Friday, 28 th June 2019 |
| Firma y Sello/ Signature & Stamp Prof. Nicole Jaffrezic-Renault  INSTITUT DES SCIENCES ANALYTIQUES CNRS/UCBL UMR 5280 Département LSA 5 RUE DE LA DUA 69100 VILLEURBANNE |



Becas:

AYUDAS PARA CONTRATOS PREDOCTORALES PARA LA FORMACIÓN DE DOCTORES MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN

| | | |
|--|---|--------------------|
| Apellidos, nombre: Salvo Comino, Coral | | NIF/NIE: 03944804m |
| Referencia de la Ayuda: BES-2016-077825 | Referencia del Proyecto: AGL2015-67482-R | |
| Título del Proyecto: Prototipo de lengua electrónica basada en sensores nanoestructurados para el análisis de vinos y mostos. Correlaciones con otras técnicas | | |
| Investigador/a Principal del Proyecto: María Luz Rodríguez Méndez | | |
| Centro de I+D de la Ayuda: Universidad de Valladolid | | |
| Título del programa de doctorado: Doctorado en Físicas | | |



Informes previos a la defensa de Tesis:



Universidad de Valladolid



Form 2T

ASSESSMENT REPORT OF A PhD THESIS PRIOR TO ITS DEFENSE

(As required by Section 2.1c. of the Regulation concerning doctoral thesis defense at UVa)

Full name: Priscila Alessio

Department: Faculty of Science and Technology - Department of Physics

University or Research Institution: São Paulo State University

Regarding the thesis entitled: Electrochemical sensors and biosensors: new horizons and challenges in their integration in multisensor systems for food industry applications/

Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores para su aplicación en la industria alimentaria

Written by Mrs.: Coral Salvo Comino

Please, report your arguments and critical opinion on the following issues concerning the PhD thesis, writing as much as necessary:

1. Is the topic relevant? Are the research objectives well defined?

The subject of the Doctoral Thesis is current and relevant. It is within the framework of developing sensors, biosensors, and multi-sensor systems that provide new analytical tools for food quality control.

The objectives of the dissertation are at the interphase of chemistry, nanoscience, and food analysis and are clearly defined.

The main objective of this thesis involves the development of novel electrochemical sensors and biosensors based on combinations of materials and nanomaterials showing synergistic effects to improve the performance in terms of sensitivity and selectivity. The sensors and biosensors created were used to fabricate electronic tongues that we're able to analyze, discriminate and classify different kinds of milk according to their nutritional and compositional properties.

2. Is the selected methodology sound and suitable for the topic and the objectives pursued in the thesis?

The research work involved the application of electronic and bioelectronic tongues in the analysis of milk. For that purpose, the methodology used was adequate: Firstly, novel sensors based on various nanomaterials (conducting polymers, phthalocyanines) and enzymes, etc., were developed and characterized from the structural and electrochemical point of view. In each case, the sensing performance of the sensors has been adequately evaluated (limit of detection, sensitivity, etc.)

Finally, the sensors and biosensors have been combined to develop bioelectronic tongues to analyze different kinds of milk, using adequate protocols and chemical pattern recognition methods

3. Is the body of reviewed literature up to date and complete? Have all relevant sources been considered and cited?

The literature reviewed in chapter 2 provides a clear understanding of the importance of nanoscience and nanotechnology in the new era of knowledge in the 4.0 Industry. The manuscript reveals the relevance of including electronic tongues in routine control analysis within the food industry. It describes in detail the electrochemical sensing methods and the use of a wide range of sensitive materials, biomaterials, and nanomaterials for the development of electrochemical sensors and biosensors, as well as their preparation methods.

Likewise, the chapter includes an extensive bibliographic review that frames the current scientific state of the currently developed sensors in the food industry (specifically in the wine and dairy industries) and a final

Finally, an extensive bibliographic review is collected, which encompasses the development of multisensor systems in the food industry



4. Does the thesis make original contributions that expand the current knowledge on the subject? Are these contributions relevant?

The presented Doctoral Thesis shows an innovative and relevant contribution to the field of electrochemical sensors and biosensors field. Moreover, the work's relevance is undoubtful because, as the result of this work, seven scientific articles have been published in indexed international journals.

