



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN FÍSICA

TESIS DOCTORAL:

**Nuevas Tecnologías en Lenguas
Electrónicas Para Evaluar la Calidad de
Productos Lácteos**

Presentada por Clara Pérez González
para optar al grado de

Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Prof. Dra. Ana Cristina García Cabezón

Prof. Dra. María Luz Rodríguez Méndez

Quiero agradecer especialmente a las Profesoras Ana Cristina García Cabezón y María Luz Rodríguez Méndez, quienes con su apoyo, orientación y experiencia han sido clave para el desarrollo de esta tesis. Su ayuda y confianza han sido esenciales durante todo este proceso.

Agradezco también a los profesores Luis Dias de la Universidad Politécnica de Braganza y Aleksey Nabok de la Universidad Hallam de Sheffield por haberme recibido en sus laboratorios durante mis estancias, brindándome la oportunidad de aprender en sus grupos de investigación y compartir sus conocimientos.

A Calidad Pascual, por su colaboración, que ha hecho posible el desarrollo de esta tesis, por su gran disposición y el buen trato recibido en cada etapa del trabajo conjunto durante el proyecto ALIVAC.

Agradezco también a la Universidad de Valladolid y al Banco Santander, cuyo apoyo financiero, a través de la convocatoria 2020 de contratos predoctorales, ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por su colaboración y por el buen ambiente de trabajo que siempre lograron crear. Gracias por estar abí en cada paso y por hacer que el día a día en el laboratorio fuera mucho más llevadero.

Y finalmente a mi familia y amigos, por ser mi apoyo en los momentos complicados y mi alegría en cada uno de estos logros. Gracias por hacer que este camino sea mucho más fácil de recorrer, sin vosotros esta tesis nunca se habría completado.

Índice

Resumen.....	I
Summary	III
Abreviaturas y acrónimos	V
Lista de Tablas y Figuras.....	IX
Contexto de la tesis.....	XI
Capítulo 1. Problemática, Motivación y Objetivos	1
1.1 Problemática y Motivación	2
1.2 Objetivos	5
1.3 Estructura de la tesis.....	8
Capítulo 2. Estado del Arte	11
2.1 Lenguas electrónicas	12
2.2 Técnicas de detección electroquímica	16
2.3 Optimización de Electrodos: Materiales avanzados.....	22
2.4 Biosensores.....	27
2.5 Métodos quimiométricos.....	32
2.6 Aplicación de lenguas electrónicas en la industria láctea	38
Capítulo 3. Resultados	47
Introducción	48
3.1 Artículo 1 “Impact of milk preservation in the classification and prediction capabilities of a voltammetric electronic tongue”	51
3.2 Artículo 2 “Analysis of milk adulteration by means of a potentiometric electronic tongue”	54
3.3 Artículo 3 “Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors”	57
3.4 Artículo 4 “Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles”	59
3.5 Artículo 5 “A new data analysis approach for an AgNPs-modified impedimetric bioelectronic tongue for dairy analysis”	63
Capítulo 4. Conclusiones y Perspectivas futuras	67
4.1 Conclusiones	68
4.1. <i>Conclusions</i>	72
4.2 Perspectivas futuras.....	76

<i>4.2. Future perspectives</i>	78
Capítulo 5	81
Bibliografía.....	81
Capítulo 6	109
Anexos.....	109
6.1 Publicaciones.....	110
6.2 Contribuciones en jornadas y congresos nacionales e internacionales.....	112
6.3 Proyectos de investigación y contratos con empresas	115
6.4 Cursos de formación.....	116
6.5 Estancias de investigación.....	117

Resumen

La presente tesis doctoral aborda el desarrollo de lenguas electrónicas y bioelectrónicas basadas en sensores y biosensores electroquímicos avanzados, con el objetivo para su aplicación ende mejorar el control de calidad de productos de la industria láctea. Estos dispositivos permiten mejorar la detección de compuestos clave en productos lácteos líquidos, superando las limitaciones de los métodos convencionales mediante el uso de tecnologías innovadoras, como nanomateriales y biorreceptores enzimáticos. Los sensores fueron diseñados para optimizar parámetros analíticos críticos, como la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, integrándose en redes de sensores que conforman lenguas electrónicas y bioelectrónicas sin olvidar otros parámetros clave como portabilidad y capacidad de actuar en las líneas de producción. La investigación se enfoca en la creación de sistemas capaces de analizar muestras de leche, identificar adulteraciones y evaluar la calidad de los productos mediante modelos matemáticos que correlacionan con técnicas tradicionales. La preparación, caracterización y evaluación de estos sensores, así como su implementación en sistemas de control de calidad, se detallan en los artículos científicos que conforman esta tesis.

Los estudios realizados abarcan diversas líneas de trabajo, incluyendo el diseño y desarrollo de sensores electroquímicos avanzados basados en técnicas voltamétricas, potenciométricas e impedimétricas, así como la integración de nanomateriales para mejorar sus propiedades electrocatalíticas. También se han desarrollado biosensores enzimáticos capaces de detectar múltiples compuestos presentes en la leche, como azúcares y ácidos orgánicos, optimizando su respuesta a través de la modificación química de los electrodos. Estos trabajos también incluyen el desarrollo de una metodología para el análisis de muestras de leche líquida, con énfasis en la detección de adulteraciones y la evaluación de la calidad e integridad de las muestras. Asimismo, se utilizaron métodos estadísticos multivariantes avanzados para procesar los datos obtenidos a partir de las lenguas electrónicas y se desarrollaron modelos de clasificación y predicción.

Esta tesis está estructurada en seis capítulos. El primer capítulo expone la problemática actual en la industria láctea, junto con la motivación y los objetivos de la investigación. El segundo revisa el estado del arte, destacando las tecnologías más avanzadas en lenguas electrónicas, sensores electroquímicos y biosensores, y su aplicación en la industria alimentaria. El tercer capítulo presenta los resultados de la investigación a través de cinco artículos científicos, donde se describen los avances en la detección de adulteraciones, la clasificación de muestras lácteas y la optimización de sensores. El cuarto capítulo ofrece las conclusiones generales y perspectivas futuras del trabajo, subrayando las contribuciones de la tesis al avance tecnológico en la industria láctea. Finalmente, el quinto y sexto capítulos están dedicados a la bibliografía y anexos, que incluyen las publicaciones, congresos y estancias realizadas durante el desarrollo de la tesis.

II

Los resultados de esta tesis doctoral han permitido el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en lenguas electrónicas y bioelectrónicas para el control de calidad en la industria láctea. Estos sistemas ofrecen una alternativa eficaz a los métodos convencionales, proporcionando análisis rápidos y precisos de productos lácteos, con aplicaciones directas en la mejora de la competitividad y sostenibilidad del sector. La implementación de estas tecnologías en plataformas de producción inteligentes promete revolucionar el control de calidad, asegurando la autenticidad de los productos en tiempo real y contribuyendo a la transformación digital de la industria en el marco de la Industria 4.0.

Summary

This doctoral thesis focuses on the development of bioelectronic and electronic tongues based on advanced electrochemical sensors and biosensors, with the goal of improving quality control systems for dairy industry applications. These devices enable the detection of key compounds in liquid dairy products, overcoming the limitations of conventional methods by employing innovative technologies such as nanomaterials and enzymatic bioreceptors. The sensors were designed to optimize critical analytical parameters such as sensitivity, selectivity, and reproducibility, and were integrated into sensor networks to form electronic and bioelectronic tongues. The research centers on creating systems capable of analyzing milk samples, identifying adulterations, and assessing product quality through mathematical models that correlate with traditional techniques. The preparation, characterization, and evaluation of these sensors, as well as their implementation in quality control systems, are detailed in the scientific articles that form the core of this thesis.

The studies conducted encompass various areas of research, including the design and development of advanced electrochemical sensors based on techniques such as potentiometry, voltammetry and impedance spectroscopy, as well as the integration of nanomaterials to enhance their electrocatalytic properties. Enzymatic biosensors capable of detecting multiple compounds present in milk, such as sugars and organic acids, were also implemented, with their response being optimized through chemical modification of the electrodes. Additionally, this work includes the development of a methodology for analyzing liquid milk samples, focusing on the detection of adulterations and the evaluation of the quality and integrity of the samples. Furthermore, advanced multivariate statistical methods were employed to process data obtained from the electronic tongues and to develop classification and prediction models.

This doctoral thesis is structured in six different chapters. Chapter 1 outlines the current challenges in the dairy industry, along with the motivation and objectives of the research. The second chapter reviews the state of the art, highlighting the most advanced technologies in electronic tongues, electrochemical sensors, and biosensors, as well as their application in the food industry. Third chapter presents the research findings through five scientific articles, which describe advancements in the detection of adulterations, the classification of dairy samples, and the optimization of sensors. The fourth chapter offers the general conclusions and future perspectives of the work, emphasizing the contributions to the thesis to technological advancements in the dairy industry. Finally, the fifth and sixth chapters are dedicated to the bibliography and appendices, which include the publications, conferences, and research stays completed during the development of this thesis.

The results of this doctoral thesis have allowed the development of new technologies based on electronic and bioelectronic tongues for quality control in the dairy industry. These systems provide an effective alternative to conventional methods, allowing for fast and

accurate analysis of dairy products, with direct applications in improving the sector competitiveness and sustainability. The implementation of these technologies in smart production platforms promises to revolutionize quality control, ensuring the authenticity of products in real-time and contributing to the digital transformation of the industry within the framework of Industry 4.0.

Abreviaturas y acrónimos

A

ADN	Ácido Desoxirribonucleico Desoxyribonucleic acid
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica Atomic Force Microscopy
AgNPs	Nanopartículas de Plata Silver Nanoparticles
ANNs	Redes Neuronales Artificiales Artificial Neural Networks
ANOVA	Análisis de Varianza Analysis of Variance
ARN	Ácido Ribonucleico Ribonucleic Acid
AuNPs	Nanopartículas de Oro Gold Nanoparticles

B

BHB	Ácido β -hidroxibutírico Beta-Hydroxybutyrate
BioET	Lengua Bioelectrónica Bioelectronic Tongue

C

CCS	Conteo de Células Somáticas Somatic Cell Count
CPE	Elementos de Fase Constante Constant Phase Elements
CPs	Polímeros Conductores Conducting Polymers
C-SPE	Electrodo Serigrafiado de Carbono Carbon Screen-Printed Electrode
CV	Voltamperometría Cíclica Cyclic Voltammetry

D

DET	Transferencia Directa de Electrones Direct Electron Transfer
DPV	Voltamperometría de Pulso Diferencial Differential Pulse Voltammetry

E

EIS	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica Electrochemical Impedance Spectroscopy
ELM	Máquinas de Aprendizaje Extremas Extreme Learning Machine
EMs	Métodos de Ensamble Ensemble Methods
EP	Epinefrina Epinephrine

VI

F

Fe₃O₄ Óxido de Hierro | Iron Oxide

G

GaOx Galactosa Oxidasa | Galactose Oxidase

GAs Algoritmos genéticos | Genetic Algorithms

GCE Electrodo de Carbono Vítreo | Glassy Carbon Electrode

GOx Glucosa Oxidasa | Glucose Oxidase

H

HCA Análisis Jerárquico de Clústeres | Hierarchical Cluster Analysis

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución | High-Performance Liquid Chromatography

I

IDE Electrodo Interdigitados | Interdigitated Electrodes

ILs Líquidos Iónicos | Ionic Liquids

ISE Electrodo Selectivo de Iones | Ion-Selective Electrodes

K

KN Núcleos | Kernels

KPCA Componentes principales por kernels | Kernel Principal Component Analysis

L

LDA Análisis Lineal Discriminante | Linear Discriminant Analysis

LLE Embedding de Laplaciano | Laplacian Linear Embedding

LS-SVM Máquinas de Vectores de Soporte con Mínimos Cuadrados | Least Squares Support Vector Machines

M

MIPs Polímeros de Impresión Molecular | Molecularly Imprinted Polymers

ML Aprendizaje Automático | Machine Learning

MOX Óxidos Metálicos | Metal Oxides

MPts	Metalofalocianinas Metallophthalocyanines
MRPV	Voltamperometría de Pulso Rectangular Multifrecuencia Multifrequency Rectangular Pulse Voltammetry
MS	Espectrometría de masas Masas Spectrometry
MSPV	Voltamperometría de Pulso Escalonado Multifrecuencia Multifrequency Step Pulse Voltammetry

N

NiO-SPE	Electrodo Serigrafiado de Óxido de Níquel Nickel Oxide Screen-Printed Electrode
NNs	Redes Neuronales Neural Networks

O

ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
------------	------------------------------------

P

PANI	Polianilina Polyaniline
PB-SPE	Electrodo Serigrafiado de Azul de Prusia Prussian Blue Screen-Printed Electrode
PCA	Análisis de Componentes Principales Principal Component Analysis
PCs	Componentes Principales Principal Components
PEDOT	Poli(3,4-etilendioxitiofeno) Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)
PLS	Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales Partial Least Squares
POT	Poli(3-octiltiofeno) Poly(3-octylthiophene)
PPy	Polipirrol Polypyrrole
PtNPs	Nanopartículas de Platino Platinum Nanoparticles
Pts	Ftalocianinas Phthalocyanines
PVC	Cloruro de Polivinilo Polyvinyl Chloride

R

Rct	Resistencia a la Transferencia Electrónica Charge Transfer Resistance
------------	---

S

VIII

SIMCA Clasificación Analítica basada en Modelos Independientes | Soft Independent Modelling of Class Analogy

SNF Índice de Sólidos No Grasos | Non-Fat Solids

SVM Máquinas de Vectores de Soporte | Support Vector Machines

SVMR Regresión de Vectores de Soporte | Support Vector Regression

SWV Voltamperometría de Onda Cuadrada | Square Wave Voltammetry

T

TC Tetraciclina | Tetracycline

TiO₂ Dióxido de Titanio | Titanium Dioxide

TPI Índice Total de Polifenoles | Total Polyphenol Index

U

UA Ácido Úrico | Uric Acid

UHT Tratamiento a Altas Temperaturas | Ultra High Temperature

W

WT Transformación Wavelet | Wavelet Transform

Z

ZnO-NPs Nanopartículas de Óxido de Zinc | Zinc Oxide Nanoparticles

β

β-Gal Beta-galactosidasa

Lista de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 2.1: Materiales avanzados aplicados en el desarrollo de sensores electroquímicos.