5. Is the thesis structure adequate to explain the research carried out and the results achieved? Is language used properly? Are formal elements, like figures or tables, well laid out and helpful to understand the research and results?

The Doctoral Thesis has a clear and appropriate structure. In my opinion, one of the strengths of the manuscript is that the experimental results are divided into three parts that combine papers with a common subject. This structure provides the reader with a comprehensive understanding of the motivation of the research involved in the work presented in each section. Obviously, the fact that the seven papers are already published facilitates reading each individual work.

6. Only if this is a compilation thesis (written in the format of a collection of articles): Is there a clear and coherent connection among the topics and methodology of the different articles that comprise the thesis? Do the introduction and conclusions of the thesis provide a unifying picture of the whole research?

Yes, chapter 3 of this Doctoral Thesis is divided into 3 sections where the scientific articles are grouped depending on the type of electrochemical sensor or biosensor developed through different techniques. This division, carefully chosen, facilitates the reader's comprehension of the Ph.D. Thesis.

The introduction objectives and conclusion of the Thesis are coherent, showing that the structure is in concordance with the research work presented.

7. Please mention three strengths and three weaknesses of this thesis

This Doctoral Thesis is a compilation of 7 articles published in international and indexed journals. Different experts have previously revised these articles. The candidate Coral Salvo Comino is the first author of these 7 articles and is a co-author in 5 more. Therefore, I do not see weaknesses that deserve to be mentioned here.

8. If you think the thesis should NOT be defended in its current form, please mention the changes that you consider MUST be done before it can proceed to defense.

From my point of view, the Ph.D. Thesis can be defended in its present form.

9. Please mention other changes that MAY be done in order to improve the thesis quality but that you do not consider strictly necessary to authorize its defense.

Nothing to declare

10. Any other comments:

I would like to congratulate the candidate and the supervisors for the quality of this PhD thesis

11. Please provide your recommendation to the Academic Board of the PhD Program:

This thesis should be ADMITTED for defense, either in its current form or after taking into account the suggestions made in point 9 of this report.



Universidad de Valladolid



Form 2T

- This thesis should be MODIFIED before its admission for defense in order to make the changes requested in point 8 of this report.
- This thesis should be REJECTED for defense. due to the arguments given in this report.

Place and date: Presidente Prudente, SP Brazil, April 08, 2022

Signature:..

Notes: The length of this report is not restricted. Please remember to sign it (digital signatures are accepted).



Universidad de Valladolid



Form 2T

ASSESSMENT REPORT OF A PhD THESIS PRIOR TO ITS DEFENSE
(As required by Section 2.1.c. of the Regulation concerning doctoral thesis defense at UVA)

Full name: Constantin Apetrei

Department: Department of Chemistry, Physics, and Environment

University or Research Institution: Universitatea Dunarea de Jos din Galati, UGAL

Regarding the thesis entitled: Electrochemical sensors and biosensors: new horizons and challenges in their integration in multisensor systems for food industry applications/
Sensores y biosensores electroquímicos: nuevos horizontes y desafíos en su integración en sistemas multisensores para su aplicación en la industria alimentaria

Written by Mrs.: Coral Salvo Comino

Please, report your arguments and critical opinion on the following issues concerning the PhD thesis, writing as much as necessary:

1. Is the topic relevant? Are the research objectives well defined?

Yes, the topic is relevant and the objectives are well defined. It is focused on the development of analytical methods based on sensors and biosensors modified with sensitive materials to improve the food quality control. The main objective of this PhD thesis was to develop new electrochemical sensors and biosensors with electrocatalytic materials and nanomaterials to improve their performance in terms of sensitivity, selectivity and reproducibility. These sensors/biosensors were implemented in electronic and bioelectronic tongues for the analysis of sugars present in milk.

2. Is the selected methodology sound and suitable for the topic and the objectives pursued in the thesis?

Yes, the methodology is suitable. Different phthalocyanines, metal nanoparticles, carbon-based materials and polymers as well as enzymes were applied in this PhD thesis to improve the sensitivity and selectivity (specificity) of the sensors regarding the detection of phenols.