Tabla 2.2: Lenguas electrónicas aplicadas en la industria láctea.

Figuras

Figura 1.1: Número de publicaciones bajo el término “electronic tongue” por año.

Figura 2.1: Representación esquemática de una lengua electrónica.

Figura 2.2: Tipos de inmovilización de biorreceptores.

Figura 2.3: Tipos de biosensores según su generación.

Figura 2.4: Estructura de una red neuronal multicapa de propagación hacia adelante.

Contexto de la tesis

La presente Tesis Doctoral titulada “Nuevas Tecnologías en Lenguas Electrónicas Para Evaluar la Calidad de Productos Lácteos” se presenta mediante un compendio de publicaciones que ponen de manifiesto los resultados de la investigación realizada a lo largo de cinco artículos científicos publicados en revistas internacionales indexadas en JCR. Además, esta Tesis Doctoral cumple con los requisitos necesarios para ser acreditada con la Mención Internacional, ya que, durante el desarrollo de la misma, parte del trabajo fue realizado en la Universidad de Hallam de Sheffield (Reino Unido) bajo la supervisión del Prof. Aleksey Nabok y la Universidad Politécnica de Braganza (Portugal) con el Prof. Luis Dias.

La parte central de esta Tesis Doctoral se ha realizado en el grupo de investigación UVaSens de la Universidad de Valladolid supervisada por la Prof. Ana Cristina García Cabezón y la Prof. María Luz Rodríguez Méndez. El grupo de investigación UVaSens es uno de los pioneros en el desarrollo de sensores electroquímicos modificados con materiales avanzados y se especializa en el desarrollo e implementación de estos sensores para su aplicación en lenguas electrónicas. Su investigación no sólo incluye investigación básica dentro del área de los sensores voltamétricos, impedimétricos y potenciométricos, sino que también cuenta con una gran experiencia en el trabajo con industrias locales buscando soluciones a problemas reales de la industria mediante la implementación de estos dispositivos.

Capítulo 1

Problemática, Motivación y Objetivos

En este capítulo se introduce la motivación de la presente tesis doctoral, centrada en el desarrollo de tecnologías avanzadas, como lenguas electrónicas y bioelectrónicas, para mejorar el control de calidad en la industria láctea. Estas herramientas buscan superar las limitaciones de los métodos tradicionales gracias a su elevada capacidad analítica dentro del marco industrial actual. Además, se describen los objetivos de la investigación y se presenta la estructura de la tesis, diseñada para guiar al lector a lo largo del trabajo.

This chapter introduces the motivation behind the present doctoral thesis, focused on the development of advanced technologies, such as electronic and bioelectronic tongues, to improve quality control in the dairy industry. These tools aim to overcome the limitations of traditional methods due to their enhanced analytical capacity within the current industrial framework. In addition, the research objectives are outlined, and the structure of the thesis, designed to guide the reader throughout the work, is presented.

1.1 Problemática y Motivación

La motivación de la presente tesis doctoral sobre el desarrollo de lenguas electrónicas para el análisis de muestras de leche y el control de calidad de las mismas se fundamenta en la importancia crítica del sector lácteo, tanto a nivel global como a nivel nacional y muy en España, especialmente en regiones como Castilla y León, así como en la necesidad de adaptar las técnicas de control de calidad a las exigencias actuales de la industria y los consumidores dentro del marco de la Industria 4.0 basada en la digitalización y la interconexión de los procesos de fabricación mediante el uso de tecnologías avanzadas como la automatización, la inteligencia artificial y el Big Data.

El sector lácteo tiene un peso significativo en la economía global. Según la FAO, aproximadamente de 7.000 millones de personas a nivel mundial consumen diariamente productos lácteos, siendo la leche de vaca el producto más consumido en los países desarrollados [1] [2]. En España, la industria láctea representa uno de los pilares de la economía agroalimentaria, con una facturación anual media de alrededor de trece mil millones de euros y más de 60.000 empleos directos, que abarcan desde la comercialización de leche y derivados lácteos, hasta su producción [3]. En Castilla y León, una de las principales regiones productoras del país, esta industria es aún más relevante debido a su contribución al desarrollo rural y al mantenimiento del tejido socioeconómico de las zonas rurales.

En este contexto, la creciente demanda por parte de los consumidores de productos que no solo sean seguros y de alta calidad, sino que también ofrezcan beneficios nutricionales adicionales, ha generado la necesidad de sistemas de control de calidad más robustos y precisos. La legislación en materia de calidad alimentaria se ha vuelto más estricta, exigiendo a la industria láctea garantizar la estabilidad y seguridad de sus productos a lo largo de toda la cadena de producción y distribución [4]. Además, la producción láctea se enfrenta a la constante presión de optimizar costos sin comprometer la calidad. Por tanto, la digitalización y el uso de nuevas tecnologías de análisis son fundamentales para cubrir las necesidades del sector.

Actualmente, los métodos convencionales de control de calidad en el sector lácteo, como la cromatografía y la espectroscopía, son costosos, requieren preparación de las muestras y no permiten realizar mediciones en tiempo real ni en línea [5]. Estos métodos no satisfacen completamente las necesidades de los ganaderos, transportistas y operadores de las plantas de procesamiento de leche, que requieren una respuesta rápida y precisa para detectar cualquier alteración en el producto [6]. Las lenguas electrónicas, que son sistemas basados en sensores capaces de detectar y analizar compuestos químicos, a la vez que nos dan una información global de la muestra ofrecen una solución prometedora. Estas lenguas electrónicas permiten realizar análisis más rápidos, con menor costo e in situ, facilitando un control de calidad más eficiente en tiempo real [7].

El desarrollo de lenguas electrónicas se sitúa en un área científica de creciente interés, como lo demuestran los datos de publicaciones recientes. Según los informes de Web of Science, el número de publicaciones científicas relacionadas con lenguas electrónicas y sensores ha crecido exponencialmente en los últimos años, con más de 2.000 artículos publicados en revistas científicas indexadas en las últimas décadas (Figura 1.1) [8]. Este aumento refleja el interés de la comunidad científica por avanzar en esta tecnología y su aplicación en industrias clave como la alimentaria. Dentro de estas publicaciones, se destaca el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos, una subárea que no solo busca mejorar la sensibilidad y selectividad de los sistemas, sino también abordar el desafío de la selectividad cruzada, que es crítica para el análisis preciso de muestras de elevada complejidad como es la leche.

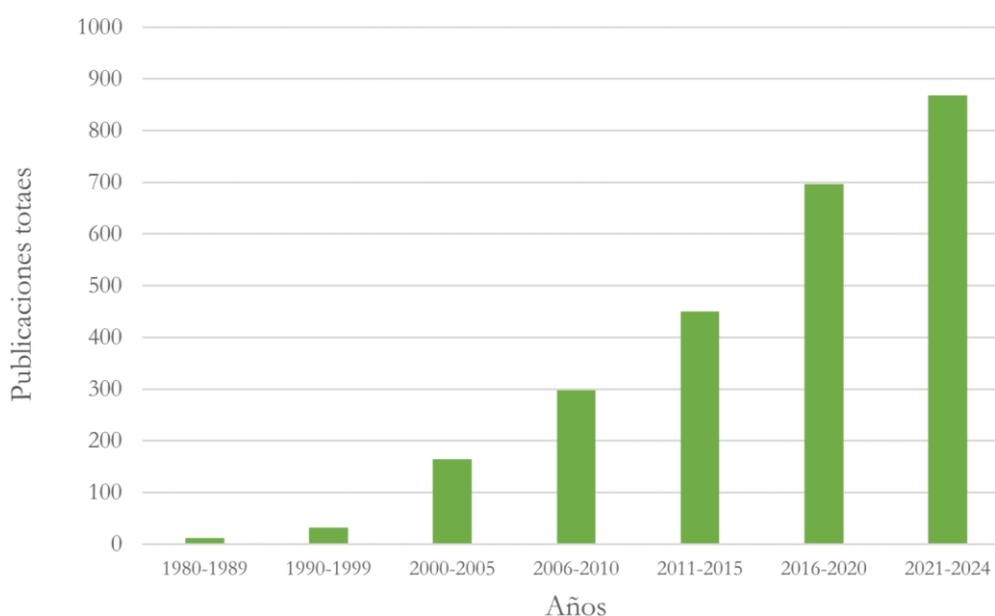


Figura 1.1. Numero de publicaciones bajo el término “electronic tongue” por año.

El desafío técnico principal en el desarrollo de lenguas electrónicas es asegurar la capacidad de los sensores para operar en condiciones de campo, sin necesidad de preparación previa de las muestras, y con alta especificidad y sensibilidad en la detección de compuestos críticos para la calidad de la leche. Los sensores de los que se dispone actualmente se enfrentan a problemas como el ensuciamiento de los dispositivos o la elevada presencia de agentes interferentes en el análisis de muestras reales de alimentos, lo que exige pasos adicionales de pretratamiento, afectando a la rapidez del análisis [9]. Además, los materiales de detección tienen una vida útil limitada, lo que implica que el sistema debe ser recalibrado y exige un mantenimiento frecuente [10].

En este sentido, existe un interés creciente en el desarrollo no solo de sistemas basados en sensores electroquímicos tradicionales, sino también sensores y biosensores avanzados, con propiedades mejoradas. Los biosensores, en particular, son capaces de ofrecer una

elevada selectividad mediante el uso de biomoléculas biológicas como las enzimas, anticuerpos o ácidos nucleicos que actúan como elementos de reconocimiento [11]. Estos materiales avanzados, cuando se combinan con tecnologías de nanomateriales y técnicas de inmovilización innovadoras, permiten una mejora sustancial en la sensibilidad de los dispositivos y su capacidad para diferenciar entre múltiples analitos en una muestra detectando con mayor precisión los compuestos críticos para la calidad láctea [12]. No obstante, estas tecnologías todavía no están lo suficientemente estudiadas como para permitir su implementación real en las industrias, haciendo necesario profundizar en la investigación que permita su implantación en sistemas de análisis de muestras reales.

Otro avance importante es la implementación de metodologías de procesamiento de datos complejas para interpretar los datos obtenidos de los sensores. Los avances en metodologías de procesamiento de datos, como las redes neuronales y los algoritmos de aprendizaje automático, han transformado el campo de la quimiometría, permitiendo un análisis más preciso y eficiente de los datos obtenidos de sensores en tiempo real. Estas técnicas han tenido un impacto significativo en múltiples sectores, especialmente en la industria alimentaria, donde han sido capaces de optimizar los sistemas de control de calidad determinar con alta precisión la composición de las muestras poniendo de manifiesto cambios en la mismas que podrían comprometer la seguridad alimentaria. Gracias a métodos de cálculo mejorados y a nuevas técnicas de “machine learning”, los sistemas de análisis predictivo ahora permiten a los fabricantes anticipar problemas de calidad y ajustar sus procesos de producción de manera automática e inteligente, en sintonía con los principios de la Industria 4.0. Esto ha facilitado una integración más profunda de los sistemas de quimiometría en los procesos industriales, incrementando la eficiencia, reduciendo pérdidas y asegurando la consistencia de los productos en un entorno de producción automatizado y adaptativo [13][14].

Por todos estos motivos, las lenguas electrónicas representan una herramienta crucial para la transformación digital del sector lácteo. Estas tecnologías, cuando se implementen de manera eficaz, permitirán a la industria láctea controlar de forma precisa los parámetros de calidad de la leche durante el procesamiento y la distribución, asegurando que el producto final cumpla con los estándares de calidad exigidos por los consumidores y las normativas. Además, al integrarse en plataformas interconectadas, las lenguas electrónicas facilitarán la toma de decisiones en tiempo real, lo que redundará en una mejora de la eficiencia operativa y una reducción de los costes.

En resumen, el desarrollo de lenguas electrónicas adaptadas a las necesidades del sector lácteo no solo responde a una demanda tecnológica y científica, sino que también aborda un desafío económico y social al mejorar los sistemas de control de calidad de un sector clave en la economía española. La investigación en esta área tiene el potencial de revolucionar los métodos actuales de análisis, aportando soluciones que aseguren la calidad de los productos

lácteos y, al mismo tiempo, contribuyan a la competitividad y sostenibilidad de la industria dentro del marco de la Industria 4.0.

1.2 Objetivos

El objetivo general de la presente tesis doctoral es:

El desarrollo de lenguas electrónicas y/o bioelectrónicas capaces de determinar cambios globales en la matriz de productos lácteos, estableciendo correlaciones con técnicas analíticas tradicionales para su aplicación en la industria láctea, con el fin de optimizar el control de calidad y evaluar la integridad y autenticidad de muestras de leche líquida.

Para ello se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. **Preparación de sensores electroquímicos avanzados**
 - 1.1. Desarrollar sensores electroquímicos utilizando diferentes técnicas (voltamétricas, potenciométricas e impedimétricas) para mejorar la sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad en la detección de compuestos clave en productos lácteos.
 - 1.2. Evaluar el rendimiento de los sensores electroquímicos en función de su sensibilidad y selectividad.
 2. **Optimización mediante nanotecnología**
 - 2.1. Emplear nanomateriales, como nanopartículas metálicas, en su rol como mediadores electrónicos para maximizar el efecto electrocatalítico en los sensores.
 3. **Desarrollo y aplicación de biosensores enzimáticos**
 - 3.1. Implementar biosensores multienzimáticos que operen de manera simultánea para la identificación de moléculas de interés en la leche, como triglicéridos, azúcares (lactosa, glucosa, galactosa), ácidos orgánicos (ácido láctico) y bases (urea).
 4. **Modificación química de electrodos**
 - 4.1. Desarrollar nuevas estrategias de modificación química adaptadas a cada tipo de sensor para optimizar su respuesta en entornos complejos como la leche líquida.
-

- 4.2. Evaluar la influencia de las modificaciones químicas en la mejora de la selectividad y sensibilidad de los sensores.

5. **Estudio de la sensibilidad y selectividad**

- 5.1. Analizar la respuesta electrocatalítica del sensor frente a compuestos clave como azúcares, ácidos orgánicos y sales bajo condiciones de pH y temperatura específicas de la leche líquida.
- 5.2. Determinar los límites de detección, la sensibilidad, la estabilidad y la reproducibilidad de los sensores.

6. **Metodología para el análisis de leche líquida**

- 6.1. Desarrollar de una metodología integral que permita analizar muestras de leche líquida, con la capacidad de discriminar entre muestras con diferentes características nutricionales, composición y origen.

7. **Validación de las lenguas electrónicas en muestras de interés**

- 7.1. Aplicar el sistema para evaluar la influencia de los procesos de preservación en las muestras de leche, detectando alteraciones inducidas por el almacenamiento o por la adición de conservantes.
- 7.2. Analizar la capacidad del sistema en la detección de adulteraciones en leche líquida, como la mezcla con leche caprina o la leche proveniente de vacas bajo tratamiento farmacológico.
- 7.3. Aplicar el sistema diseñado en el análisis de muestras de leche comercial con distintas características nutricionales.

8. **Creación de modelos matemáticos predictivos**

- 8.1. Desarrollar modelos matemáticos para la discriminación de diferentes tipos de leche según su composición nutricional de forma no supervisada.
 - 8.2. Aplicar técnicas de procesamiento de datos para la selección de variables.
 - 8.3. Desarrollar de modelos de predicción multiparamétricas a partir de entre los resultados del sistema y de los parámetros fisicoquímicos obtenidos mediante métodos tradicionales de análisis químicos normativos, con el objetivo de validar los resultados y crear modelos predictivos de parámetros clave en la calidad de los productos lácteos.
-

- 8.4. Desarrollar modelos matemáticos complejos para la predicción y clasificación de distintos tipos de leche mediante el acoplamiento de múltiples técnicas quimiométricas.

Además de los objetivos técnicos y científicos planteados, los trabajos desarrollados en esta tesis doctoral se alinean con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) 9 y 12 de la Agenda 2030. En relación con el ODS 9 (Industria, innovación e infraestructura), el desarrollo de lenguas electrónicas y bioelectrónicas supone la implementación de nuevas tecnologías de detección y análisis que fomentan la innovación dentro de la industria láctea. Estas herramientas aportan soluciones novedosas a los desafíos de calidad y autenticidad en productos lácteos, promoviendo así una industrialización novedosa y sostenible en el sector alimentario. Por otra parte, el trabajo también contribuye al ODS 12 (Producción y consumo responsables), ya que los métodos y modelos predictivos desarrollados optimizan el control de calidad promoviendo un uso responsable y eficiente de los recursos naturales en la cadena de producción de leche. En este sentido, la investigación no solo responde a objetivos científicos específicos, sino que también impulsa la sostenibilidad y la innovación en la producción de alimentos.

1.3 Estructura de la tesis

La presente tesis doctoral se encuentra estructurada en seis capítulos que buscan ilustrar sobre su motivación, el estado de la técnica en la actualidad y las contribuciones de la tesis en el ámbito de la misma.

CAPÍTULO 1 Problemática, Motivación y Objetivos

Este capítulo en el que nos encontramos ha buscado sentar las bases del trabajo, explicando la problemática actual relacionada con los métodos tradicionales de control de calidad en la industria láctea. Aquí se expone la motivación del estudio, destacando la relevancia económica del sector lácteo en España y la necesidad de adaptar las tecnologías de análisis a las demandas de la Industria 4.0. Además, se definen claramente los objetivos tanto generales como específicos de la tesis, los cuales se centran en el desarrollo de lenguas electrónicas capaces de analizar la calidad de la leche.

CAPÍTULO 2 Estado del Arte

En este apartado, se presenta una revisión exhaustiva de las investigaciones previas relacionadas con el uso de lenguas electrónicas, sensores electroquímicos y biosensores aplicados al análisis de alimentos, específicamente en el análisis de muestras de leche. Se describen los últimos avances en la mejora de sensores electroquímicos, mediante la incorporación de nanomateriales y biorreceptores en su fabricación; así como la importancia de la aplicación de técnicas quimiométricas en el desarrollo de lenguas electrónicas. Además, se presentan las principales aplicaciones de estas tecnologías en la industria láctea permitiendo obtener una visión en profundidad de los retos a los que nos enfrentamos.

CAPÍTULO 3 Resultados

Este capítulo presenta cinco artículos científicos derivados del trabajo de investigación original llevado a cabo durante la tesis doctoral. Estos artículos exploran diferentes enfoques en el desarrollo de lenguas electrónicas y bioelectrónicas, con el objetivo de mejorar el análisis de calidad de la leche en la industria láctea. A continuación, se describen brevemente los estudios:

Artículo 1 “Impact of milk preservation in the classification and prediction capabilities of a voltammetric electronic tongue”

Este artículo aborda el impacto de la preservación de la leche en la aplicación de una lengua electrónica voltamétrica, resaltando la importancia de estandarizar los métodos de conservación para una mayor precisión de los resultados.

Artículo 2 “Analysis of milk adulteration by means of a potentiometric electronic tongue”

Este trabajo se enfoca en la detección de adulteraciones en la leche mediante el uso de una lengua electrónica potenciométrica, destacando su eficacia en la identificación de mezclas con leches de diferentes especies o la adición de agua.

Artículo 3 “Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors”

En este artículo se realizó una selección de sensores para desarrollar una lengua electrónica portátil, utilizada para el análisis rápido y preciso de la composición de la leche en diferentes entornos industriales.

Artículo 4 “Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylate-PVC membranes modified with gold nanoparticles”

En él se detalla el desarrollo de una lengua bioelectrónica modificada con nanopartículas de oro y enzimas específicas para la caracterización detallada de la leche, aumentando la sensibilidad y precisión del sistema.

Artículo 5 “A new data analysis approach for an AgNPs-modified impedimetric bioelectronic tongue for dairy analysis”

En este estudio, se explora una nueva estrategia utilizando una lengua bioelectrónica impedimétrica modificada con nanopartículas de plata, comparando diferentes técnicas de procesamiento de datos con la intención de mejorar la capacidad analítica del sistema.

CAPÍTULO 4 Conclusiones y Perspectivas Futuras

En este cuarto capítulo se sintetizan las conclusiones generales del trabajo, subrayando la contribución de la tesis al desarrollo de nuevas tecnologías para la industria láctea. Asimismo, se proponen futuras líneas de investigación para continuar mejorando las lenguas electrónicas y su integración en sistemas de producción inteligente.

CAPÍTULO 5 Bibliografía

El penúltimo capítulo de esta tesis presenta la recopilación de todas las referencias bibliográficas utilizadas a lo largo de la totalidad de este trabajo.

CAPÍTULO 6 Anexos

Finalmente, el capítulo seis presenta los listados de publicaciones, congresos y jornadas nacionales e internacionales y certificados de estancias de investigación en centros extranjeros llevadas a cabo durante el periodo de la tesis doctora

Capítulo 2

Estado del Arte

Las lenguas electrónicas han despertado un gran interés en la comunidad científica en la última década. Su capacidad para analizar matrices complejas de manera precisa y en tiempos cortos las convierte en herramientas de gran utilidad para integrarlas en líneas de producción y control de calidad. En este capítulo se expone el concepto y la evolución de esta tecnología, desde sus principios básicos hasta su implementación en aplicaciones prácticas, principalmente en la industria alimentaria y específicamente en la industria láctea. Se describen los principales tipos de sensores empleados abordando los avances más recientes en su optimización mediante el uso de materiales avanzados, como nanomateriales metálicos, así como la incorporación de biorreceptores debido a sus beneficios y/o efectos sinérgicos. Además, se revisan las principales técnicas quimiométricas utilizadas para el análisis, clasificación y predicción de datos generados por lenguas electrónicas. Finalmente, se realiza una revisión de las aplicaciones prácticas de las lenguas electrónicas y bioelectrónicas en la industria láctea.

Over the past ten years, the scientific community has become very interested in electronic tongues. Their ability to analyze complex matrices accurately and in short time frames makes them highly useful tools for integration into production lines and quality control. This chapter presents the concept and evolution of this technology, from its fundamental ideas to its use in real-world applications, primarily in the food industry and more especially in the dairy sector. The main types of sensors used are described, addressing the most recent advances in their optimization using advanced materials, such as metallic nanomaterials, as well as the incorporation of bioreceptors due to their benefits and/or synergistic effects. In addition, the main chemometric techniques used for the analysis, classification, and prediction of data generated by electronic tongues are reviewed. Finally, a review is provided of the practical applications of electronic and bioelectronic tongues in the dairy industry.

2.1 Lenguas electrónicas

A lo largo de la historia, el control de seguridad y calidad de las industrias alimenticias, tanto en términos de producto final como en los procesos de producción, se ha realizado normalmente mediante mediciones fisicoquímicas, es decir, valor de pH, color y concentración de determinadas sustancias químicas o biomoléculas, generalmente determinadas mediante cromatografía o espectroscopia [15]. Una vez autenticado el alimento, la principal técnica para la evaluación de la calidad, desde el punto de vista del consumidor, es el análisis sensorial, que se basa en la evaluación de los atributos perceptibles por los cinco sentidos, y permite establecer el perfil organoléptico de los diversos productos [16].

Los métodos basados en el análisis sensorial presentan limitaciones, como la subjetividad de los evaluadores, su capacidad limitada para detectar cambios sutiles en la composición química de los productos, además de largos tiempos de análisis y complejos procesos de pretratamiento de muestras [17]. En los últimos años, la globalización de las industrias y el aumento de la competitividad en los mercados, junto con la creciente exigencia de los consumidores por productos de mayor calidad y seguridad, han hecho que el desarrollo de nuevas técnicas de análisis en la industria sea una necesidad. En este contexto, las lenguas electrónicas han surgido como una herramienta poderosa para satisfacer estas demandas, ofreciendo un análisis rápido, preciso y sostenible, sin necesidad de depender de paneles sensoriales ni de técnicas analíticas complejas y costosas [18].