The developed sensors are based either on non-nanostructured or nanostructured materials, in which the nanotechnology played an important role in its preparation by using different surface modification techniques such as layer by layer, spin coating or molecular imprinter polymers. In addition, some of the electrocatalytic materials were applied in a combined way to study the possible synergistic effect between them in order to improve the sensor responses.

The combination between modified sensors/biosensors with statistical analyses (multivariate data) were carried out to discriminate samples (wine and milk) and to establish correlations between the data obtained with the electrochemical sensors and the chemical parameters obtained by traditional chemical analysis.

3. Is the body of reviewed literature up to date and complete? Have all relevant sources been considered and cited?

Yes, the review is appropriate and relevant sources were considered/quoted. Besides, the chapter II of this PhD thesis is totally dedicated to literature review. Relevant sources about nanoscience and nanotechnology used on the development of new sensors, as well as their application into bioelectronic tongues for food analyses have been included in chapter II. Finally, that chapter II quoted almost 300 references.



Universidad de Valladolid



Form 2T

4. Does the thesis make original contributions that expand the current knowledge on the subject? Are these contributions relevant?

Yes, this PhD thesis brings original and relevant contributions to the field of sensors, biosensors and bio/electronic tongues. For instance, this PhD thesis is composed of 7 articles that have been accepted for their publication in international and important journals.

5. Is the thesis structure adequate to explain the research carried out and the results achieved? Is language used properly? Are formal elements, like figures or tables, well laid out and helpful to understand the research and results?

Yes, the structure as well as the language and formal elements are adequate and relevant. Considering that the PhD thesis is a compilation of articles, the evaluation process of these articles by several referees helped with aspects such as explanation, language and formal elements. Figures and tables are well presented for a better understanding of the work carried out in this PhD.

6. Only if this is a compilation thesis (written in the format of a collection of articles): Is there a clear and coherent connection among the topics and methodology of the different articles that comprise the thesis? Do the introduction and conclusions of the thesis provide a unifying picture of the whole research?

Yes, this PhD thesis presents a summary of the main aspects related to each article, which facilitates the reader's comprehension. The introduction and conclusions are well written and provide a global idea of the whole research.

7. Please mention three strengths and three weaknesses of this thesis

Strengths: The modified bio/electronic tongues architectures designed in this PhD and its analytical effectiveness showed potential applications in food analysis with advantages inherent in the methodology. The electrodes built and tested in this work have great analytical potential for its application in other matrices, which should be considered as a major scientific contribution. Novel approaches to the development of nanobiosensors have been established

Weaknesses: The Thesis has not flaws. Just to mention something, I would mention that in this work completely different e-tongues have been developed for milk and wine. It would be interesting to develop some common strategies that enable in situ applications across the wine/milk production, including the development of a control platform to simplify data treatment. However, this weakness does not invalidate the research line followed in the thesis of developing, and applying specific sensing platforms for different applications. In fact, this weakness can be considered as the objective of future work. Another comment can be that along the introduction and the specific introduction to each paper, some aspects are repeated. Again this is at the same time a weakness and an advantage because this repetitions help to follow the manuscript easily

8. If you think the thesis should NOT be defended in its current form, please mention the changes that you consider MUST be done before it can proceed to defense.

In my opinion, the PhD Thesis can be defended in its current form.

9. Please mention other changes that MAY be done in order to improve the thesis quality, but that you do not consider strictly necessary to authorize its defense.

Nothing to declare



Universidad de Valladolid



Form 2T

10. Any other comments:

The research works presented in this PhD imply a very important scientific contribution to the field of sensors, biosensors and electronic tongues.

11. Please provide your recommendation to the Academic Board of the PhD Program:

- This thesis should be ADMITTED for defense, either in its current form or after taking into account the suggestions made in point 9 of this report.
- This thesis should be MODIFIED before its admission for defense in order to make the changes requested in point 8 of this report.
- This thesis should be REJECTED for defense, due to the arguments given in this report.

Place and date: Galati, April 7, 2022

Signature:



Notes: The length of this report is not restricted. Please remember to sign it (digital signatures are accepted).