Según la IUPAC, una lengua electrónica es “Un dispositivo analítico que incluye una serie de sensores químicos no selectivos con especificidad parcial para diferentes analitos, que trabajan en conjunto con un software de reconocimiento de patrones y son capaces de reconocer, discriminar y clasificar matrices simples y complejas” [19]. Es decir, las lenguas electrónicas son dispositivos diseñados con el objetivo de imitar la capacidad sensorial humana, específicamente el sentido del gusto. La red de sensores que compone la lengua electrónica sería equivalente a las papilas gustativas de la lengua en el sistema biológico, capaces de detectar diferentes sustancias químicas y enviar información de diferentes señales a un ordenador. Por su parte, el ordenador reemplaza al cerebro en el sistema biológico, analizando y procesando a través de un software la información que se le proporciona, distinguiendo e identificando las características generales de cada sustancia una vez que ha sido entrenado (Figura 2.1). El proceso de detección de la lengua electrónica consiste en la interacción entre la muestra y los sensores lo que genera una serie de señales que mediante un correcto procesamiento utilizando algoritmos matemáticos permiten realizar el análisis y clasificación de estas [20].

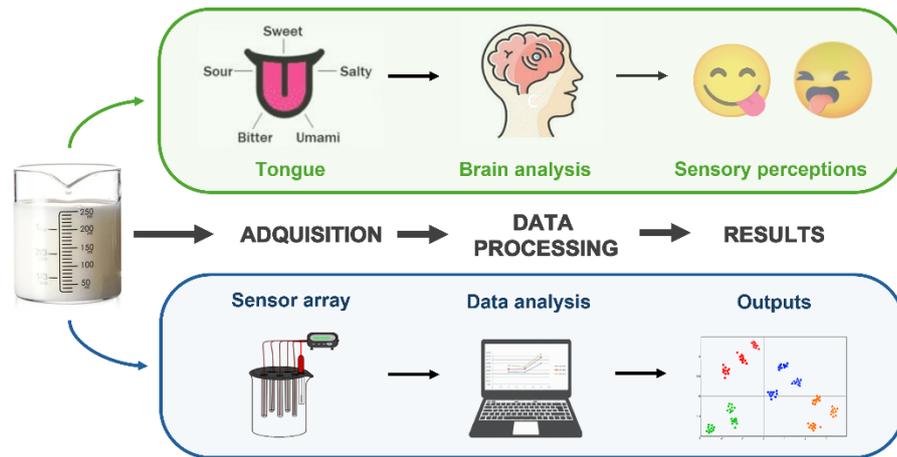


Figura 2.1. Representación esquemática de una lengua electrónica.

Los principios básicos de las lenguas electrónicas son: (1) alta selectividad cruzada de los sensores que la componen y (2) elevada capacidad para analizar estadísticamente las respuestas de múltiples sensores. La primera característica permite a cada sensor responder a múltiples analitos con diferente intensidad, generando un patrón de respuesta característico de cada muestra analizada, lo cual permite un análisis detallado de matrices químicamente complejas. Se ha demostrado que el rendimiento de los sensores individualmente se puede mejorar en términos del límite de detección y selectividad mediante la inclusión de datos provenientes de sensores con señales aparentemente inespecíficas. Por este motivo, la combinación de diferentes tipos de sensores permite una mejor resolución de las señales, optimizando el análisis de sustancias incluso en entornos con múltiples interferencias [21].

Por otra parte, los métodos estadísticos desempeñan un papel crucial para procesar y analizar los datos generados por los sensores. Estas técnicas permiten reducir la dimensionalidad de los datos, mejorar la precisión en la clasificación de las muestras y detectar variaciones sutiles en las señales que de otro modo pasarían desapercibidas. Sin un análisis estadístico adecuado, sería difícil extraer información valiosa y convertir las respuestas de los sensores en resultados fiables y de utilidad práctica [22].

Comenzando con la primera lengua electrónica, desarrollada a finales del siglo XX, hasta el día de hoy, se han realizado numerosos avances en su diseño y aplicaciones. En 1989, Hayashi y colaboradores desarrollaron los que son considerados como los primeros sensores de una lengua electrónica, basándose en electrodos multicanal con transductores compuestos por membranas poliméricas lipídicas sensibles a iones [23]. Entre los pioneros en este campo también se encuentran investigadores como Winquist y Lundström, quienes en 1997 diseñaron una lengua electrónica voltamperométrica para el análisis de zumos de frutas, bebidas y leche. Este trabajo demostró la capacidad de combinar diferentes tecnologías de medición como la potenciometría, la voltamperometría y la conductividad eléctrica mediante la utilización de electrodos metálicos para la obtención de diferentes respuestas de potencial [24]. Posteriormente, Legin y colaboradores también aplicaron electrodos selectivos en estado sólido en el desarrollo de una lengua electrónica [25] y presentaron una primera

aproximación a su aplicación en el análisis y la determinación de la calidad de productos alimenticios como el vino [26].

De hecho, aunque las lenguas electrónicas se han utilizado principalmente en la industria alimentaria para mejorar el control de calidad y reducir la dependencia de los paneles sensoriales, su versatilidad ha permitido su aplicación en múltiples sectores tales como la industria farmacéutica, donde se utilizan para monitorear la homogeneidad y estabilidad de productos [27]; o en el ámbito sanitario, donde han sido empleadas en el diagnóstico de diversas enfermedades a través del análisis de fluidos corporales como la saliva o la orina [28]. Otra aplicación relevante de las lenguas electrónicas se encuentra en la monitorización ambiental, donde se utilizan para detectar contaminantes en el agua. Tal y como demostraron los trabajos de Vlasov y su equipo, que extendieron el uso de estas tecnologías hacia el análisis de metales pesados y otros contaminantes peligrosos en muestras de agua potable o industrial, un proceso esencial para la seguridad ambiental y la salud pública [29].

Por otra parte, el diseño de los sensores utilizados en la construcción de lenguas electrónicas varía en función de la aplicación. No obstante, la tendencia que se ha seguido en estos años ha sido priorizar la miniaturización y mejorar la robustez de los sensores. Esta evolución ha permitido la creación de dispositivos más compactos, con una mayor densidad de sensores por dispositivo, y/o el aumento de la complejidad de estos mediante la inclusión de materiales avanzados para mejorar la precisión de los análisis como polímeros conductores los cuales han permitido mejorar la selectividad y sensibilidad de los dispositivos [30]. Adicionalmente, los estudios realizados por Ciosek y su equipo entre otros, sobre la importancia de mejorar la selectividad cruzada de los sensores han permitido que las lenguas electrónicas imiten mejor el comportamiento de la lengua humana, ofreciendo un análisis más preciso de la complejidad de los sabores presentes en los alimentos [31].

Los avances en el software y hardware también han sido claves en la evolución de las lenguas electrónicas. Hoy en día, quedarse sin capacidad de cálculo matemático no parece un problema grave, incluso en el caso de matrices de datos provenientes de redes de sensores compuestas por docenas de sensores, no obstante, el aumento excesivo del número de dispositivos aún puede implicar problemas. Es por ello, que la aplicación de nuevos sistemas de análisis de datos basadas en técnicas multivariantes de elevada complejidad ha sido un punto clave en la mejora de la precisión y la capacidad de discriminación de estas tecnologías [32]. Al combinar las respuestas de múltiples sensores y utilizar algoritmos como el análisis por componentes principales (PCA) o las redes neuronales artificiales (ANN), es posible identificar patrones en los datos que reflejan la existencia de compuestos específicos de interés en las muestras, incluso en condiciones en las que otras técnicas analíticas no las observarían debido a la presencia de numerosos interferentes [33][34]. Este enfoque multiparamétrico, junto con la capacidad de trabajar con grandes volúmenes de datos han permitido que las lenguas electrónicas sean herramientas de alta eficiencia y precisión.

A pesar de las numerosas ventajas que presentan las lenguas electrónicas, todavía existen ciertos desafíos por superar. Uno de los principales inconvenientes de estos sistemas es la susceptibilidad de los sensores a las interferencias externas, que pueden afectar la precisión de los resultados. Además, la falta de estandarización en la fabricación de estos dispositivos y en los métodos de análisis quimiométrico puede generar diferencias significativas en los resultados entre distintos laboratorios [35]. Esto ha generado la necesidad de desarrollar sensores con mayor sensibilidad, metodologías de análisis más robustas que permitan comparar resultados de forma confiable, y herramientas estadísticas avanzadas para un procesamiento de datos más eficiente y preciso. En este contexto, esta tesis doctoral busca contribuir al avance de las lenguas electrónicas para abordar estos desafíos.

2.2 Técnicas de detección electroquímica

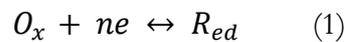
Una de las partes fundamentales en el diseño de las lenguas electrónicas es la red de sensores que la integran, se ha empleado una gran variedad de sensores químicos que pueden agruparse por su principio de actuación en: electroquímicos, ópticos, másicos y piezoeléctricos [36] [37]. Las características de estos sensores serán por tanto diferentes a las de los sensores químicos tradicionales. En lugar de una alta selectividad en la detección sustancias específicas, tendrán una elevada selectividad cruzada que proporciona información global sobre la muestra analizada, cumpliendo con el principio básico de las lenguas electrónicas [38]. Dentro de los diferentes tipos de sensores utilizados en lenguas electrónicas, los electroquímicos son los más empleados debido a su sencillez, alta sensibilidad, coste reducido y capacidad para miniaturizarse y adaptarse a sistemas portátiles.

Los sensores electroquímicos se pueden clasificar desde el punto de vista metodológico en dinámicos y estáticos. En los sensores dinámicos, la corriente fluye como resultado de una reacción de oxidación o reducción, y la concentración de las especies en la celda variará (generalmente de manera insignificante durante el breve período de análisis), como consecuencia de la reacción redox. Para regular el flujo de electrones, se utilizan métodos basados en el control de corriente, en los cuales el analito se oxida o reduce al aplicar una corriente a través de la celda [39]. Alternativamente, se pueden emplear métodos de potencial controlado, donde se genera una diferencia de potencial para oxidar o reducir el analito. Estos últimos métodos pueden subdividirse en aquellos de potencial constante, como la amperometría, en los que el potencial se mantiene fijo durante el análisis, y los métodos de potencial dinámico, como la voltamperometría, donde el potencial varía sistemáticamente [40]. En este grupo también se incluyen los métodos impedimétricos, que miden la impedancia del sistema para evaluar propiedades electroquímicas del analito [41]. Estos sistemas de detección electroquímica generalmente operan con una configuración de tres electrodos. Este sistema emplea un electrodo de trabajo, que actúa como transductor detectando los cambios producidos en su superficie por la reacción electroquímica de interés; un electrodo de referencia, el cual posee un potencial constante conocido, que permite medir el potencial entre este y el electrodo de trabajo; junto con un contraelectrodo o electrodo auxiliar, que cierra el circuito permitiendo el paso de corriente sin alterar el potencial del sistema.

Por otra parte, en los sensores estáticos, como los potenciométricos, donde no fluye corriente entre los electrodos y el sistema está gobernado por la difusión y el movimiento browniano, se puede utilizar una configuración de dos electrodos, eliminando la necesidad de un electrodo auxiliar. En este régimen, las concentraciones de las especies en la celda permanecen constantes, siendo la potenciometría uno de los métodos estáticos más relevantes para el diseño de lenguas electrónicas [42].

Al mismo tiempo, los sensores electroquímicos pueden subdividirse en cuatro categorías principales en función de la metodología de trabajo: amperométricos, voltamétricos, potenciométricos, e impedimétricos. A continuación, se propone una breve explicación de los principios de funcionamiento y algunas aplicaciones particulares de cada uno de ellos.

En primer lugar, tal como se ha mencionado anteriormente, los sensores amperométricos se basan en la reducción u oxidación electroquímica de una especie electroactiva mediante la aplicación de un potencial apropiado sobre un electrodo. Esto da como resultado una corriente anódica o catódica estable. De esta manera, en la amperometría, la corriente generada a partir de una reacción faradaica será proporcional a la concentración del o los analitos presentes en la disolución [43]. La reacción más simple que puede ocurrir en la superficie del electrodo de trabajo, polarizado a un potencial adecuado, sigue(1):



donde O_x representa la especie oxidada, R_{ed} la especie reducida, y n es el número de electrones transferidos en la reacción. A un potencial constante, la transferencia de electrones ocurre de manera controlada por difusión, lo que implica que el proceso se encuentra gobernado por la transferencia de materia [44]. La corriente controlada por difusión i depende, por tanto, del espesor de la capa de difusión δ , el coeficiente de difusión del analito D , del número de electrones transferidos n , de la concentración del analito C_{bulk} , del área superficial A del electrodo y de la constante de Faraday F , como se muestra en la siguiente ecuación (2):

$$i = \frac{nFAD(C_{bulk} - C_{x=0})}{\delta} \quad (2)$$

donde C_{bulk} y $C_{x=0}$ representan la concentración de analito en la solución y la concentración en la superficie del electrodo respectivamente.

Por otro lado, la cronoamperometría es una técnica que depende del tiempo y se basa en aplicar un potencial de onda cuadrada sobre el electrodo de trabajo. Esta corriente registrada en el electrodo varía con el tiempo y refleja los procesos de difusión del analito a través de la solución hasta alcanzar la superficie del sensor. Por lo tanto, la cronoamperometría se puede utilizar para medir la dependencia entre corriente y tiempo de los procesos de difusión que tienen lugar en un electrodo dando información sobre la cinética de la reacción [45].

Tanto la amperometría como la cronoamperometría se han empleado ampliamente en el desarrollo de transductores químicos para la evaluación directa de la concentración de compuestos electroactivos. Un ejemplo de su aplicación es en la detección de niveles de glucosa mediante la oxidación de azúcares mediada por la utilización de elementos

electroactivos como nanomateriales y de biorreceptores como las enzimas [46] [47]. Sin embargo, existen todavía algunas limitaciones, un inconveniente importante de estos sensores amperométricos es que durante las reacciones de oxidación o reducción, los analitos se deben absorber en la superficie del sensor para intercambiar electrones produciendo el flujo de electrones y en función de la naturaleza de los analitos y del tipo de material del sensor, el proceso de desorción puede ser lento o no ocurrir en absoluto, lo que hace que la superficie del sensor se altere significativamente. Dicha alteración puede, a su vez, causar una deriva en la respuesta en función del tiempo [48][49].

Los sensores voltamétricos se basan en una técnica electroquímica avanzada ampliamente utilizada en diversas áreas. A diferencia de los sensores amperométricos, en los que se aplica un potencial constante, los sensores voltamétricos emplean un potencial variable que cambia a lo largo del tiempo. Esto permite obtener información más rica sobre los procesos electroquímicos involucrados, ya que se pueden observar tanto los fenómenos de oxidación como los de reducción de los analitos en función del potencial aplicado.

Se aplica un barrido de potencial al electrodo de trabajo obteniendo como resultado una corriente generada debido a la reducción y oxidación de los analitos [50]. El valor de la corriente estará por tanto relacionado con la concentración de los analitos. La relación entre el potencial medido E y la corriente resultante I es la mostrada en la siguiente ecuación (3):

$$I = E e^{-\frac{t}{B}} \cdot \frac{R_S}{R_S} \quad (3)$$

donde R_S es la resistencia de la solución del analito, R_S es la resistencia interna del sistema, t es el tiempo transcurrido después del inicio de un pulso de voltaje y B es una constante de capacitancia equivalente relacionada con el electrodo [51].

Existen múltiples técnicas voltamétricas que se diferencian en función de la forma de aplicación del barrido de potencial. Por ejemplo, la voltametría de barrido lineal (LSV) implica un incremento o disminución lineal del potencial en el tiempo, permitiendo observar la respuesta electroquímica de los analitos en función de este. Por otra parte, en la voltametría cíclica (CV), el potencial realiza barridos cíclicos entre dos valores límites, lo que permite registrar corrientes tanto en los procesos de oxidación como de reducción, proporcionando una visión más completa de las especies redox presentes en la solución y su identificación [52]. La voltametría cíclica se utiliza en numerosas aplicaciones como herramienta para la adquisición de datos críticos, como son los mecanismos de oxidación/reducción, la determinación de potenciales formales, la transferencia de electrones y la cinética de transferencia de electrones [53]. Finalmente, la voltametría de pulsos aplica pulsos de potencial con amplitud y frecuencia definidas, como en la voltametría de onda cuadrada (SWV) o en la de pulso diferencial (DPV), técnicas capaces de mejorar la relación señal-ruido, especialmente en mediciones a bajas concentraciones de analito ya que mejoran la

sensibilidad y permiten detectar cambios sutiles en las propiedades electroquímicas de las especies presentes en la disolución [54].

Desde los primeros trabajos desarrollados por Winquist en Linköping (Suecia), donde un conjunto de sensores, basados en diferentes electrodos metálicos fueron utilizados aplicando voltametría de pulso diferencial (DPV) junto con análisis multivariante para generar información analítica en la identificación y clasificación de muestras de zumo y bebidas sin gas [55]. Desde entonces, se han realizado estudios extensivos para optimizar los materiales empleados en los electrodos de trabajo. Algunos ejemplos de ello son el estudio de los procesos electroquímicos en electrodos de mercurio [56] basado en el trabajo pionero y ganador del Premio Nobel de Heyrovský [57] o la publicación clave de Nicholson y Shain [58] que permitió aplicar criterios simples para el análisis de voltamogramas cíclicos sin que se necesitase un análisis completo de la forma del voltamograma. Todo ello ha contribuido a convertir las lenguas electrónicas voltamétricas en una gran fuente de información analítica simultánea sobre componentes electroactivos presentes en muestras complejas.

El principio de funcionamiento de los sensores potenciométricos se basa en medir el potencial de los electrodos de trabajo sin polarización, es decir en ausencia de corriente, por lo que el potencial será resultado de la actividad iónicas de las diferentes especies presentes en la disolución sobre la superficie del sensor. Por tanto, será en la superficie del sensor donde tengan lugar las interacciones que dan lugar a la capacidad selectiva del sistema y el reconocimiento iónico de las moléculas del analito [59][60]. Por tanto, estos sensores se basan en la ley de Nernst, que establece que el potencial que se genera en la superficie del electrodo de trabajo será proporcional a la concentración del ion en la solución. La ecuación de Nernst (4), que describe esta relación, es la siguiente:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln a \quad (4)$$

donde E es el potencial medido, E° el potencial estándar, T la temperatura, R la constante de los gases, n el número de electrones transferidos, F la constante de Faraday, y a la actividad iónica en la disolución. En condiciones estándar, esta relación permite que los sensores potenciométricos determinen la concentración de iones de manera precisa y directa, ya que el potencial varía de forma logarítmica con respecto a la actividad iónica [61].

Los sensores potenciométricos fueron los primeros y siguen siendo los más ampliamente utilizados para el desarrollo de lenguas electrónicas, debido a su bajo costo, fácil fabricación y capacidad de miniaturización [62] Las lenguas electrónicas potenciométricas se han utilizado en numerosas aplicaciones permitiendo clasificar aceites de oliva obtenidos de cultivares de olivo individuales [63], diferenciar mieles producidas en diferentes estados de los Estados Unidos [64], discriminar entre diferentes cervezas y vinos comerciales [65][66], y cuantificar azúcares en disoluciones acuosas [67] entre otras muchas. Los electrodos selectivos de iones (ISEs) representan el grupo más numeroso dentro de los sensores

potenciométricos [68], caracterizándose por su reducido tamaño, su portabilidad, su bajo consumo de energía y su bajo costo, características atractivas en cuanto a aplicaciones a nivel industriales.

Los sensores potenciométricos utilizan diferentes tipos de membranas, siendo las más comúnmente utilizadas las membranas de vidrio (glass membrane), cristalinas/estado sólido (crystalline/solid-state membrane), membranas líquidas (liquid membranes) y membranas poliméricas (polymeric membranes) [69][70][71][72]. La selección de cada tipo de membrana dependerá de la aplicación del sistema, por ejemplo, los electrodos de membrana de vidrio están hechos de vidrio de silicato, que se utiliza típicamente para la determinación de H^+ (pH) y Na^+ [73]. Las membranas cristalinas o de estado sólido están compuestas por sales inorgánicas, como $AgCl$, Ag_2S y LaF_3 y se utilizan principalmente en la determinación de iones Cl^- y F^- [74]. Por otra parte, los ISEs basados en membranas poliméricas que contienen portadores neutros (aditivos) o cargados (ionóforos) están disponibles para la determinación de una gran cantidad de iones [75]. Las membranas poliméricas están compuestas típicamente por resina de policloruro de vinilo (PVC), a la que se añaden plastificantes y el portador o intercambiador de iones en proporciones estándar en masa con una relación de PVC y plastificante 1-2 % en peso, con un 1-3 % en peso de aditivo o intercambiador de iones [76][77].

La principal ventaja de los sensores potenciométricos es la gran variedad de membranas disponibles para integrar en un único dispositivo, tanto específicas como inespecíficas, asegurando la selectividad cruzada del sistema lo que permite aplicarlos en el análisis de una amplia variedad de muestras líquidas [59]. No obstante, una de las desventajas de estos sistemas es que la mayoría fueron diseñados originalmente para detectar iones inorgánicos, por lo que los sensores potenciométricos dirigidos a iones orgánicos no han sido investigados de forma tan extensa [78][79]. Una opción para el estudio de especies no iónicas en sensores potenciométricos es la utilización de enzimas u otros biorreceptores, los cuales al interactuar con el analito producen cambios en la disolución detectables por el sistema electroquímico [80].

Finalmente, los sensores impedimétricos se basan en una técnica electroquímica que mide la resistencia y la capacitancia del sistema electrodo-electrolito, proporcionando información sobre los cambios en las propiedades eléctricas del medio a medida que ocurre una reacción o interacción en la superficie del electrodo. La técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es la más utilizada, y consiste en la aplicación de una señal sinusoidal de pequeño tamaño a través de un amplio rango de frecuencias, lo que permite medir la respuesta del sistema en términos de impedancia. A partir de esta respuesta, se genera una corriente que varía en intensidad y fase respecto al potencial aplicado. La relación entre ambos permite obtener los valores de la impedancia, los cuales pueden ser representados en un plano complejo, mostrando Z'' (componente imaginaria) frente a Z' (componente real), en lo que se conoce como diagramas de Nyquist. Otra opción es

representar estos datos mediante el módulo de la impedancia $|Z|$ y el ángulo de desfase (θ) según las frecuencias aplicadas, lo que se conoce como diagramas de Bode [81][82][83].

Los sensores impedimétricos pueden clasificarse a su vez en dos tipos: faradaicos y no faradaicos. Los sensores faradaicos dependen de la presencia de una sonda redox y registran procesos de transferencia de carga en la superficie del electrodo, lo que les confiere alta sensibilidad en la detección de reacciones químicas mediante un detallado control de la corriente generada a partir de las reacciones redox, lo que proporciona respuestas rápidas y de elevada especificidad frente a las moléculas diana [84][85]. No obstante, estos sensores también presentan desventajas como su sensibilidad a las influencias externas, lo que implica la necesidad de utilizar cajas de Faraday para reducir el ruido del sistema y asegurar la reproducibilidad del sistema [86]. Por otra parte, los sensores no faradaicos, en cambio, registran las variaciones de capacitancia que tienen lugar en la superficie del transductor y son útiles para estudiar la interacción entre el electrodo y las moléculas que no tienen actividad redox [87].

En términos generales, los sensores impedimétricos han sido los menos utilizados en el desarrollo de lenguas electrónicas de todos los comentados anteriormente. La aplicación de la espectroscopia de impedancia en lenguas electrónicas fue desarrollada inicialmente por Riul et al donde la aplicación de señales sinusoidales (entre 100 kHz y 20 Hz) a electrodos interdigitados recubiertos con materiales quimiosensibles permitió la discriminación entre soluciones estándar que incluían cloruro de potasio, cloruro de sodio y sacarosa [88]. Desde entonces la eficacia de las lenguas electrónicas impedimétricas en la industria alimentaria ha sido probada en la discriminación de numerosos contaminantes del agua como metales pesados, toxinas, pesticidas y medicamentos [89] [90] [91], así como en el control de alimentos, por ejemplo, para la cuantificación de especies fenólicas en mostos y vinos [92].

Como conclusión de este apartado, podemos decir que la elección de la correcta técnica de detección electroquímica es fundamental para el desempeño y la aplicación de las lenguas electrónicas, ya que impacta directamente en su sensibilidad y selectividad. A pesar de la diversidad de técnicas algo común a todas ellas es la importancia de mejorar el comportamiento en servicio de los diferentes tipos de sensores electroquímicos, por ello surge la necesidad de optimizar sus propiedades para conseguir mejorar su sensibilidad y selectividad de cara a sus aplicaciones prácticas, una forma de conseguirlo es mediante su modificación con materiales avanzados.

2.3 Optimización de Electrodo: Materiales avanzados

La sensibilidad y selectividad de las lenguas electrónicas puede ser optimizada mediante la modificación química o física de la superficie de los electrodos, empleando diversas estrategias como la nano estructuración de sus superficies o el uso de materiales avanzados, tales como líquidos iónicos (ILs), ftalocianinas (Pts), nanomateriales y polímeros conductores (CPs). En los últimos años, el desarrollo de sensores electroquímicos ha avanzado significativamente gracias a la integración de estas tecnologías, las cuales han mejorado notablemente las características electrocatalíticas de los sensores [93]. La modificación de los electrodos es un enfoque clave en este ámbito, ya que permite aumentar la superficie activa, mejorar la transferencia de electrones y optimizar la capacidad de detección y selectividad de los sensores. El uso de materiales avanzados no solo amplifica las señales electroquímicas, sino que también mejoran la estabilidad y reproducibilidad de los dispositivos, aspectos cruciales en aplicaciones de análisis químico, biomédico y ambiental [94].

En la Tabla 2.1 se muestra una recopilación de materiales avanzados aplicados en el desarrollo de sensores en función del tipo de sensor electroquímico. En el caso de los sensores potenciométricos, por ejemplo, se han utilizado membranas poliméricas funcionalizadas con nanopartículas metálicas [95] o con líquidos iónicos [96] para mejorar la selectividad de los sensores reduciendo los límites de detección en uno o varios ordenes de magnitud. Además, polímeros conductores como el polipirrol (PPy), la polianilina (PANI) el poli(3-octiltiofeno) (POT) y el poli (3, 4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), se han utilizado como nuevos transductores en el desarrollo de sensores potenciométricos de estado sólido [97]. Por otra parte, en los sensores impedimétricos, los nanomateriales se han utilizado en multitud de estudios durante la última década. Las nanoestructuras utilizadas varían en tamaño, forma y propiedades fisicoquímicas, como las nanopartículas (NPs) de óxidos metálicos (MOX) [98], los nanotubos de carbono [99] o el grafeno combinado con polímeros conductores [100]. Estos mismos materiales se han empleado también con éxito en sensores voltamétricos en muy diferentes aplicaciones industriales tal y como se observa en la Tabla 2.1. Así pues, en este apartado se discuten los principales materiales avanzados aplicados en el desarrollo de sensores electroquímicos.

Tabla 2.1. Materiales avanzados aplicados en el desarrollo de sensores electroquímicos.

	Material	Aplicación	Referencia
<i>Voltametría</i>	ILs	Determinación de vitaminas en alimentos	[101]
	PPy	Detección de dopamina	[102]
	PANI/ Mn-Pts	Detección de pesticidas	[103]
	ZnO NPs	Determinación de fármacos	[104]
	AgNPs	Detección de contaminación en agua	[105]
	AuNPs	Determinación de glutatión	[106]
<i>Potenciometría</i>	ILs	Detección de fármacos	[107]
	PPy NPs	Detección de iones	[108]
	PPy	Detección de fármacos	[109]
	Co (II) Pts	Detección de sulfitos	[110]
	CuO NPs	Detección de cobre (II)	[111]
	Grafeno/ PtNPs	Detección de fármacos	[112]
	CuNPs	Determinación de ácido ascórbico	[113]
	AuNPs	Detección de colesterol	[114]
	<i>Impedancia</i>	ILs	Biomedicina
Grafeno		Detección de toxinas en agua	[116]
PANI		Determinación de pH	[117]
PANI/ CuO NPs		Detección de colesterol	[118]
Co Pts		Detección de fosfatos	[119]
ZnO NPs		Detección de glucosa	[98]
AgNPs/ Grafeno		Detección de procalcitonina	[120]
AuNPs		Detección de marcadores de cáncer	[121]

Los líquidos iónicos han demostrado ser un tipo de compuestos con grandes ventajas en el desarrollo de películas nanoestructuradas, gracias a su baja volatilidad, alta estabilidad térmica y elevada conductividad iónica lo que da como resultado mejoras en la detección electroquímica. Estos líquidos se componen de cationes y aniones de gran tamaño, lo que les confiere una estructura flexible y una gran capacidad de estabilización de especies reactivas facilitando el control de los procesos de deposición electroquímica [122] [123]. Por este motivo, los ILs permiten la electrodeposición de materiales que, de otra manera, serían difíciles de sintetizar mediante métodos convencionales, como por ejemplo el aluminio o el magnesio. Además, estos compuestos permiten obtener un control preciso sobre la morfología final de los materiales electrodepositados, ya que esta morfología se ve altamente influida por la disposición de iones en la superficie de los ILs alterando la disposición estructural de los materiales en la superficie del sensor a nivel nanométrico. Como resultado los electrodos generados mediante IL presentan superficies nanoestructuradas con propiedades electrocatalíticas mejoradas debido al aumento de la superficie activa del sensor [124].

Otro grupo de materiales avanzados que ha ganado gran atención en los últimos años son las ftalocianinas. Estos macrociclos aromáticos, con estructuras altamente conjugadas, destacan por su elevada versatilidad para ser funcionalizados, lo que permite la introducción de sustituyentes que modulan sus propiedades electrónicas y de adsorción [125]. Además, tienen la capacidad de coordinarse con iones metálicos, formando complejos conocidos como metaloftalocianinas (MPts). Estas moléculas se asocian principalmente con metales de transición, como el cobalto (Co (II)), hierro (Fe (II), Fe (III)), cobre Cu (II), níquel (Ni (II)) y manganeso (Mn (II)), los cuales actúan como donantes de electrones y asumen el papel de moléculas de anclaje [126] [127] [128].

Desde su descubrimiento, las Pts y sus derivados, especialmente las metaloftalocianinas, han sido utilizadas en numerosas áreas debido a sus propiedades químicas, estructurales, electrónicas y ópticas únicas [129] [130]. Por este motivo, las MPts han sido ampliamente utilizadas en la fabricación de sensores electroquímicos donde su capacidad para interactuar selectivamente con especies redox le confiere una gran utilidad en la detección de analitos como el oxígeno, el peróxido de hidrógeno y diversos iones metálicos [131]. Algunas aplicaciones incluyen la implementación de sensores electroquímicos utilizados en micro balanzas de cristales de cuarzo modificadas con películas nanoestructuradas basadas en ftalocianinas para la discriminación de mostos de diferentes variedades uva [132] [133] o su implementación en la preparación de electrodos de carbono vítreo para la identificación de pesticidas como el diazinón [103].

Por otra parte, los polímeros conductores han sido una revolución en el diseño de sensores por su capacidad para combinar propiedades electrónicas con características mecánicas y químicas favorables. Los CPs, como la polianilina, el polipirrol y el poli(3,4-etilendioxitiofeno), son ampliamente utilizados debido a su fácil síntesis, bajo costo y alta

capacidad para amplificar señales electroquímicas [134]. Estos materiales son semiconductores en su estado original, pero pueden ser dopados químicamente para mejorar su conductividad. La estructura conjugada de los polímeros permite que los electrones se deslocalicen a lo largo de la cadena, facilitando la transferencia electrónica en los procesos de detección electroquímica. Además, los CPs pueden combinarse con otros materiales, como las nanopartículas metálicas [135] [136] o los nanomateriales de carbono [137] [138] para mejorar su rendimiento como sensores. La incorporación de nanomateriales de carbono en matrices poliméricas es una forma muy atractiva de obtener materiales con propiedades mecánicas y eléctricas mejoradas [139], su incorporación en el desarrollo de sensores potenciométricos les proporciona mayor robustez, mejor sensibilidad y tiempos de respuesta más cortos.

Finalmente, los nanomateriales metálicos y de óxidos metálicos, han demostrado ser una de las principales vías para la mejora del rendimiento de los sensores electroquímicos. Las nanopartículas metálicas, como las de plata, oro o las nanopartículas de óxidos metálicos como el óxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO), o el óxido de hierro (Fe_3O_4), ofrecen propiedades electrónicas y catalíticas únicas gracias a su alta relación superficie tamaño y su tamaño reducido [140].

Las nanopartículas de óxidos metálicos son firmes candidatas para el desarrollo de sensores electroquímicos ya que su utilización facilita la transferencia de electrones en la superficie del sensor debido a la gran cantidad de átomos superficiales con enlaces disponibles en relación al total de átomos, lo cual mejora la reversibilidad electroquímica de los analitos [141]. Además, su capacidad para ser funcionalizadas las hace altamente versátiles en la detección selectiva de una amplia gama de compuestos químicos y biológicos [142]. Los sensores potenciométricos basados en MOX han sido utilizados en numerosas áreas de interés como por ejemplo en la detección de trazas de metales pesados tóxicos como, el plomo, cadmio, mercurio y arsénico, los cuales tienen efectos perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana; consiguiendo mayores rendimientos en un amplio rango lineal de entre 10^{-7} y 10^{-1} M, permitiendo la determinación de iones metálicos en aguas residuales industriales donde se encuentran desde decenas a cientos de ppm de metales pesados [143]. Otros ejemplos son la modificación de sensores electroquímicos basados en un compuesto de SnO_2 /grafeno para la determinación simultánea de epinefrina (EP) y ácido úrico (UA) en muestras de orina humana mejorando los límites de detección en un orden de magnitud [144] o su implementación en una lengua electrónica para la cuantificación de fenoles en vinos donde se consiguieron valores de correlación de hasta 0.9 para el contenido total en polifenoles (TPI) [145].

Las nanopartículas metálicas, en particular las de plata (Ag) y oro (Au), destacan por sus excepcionales propiedades catalíticas y electrónicas. Estos nanomateriales presentan interesantes propiedades ópticas a escala nanométrica que difieren notablemente de las que posee material en escala macrométrica, a causa de la activación de resonancias plasmónicas

superficiales localizadas (LSPR). Estas respuestas ópticas pueden ajustarse modificando diferentes parámetros, como el tamaño, la forma y la composición de las nanopartículas (NP). Debido a la compactación de los campos electromagnéticos inducidos por las LSPR en las nanopartículas de oro y plata, estas suponen un elemento de elevada sensibilidad en la detección de pequeños cambios en sus entornos dieléctricos, propiedad que resulta particularmente atractiva para el diseño de sensores [146].

La síntesis controlada de nanopartículas metálicas permite ajustar sus propiedades físicas y químicas en función de su tamaño, forma y composición. Por ejemplo, en las nanopartículas de oro su reactividad química aumenta considerablemente a medida que su tamaño disminuye, lo que mejora su capacidad para catalizar reacciones electroquímicas [147]. Esto ha permitido su uso en una amplia gama de aplicaciones, desde la detección de metales pesados hasta la monitorización de especies redox en sistemas biológicos. Uno de los casos más notables, es su aplicación en la detección de glucosa como en los trabajos llevados a cabo por Hebié y colaboradores, en los que fabricaron un sensor de glucosa no enzimático mediante la electrodeposición de nanoestructuras de oro sobre la superficie de un electrodo de carbono vítreo (GCE) sin surfactantes ni estabilizadores consiguiendo un límite de detección por debajo de 0,05 mM gracias al aumento del área de superficie específica [148] asociado a las nanoestructuras de oro. Además, las nanopartículas de oro han mostrado una notable capacidad para mejorar la sensibilidad en la detección de especies contaminantes en medios acuosos, como el plomo [149] y el mercurio [150], superando las limitaciones que presentan los electrodos de oro en su forma macroscópica.

Por último, la capacidad de las nanopartículas metálicas de plata y oro, para actuar como matrices de inmovilización de biomoléculas es otro de los aspectos destacados en el desarrollo de sensores electroquímicos avanzados. Estas nanopartículas gracias a su reducido tamaño presentan una elevada relación superficie-volumen, tal y como se ha explicado previamente, ofreciendo una superficie activa significativamente mayor que los electrodos convencionales [151] [152]. Este incremento en la superficie activa no solo mejora la sensibilidad del sensor, sino que también facilita la inmovilización de biomoléculas, como enzimas y proteínas, lo que resulta crucial en el diseño de biosensores [153]. La combinación de estas propiedades hace de las nanopartículas metálicas un componente clave en la generación de biosensores de los que hablaremos a continuación, con aplicación es que van desde la detección de enfermedades hasta el control ambiental pasando por la seguridad alimentaria.

2.4 Biosensores

Un biosensor puede definirse como un dispositivo analítico compacto que incorpora un elemento de reconocimiento biológico o derivado biológicamente, integrado o íntimamente asociado con un transductor físico, con el objetivo de producir una señal electrónica digital, ya sea discreta o continua, que sea proporcional a un único analito o a un grupo relacionado de analitos [154]. Los biosensores son por tanto dispositivos que combinan un componente biológico, como enzimas, anticuerpos o aptámeros, con un transductor generalmente eléctrico, lo que les permite convertir una interacción biológica en una señal medible, generalmente eléctrica [155]. Los biosensores comenzaron a utilizarse en la década de 1960 de la mano de los pioneros Clark y Lyons [156] quienes desarrollaron un electrodo amperométrico para la determinación de glucosa en sangre mediante la utilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx). Hoy en día, su uso se ha extendido considerablemente debido a su alta especificidad y sensibilidad, lo que los convierte en herramientas clave en áreas como la farmacología, el control de calidad industrial y ambiental.

Entre las aplicaciones en las que también se han aplicado estos biosensores se encuentra su integración en lenguas electrónicas, dando lugar a los sistemas conocidos como lenguas bioelectrónicas. Las lenguas bioelectrónicas buscan imitar la función sensorial humana, permitiendo detectar y clasificar diferentes sustancias con alta precisión gracias a la información específica aportada por los biosensores sobre las moléculas diana a las cuales van dirigidos [157]. Esto es especialmente útil en industrias como la alimentaria, donde es crucial monitorizar parámetros de calidad y detectar pequeños cambios en la concentración de moléculas específicas como es el caso del ácido láctico y ácido málico en procesos de fermentación [158].

Existen multitud de tipos de biosensores en función de su sistema de detección, los biosensores electroquímicos han demostrado ser una de las variedades más eficientes debido a su capacidad para medir cambios en las propiedades eléctricas resultantes de interacciones biológicas [159]. En este tipo de dispositivos, una reacción biológica genera una señal electroquímica que es detectada y cuantificada. La conversión de señales biológicas en eléctricas permite un análisis rápido y preciso, lo que es esencial en aplicaciones que requieren resultados inmediatos, como el monitoreo de glucosa en sangre [160] o la detección de patógenos en alimentos [161]. Los biosensores electroquímicos utilizan diversos tipos de transductores que convierten la señal biológica en una señal eléctrica medible, ya sea corriente, voltaje o impedancia. Por ejemplo, los biosensores amperométricos se emplean para detectar residuos de pesticidas en productos agrícolas [162], mientras que los biosensores potenciométricos son útiles para monitorear niveles de urea en productos lácteos [163] y los biosensores impedimétricos basados en aptámeros han sido utilizados en la detección de toxinas en soluciones acuosas [164].

El biorreceptor es una de las partes más importantes en el diseño de un biosensor, ya que es el encargado del reconocimiento específico del analito de interés. Existen diversos tipos de biorreceptores, entre los que destacan las enzimas, los anticuerpos, los aptámeros e incluso las células completas. Los anticuerpos, por ejemplo, son ampliamente utilizados en inmunosensores, donde la alta especificidad del anticuerpo hacia su antígeno permite la detección de patógenos, toxinas y biomarcadores de enfermedades [165]. Los aptámeros, por su parte, son secuencias de ADN o ARN que se pliegan en estructuras tridimensionales y se unen de forma específica a moléculas diana [166]. Una vez determinada la secuencia de ADN o ARN necesaria para detectar la molécula diana, los aptámeros pueden ser sintetizados con alta reproducibilidad y pureza a partir de fuentes comerciales, lo que les otorga una ventaja sobre anticuerpos o enzimas basados en proteínas, ya que los aptámeros de ADN son químicamente muy estables. Además, los aptámeros suelen experimentar importantes cambios conformacionales al unirse a su molécula diana, lo que ofrece gran flexibilidad en el diseño de biosensores novedosos con alta sensibilidad y selectividad en la detección [167].

Sin embargo, los biosensores enzimáticos son probablemente los más utilizados debido a la capacidad única de las enzimas para catalizar reacciones específicas. Las enzimas actúan como catalizadores biológicos que aumentan la velocidad de las reacciones químicas sin agotarse durante el proceso, lo cual las convierte en una excelente opción para biosensores debido a su alta especificidad hacia el analito [168] de modo continuo. Se han desarrollado numerosos sensores enzimáticos para la determinación de diversas sustancias como la glucosa [169] [170] [171], el colesterol [172] o el ácido láctico [173] en fluidos biológicos (sangre, suero, orina) [174], para la detección de compuestos tóxicos en el medioambiente [175], para el control de alimentos y calidad [176] y para la detección de fármacos en el ámbito biomédico.

La inmovilización enzimática en la superficie del electrodo es un paso crítico en la fabricación de biosensores enzimáticos. Se han escrito multitud de trabajos sobre la inmovilización de enzimas, lo que ha dado lugar a un gran número de protocolos [177] [178]. En términos generales, se considera que existen cuatro estrategias principales de inmovilización: adsorción física, atrapamiento en matrices poliméricas, unión covalente y crosslinking (Figura 2.2) [179]

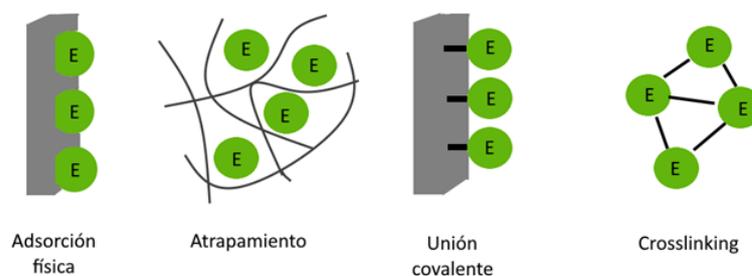


Figura 2.2. Tipos de inmovilización de biorreceptores.

Para que un biosensor funcione correctamente, los biorreceptores utilizados deben conservar tanto su estructura conformacional como su actividad biológica tras el proceso de inmovilización. Asimismo, deben quedar firmemente unidas a la superficie para evitar su desprendimiento durante el uso. Un biosensor ideal, especialmente para aplicaciones a largo plazo, requiere estabilidad. El método de inmovilización influirá por tanto en la estabilidad y actividad de los biosensores enzimáticos, afectando factores como su reproducibilidad, la precisión de los análisis, y la vida útil operativa, que se ven influidos en gran medida por la estabilidad enzimática [180].

Cada método de inmovilización presenta ventajas y desventajas. La adsorción física es simple y económica, pero la estabilidad del biorreceptor puede verse comprometida. En cambio, el atrapamiento en matrices poliméricas ofrece mayor estabilidad al proteger la enzima de condiciones ambientales adversas, aunque puede dificultar el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima. La reticulación covalente, aunque más compleja, proporciona una fijación más estable de la enzima al electrodo, mejorando la durabilidad del biosensor, al igual que el crosslinking que ofrece una mayor estabilidad, aunque puede reducir la actividad biológica al modificar la conformación de la enzima [181]. Por este motivo, la elección de la técnica más apropiada dependerá de la naturaleza de la enzima, del transductor y del modo de detección asociado. Ha de tenerse en cuenta que la sensibilidad disminuye si la inmovilización causa la desnaturalización de la enzima o cambios conformacionales y que se obtendrá una mejor sensibilidad utilizando métodos de inmovilización que permitan orientar las enzimas en la superficie del transductor exponiendo adecuadamente su sitio activo a la disolución analizada [182] [183].

Comúnmente, los biosensores pueden clasificarse en tres “generaciones” (Figura 2.3): los biosensores de primera generación en los cuales el producto de la reacción se desplaza hacia el transductor, generando una respuesta eléctrica; la segunda generación de biosensores, en los que intervienen “mediadores” electrónicos, como ferrocianuro o polímeros conductores, para facilitar el intercambio de electrones entre el electrodo y la enzima; y finalmente la tercera generación, en los que los electrones involucrados en la reacción enzimática se transfieren directamente al electrodo o sin necesidad de mediador. Es decir, se busca una transferencia directa de electrones (DET) entre el sitio activo de la enzima y el electrodo, favoreciendo una mayor simplicidad y una mejor sensibilidad [184].

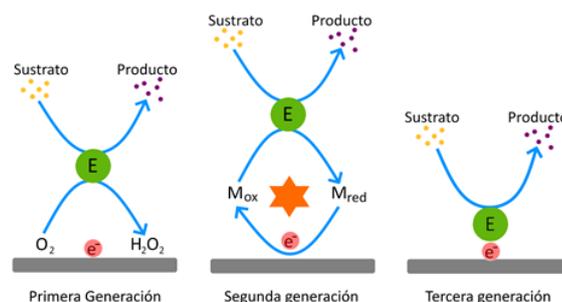


Figura 2.3. Tipos de biosensores según su generación.

Los biosensores enzimáticos han tenido un gran impacto en la industria alimenticia, donde son utilizados para el monitoreo de la calidad de los productos y para la detección de contaminantes. Un ejemplo de su uso es la detección de residuos de pesticidas en frutas y vegetales. En estos casos, enzimas como la acetilcolinesterasa se utilizan para catalizar la descomposición de pesticidas organofosforados como el malatión y metilparatión generando productos que pueden ser detectados electroquímicamente [185]. Además de los pesticidas, otros biosensores de gran relevancia en la industria alimentaria son los biosensores de lactosa debido al aumento en los casos de intolerancia a la lactosa y la preferencia del mercado por productos sin lactosa. Los biosensores enzimáticos para la detección de lactosa suelen basarse en la aplicación de una reacción en cascada multienzimática que incluye la enzima lactasa o β -galactosidasa, encargada de hidrolizar el disacárido, seguida de la oxidación de la galactosa mediada por la enzima galactosa oxidasa, lo que permite una medición rápida y precisa de la lactosa en una amplia gama de productos lácteos [186] [187] [188]).

El futuro de los biosensores apunta hacia una mayor miniaturización, portabilidad y accesibilidad. En este sentido, la nanotecnología y la nanociencia han permitido grandes avances en el desarrollo de biosensores más sensibles y eficientes, con límites de detección más bajos, utilizando modificaciones del sustrato con materiales avanzados que interactuaran con los biorreceptores. Los nanomateriales o materiales sensibles como los CPs tienen un enorme potencial en el desarrollo de biosensores tal y como se introdujo en el apartado anterior, debido a su potencial para amplificar señales electroquímicas, mejorando tanto la sensibilidad como la selectividad. Además, de su capacidad para actuar como matrices de inmovilización efectivas para los biorreceptores que pueden inducir características de rendimiento únicas en biosensores en términos de sensibilidad y especificidad [189] [190].

Otra opción que está ganando interés en los últimos años como alternativa a los biosensores buscando también sensores selectivos son los polímeros de impresión molecular (MIPs). Los MIPs son materiales poliméricos diseñados y producidos con cavidades de reconocimiento molecular incorporadas. El mecanismo de reconocimiento molecular de los MIPs se basa en la complementariedad entre las cavidades formadas durante su síntesis y la estructura del analito objetivo, lo que permite una unión específica muy similar al mecanismo de las enzimas, lo que da como resultado una elevada selectividad y sensibilidad [191]. A diferencia de los biosensores, los MIPs son más económicos al ser más fáciles de producir, tienen una mayor estabilidad química y son resistentes a condiciones extremas de temperatura y presión. Además, su facilidad para adaptarse a diferentes analitos los convierte en una tecnología perfecta para incorporarla en múltiples aplicaciones [192] [193] [194].

La implementación de uno o más biosensores en la elaboración de lenguas electrónicas ha dado lugar al término de lengua bioelectrónica (BioET). Las lenguas bioelectrónicas ofrecen un rendimiento superior al combinar las capacidades de las lenguas electrónicas para extraer información de muestras complejas mediante selectividad cruzada con la alta selectividad y especificidad de los biosensores. Al igual que los biosensores que las

componen, las lenguas bioelectrónicas se han utilizado principalmente como método de control sanitario y de calidad en alimentos [195] [196] [197]. Estas aplicaciones incluyen biosensores para la detección de patógenos capaces de producir cambios en la composición de productos alimentarios, así como para la detección de aditivos. Otro ejemplo de aplicación es la industria vitivinícola, donde las lenguas bioelectrónicas se han utilizado para monitorear el contenido de polifenoles en el vino, un indicador clave de la calidad del producto [198] [199]. Las lenguas bioelectrónicas buscan mejorar la baja especificidad de las lenguas electrónicas gracias al uso de los biorreceptores sin perder la elevada selectividad cruzada que las caracteriza [200].

2.5 Métodos quimiométricos

Las lenguas electrónicas y bioelectrónicas no están formadas únicamente por los sensores que componen la red; para que estos sistemas sean considerados lenguas electrónicas, es necesario que estén conectados a un sistema de reconocimiento de patrones o software, capaz de identificar, y clasificar las muestras analizadas. Por lo tanto, la aplicación de la quimiometría es el último paso en el desarrollo de lenguas electrónicas, ya que desempeña un papel crucial en el análisis e interpretación de los datos complejos generados por los sensores y biosensores que las integran. Actualmente, existe una amplia variedad de algoritmos matemáticos y estadísticos capaces de encontrar soluciones a problemas multivariantes complejos. De hecho, los métodos disponibles superan el centenar, lo que hace imposible abordar cada uno de ellos en detalle. Por este motivo, en este apartado se analizarán los métodos más utilizados en el campo de las lenguas electrónicas, sin que esto signifique subestimar la relevancia o el potencial de otros enfoques igualmente válidos y útiles en otros contextos específicos.

El primer paso en el análisis de los datos registrados por una lengua electrónica es el pretratamiento de las señales electroquímicas encargados de transformar matemáticamente las respuestas brutas en otro conjunto de respuestas. Por tanto, es fundamental preprocesarlos adecuadamente, ya que las señales generadas por los sensores suelen estar contaminadas con ruido y datos redundantes, lo que requiere corregir estas imperfecciones, mejorar la calidad de los datos y facilitar su posterior análisis quimiométrico [201]. Existen numerosos métodos de pretratamiento, y la elección del más adecuado dependerá del tipo de señal y de las características específicas del problema a resolver. Entre los métodos más comunes se encuentran la normalización [202], la eliminación de ruido mediante técnicas de filtrado [203], la corrección de deriva [204] y la compensación de efectos de matriz [205], etc.... Los métodos más utilizados en el preprocesado de datos de lenguas electrónicas han sido aquellas que permiten reducir la dimensionalidad de los datos utilizando una etapa previa de extracción [206].

A continuación, detallaremos dos ejemplos del empleo de estas técnicas al preprocesamiento de datos provenientes de técnicas como la voltametría cíclica o la espectroscopía de impedancias, cuyas señales presentan una elevada complejidad y de dimensionalidad. En el caso de las señales obtenidas por CV se emplean métodos de reducción de dimensionalidad como la transformación wavelet (WT) [207] el modelo de autoencoder [208] o la compresión de datos mediante kernels (KN) [209]. Por otro lado, para la interpretación cuantitativa de las señales de EIS, el preprocesado de los datos se lleva a cabo mediante la aplicación de circuitos eléctricos equivalentes (EEC), que describen los procesos de transferencia electrónica en términos de elementos físicos de un circuito eléctrico: resistencias, capacitancias, impedancias de Warburg y elementos de fase constante (CPE) entre otros [210] [211].

Una vez que las señales han sido pretratadas adecuadamente, el siguiente paso en el análisis quimiométrico es la aplicación de métodos multivariantes, los cuales se dividen en dos grandes categorías: supervisados y no supervisados [212] [213]. Los métodos no supervisados, como el análisis de componentes principales (principal component analysis, PCA) o el análisis de clúster jerárquicos (hierarchical cluster analysis, HCA) se utilizan cuando no se posee ningún tipo de información sobre las muestras. Estos métodos no solo permiten la reducción de la dimensionalidad de los datos originales, sino que exploran la estructura subyacente, identificando patrones y detectando grupos de muestras similares [214] [215]. Por otro lado, los métodos supervisados, como el análisis discriminante lineal (lineal discriminant analysis, LDA), las máquinas de vectores de soporte (support vector machine SVM) o las redes neuronales, se utilizan cuando se dispone de información previa de las muestras. En estos casos, el objetivo no es descubrir patrones en la estructura de los datos sino construir un modelo capaz de predecir la categoría a la que pertenece una muestra nueva a partir de las características extraídas de las señales [216]. Además, los métodos quimiométricos supervisados también permiten desarrollar modelos de regresión para la predicción de parámetros como, por ejemplo, los análisis físicoquímicos comerciales. Por tanto, la selección del método quimiométrico a emplear dependerá tanto del propósito del análisis como de la disponibilidad de información previa. Existen numerosos métodos quimiométricos, pero de entre ellos los más utilizados suelen ser aquellos que se aplican en tareas específicas de discriminación, clasificación o predicción.

Entre las técnicas más empleadas para la discriminación de muestras se encuentran el análisis por PCA y por LDA. El análisis de componentes principales convierte datos de alta dimensión en un espacio de menor dimensión, conservando las estructuras y patrones clave de los datos originales. Esta técnica tiene como objetivo encontrar las componentes principales del sistema (PC), las combinaciones lineales ortogonales (no correlacionadas) de las variables presentadas en los datos originales. Estas PC se organizan en una jerarquía clara, en la que la primera PC captura la varianza más alta de los datos, la segunda PC captura la siguiente varianza inferior a la primera, y así sucesivamente [217] [218]. Es posible representar los datos en un espacio de dimensión reducida eligiendo solo algunas de las CP principales, lo que hace más sencillo ver y analizar grandes conjuntos de datos al trazar los puntos de datos en el espacio de dimensión reducida en función de sus componentes principales, lo que da forma al gráfico de puntuaciones. Esta representación proporciona una mejor comprensión de la estructura subyacente de los datos y ayuda a identificar grupos, valores atípicos o tendencias [219].

La PCA o análisis de componentes principales es, sin duda, una de las técnicas multivariantes más reconocidas y empleadas en prácticamente todas las áreas científicas. Además, se considera que es una de las técnicas más antiguas dentro de este ámbito. De hecho, su origen se remonta a los trabajos de Pearson [220] o incluso a Cauchy [221]. Desde entonces esta metodología se ha utilizado en la discriminación para el control de calidad de las propiedades organolépticas de los productos alimenticios como el vino [222] o la leche

[223], para discriminar biomarcadores orgánicos volátiles [224] o en la identificación de muestras de agua contaminadas con pesticidas [225].

La técnica LDA, por su parte, es una técnica supervisada cuyo objetivo es encontrar una combinación lineal que maximice la separación entre las diferentes clases presentes en un conjunto de datos [226]. Para ello, LDA asume que las distintas clases siguen una distribución gaussiana con una varianza idéntica, pero con medias distintas. El algoritmo calcula las medias de las clases y las distribuciones conjuntas de las características para estimar una matriz de covarianza compartida. A partir de esta información, la técnica LDA proyecta los datos en un espacio de menor dimensionalidad maximizando la distancia entre las clases y minimizando la varianza dentro de ellas [227]. Esta técnica es ampliamente utilizada cuando se presupone que la clasificación de las muestras puede explicarse mediante un modelo lineal, ya que, gracias a su capacidad para mejorar la interpretación y la precisión de los modelos, particularmente en escenarios de alta dimensionalidad, permite la clasificación de las muestras con gran precisión evitando el riesgo de sobre ajustar el sistema [228].

La técnica de máquina de vectores soporte (SVM) es uno de los algoritmos supervisados de clasificación y regresión más potentes y robustos en múltiples campos de aplicación. Esta técnica se basa en encontrar el hiperplano óptimo en el espacio que divide los puntos correspondientes a datos de varias clases. Los hiperplanos corresponderán por tanto a una línea en un espacio bidimensional, a un plano o a un hiperplano de dimensiones superiores donde la distancia entre los datos más cercanos de cada clase y el hiperplano se conoce como margen. Los vectores de soporte (SV) serán por tanto los puntos de los datos que definen el margen y se encuentran más cerca del hiperplano correspondiente a cada clase [229] [230]. Esta técnica funciona especialmente bien cuando se pretende categorizar los datos en función de dos categorías en sistemas binarios gracias a la robustez del algoritmo ante valores atípicos en la matriz original de datos, el cual no solo permite manejar relaciones lineales entre datos, si no también relaciones no lineales mediante la aplicación de diferentes algoritmos base como por ejemplo la función radial base (radial basis función, RBF) [231] [232].

La técnica SVM también puede ser utilizada para resolver problemas de regresión. Los modelos de regresión son elementos fundamentales en el procesamiento y análisis de datos procedentes de redes de sensores. Su capacidad para identificar relaciones, hacer predicciones y cuantificar efectos los convierte en una de las herramientas más interesantes del análisis quimiométrico. En el caso de la regresión con máquinas de soporte vectorial (SVMR, por sus siglas en inglés) es un algoritmo de aprendizaje supervisado para resolver problemas de regresión que, a diferencia de la regresión lineal convencional, busca identificar una función no lineal que capture con precisión los patrones subyacentes en los datos [233]. El objetivo de la técnica SVMR es encontrar el hiperplano en un espacio de mayor dimensionalidad que mejor represente la relación entre los factores predictores y la variable de respuesta continua. El hiperplano, que optimiza la distancia entre los puntos de datos y el hiperplano mismo, está sujeto a una tolerancia definida por el usuario conocida como ϵ (épsilon). Este “tubo ϵ ”

alrededor del hiperplano contiene la mayoría de los puntos de datos, y los puntos fuera de este tubo incurrir en una penalización proporcional a su distancia del hiperplano [234].

Dentro de las técnicas predictivas, la técnica de regresión multivariante más ampliamente aplicada en lenguas electrónicas es el análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS). El análisis por PLS combina aspectos de la técnica de PCA y de la regresión lineal para modelar la relación entre un conjunto de variables predictoras y las variables de respuesta. Esta técnica es especialmente útil cuando se trabaja con datos que presentan una colinealidad entre las variables predictoras, un suceso común en los datos generados por lenguas electrónicas. El modelo predictivo se consigue extrayendo de las variables predictivas un conjunto de factores ortogonales llamados variables latentes, las cuales son una combinación lineal de los predictores originales, construida de manera que maximice la varianza explicada tanto en los predictores como en la variable de respuesta [235] [236]. Estas variables latentes pueden utilizarse para crear representaciones similares a las visualizaciones del análisis de componentes principales, facilitando la discriminación de muestras, al mismo tiempo que se genera el modelo de regresión para la predicción de futuras muestras [237]

La técnica PLS ha sido utilizada con éxito en la predicción de propiedades físicoquímicas de muestras complejas, como la determinación de perfiles volátiles [238] o la predicción de la calidad de productos como el vino [239], la cerveza [240], la leche [241] o la miel [242] en función de sus características sensoriales. Uno de los problemas más comunes en el uso y aplicación de sensores en la industria es el número limitado de muestras que se pueden utilizar para entrenar los sistemas de reconocimiento; sin embargo, la técnica PLS puede funcionar bien incluso cuando el tamaño de la muestra es menor que el número de variables predictoras. Un ejemplo de su capacidad para manejar un gran número de variables fue su aplicación por Fitzgerald et al., donde señales obtenidas de 64 sensores poliméricos se utilizaron para determinar perfiles volátiles y fueron transformadas en un patrón de respuesta mediante regresión por mínimos cuadrados [243].

Sin importar el método quimiométrico utilizado, un aspecto fundamental para asegurar la fiabilidad de los resultados es la adecuada validación de estos modelos matemáticos. La validación cruzada es el método más comúnmente empleado para este propósito, del cual existen varias versiones en función del conjunto de datos con el que se trabaja [244]. Uno de los métodos más eficaces para evitar el sobreajuste es la validación “leave one out”, en la cual se entrena el modelo con todas las muestras menos una, y se utiliza la muestra excluida para evaluar el desempeño del modelo repitiendo el proceso hasta que todas las muestras hayan servido como prueba una vez [245]. Otra opción es utilizar la validación cruzada “k-fold”, una alternativa más eficiente, en la cual los datos se dividen en “k” subconjuntos en los cuales el modelo se entrena y evalúa “k” veces, cada vez utilizando un subconjunto diferente como prueba [246].

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de análisis multivariante avanzadas ha permitido abordar problemas más complejos asociados a muestras reales como la

colinealidad entre las variables, el desbalance de clases, el sobreajuste de los modelos o la presencia de ruido. Entre estas técnicas destacan los algoritmos genéticos, (genetic algorithms, GAs) [247] las redes neuronales (neural networks, NNs) [248] o los métodos de ensamble (ensemble methods, EM) [249].

En primer lugar, los algoritmos genéticos, inspirados en los principios de la evolución biológica, pueden ser aplicados para determinar la mejor combinación de características o parámetros de un modelo mediante procesos de selección, mutación y recombinación, los cuales permiten explorar de manera eficiente grandes matrices de datos y encontrar soluciones óptimas para la optimización, en nuestro caso, de modelos quimiométricos [250]. En el contexto de lenguas electrónicas, los algoritmos genéticos se han utilizado para la selección de variables y la mejora de la metodología experimental, mejorando así la precisión y la fiabilidad de los modelos [247]. Un ejemplo de su aplicación fue el trabajo realizado por Morais et al., donde se utilizaron algoritmos genéticos para seleccionar las variables con mayor varianza a partir de datos voltamétricos permitiendo mejorar los modelos de LDA, facilitando la detección y cuantificación de adulteraciones en muestras de café mediante un sensor voltamétrico de bajo costo [251].

Por otra parte, los sistemas basados en redes neuronales están ganando popularidad en el análisis de datos, gracias a su capacidad para modelar relaciones no lineales y manejar datos de alta dimensionalidad. Las redes neuronales artificiales (ANNs) simulan el funcionamiento del cerebro humano mediante capas de neuronas (nodos) interconectadas, que procesan la información de manera distribuida y paralela [252]. Por lo general, las ANNs contienen una capa de nodos de entrada, una capa de nodos de salida y una serie de “capas ocultas” entre las dos (Figura 2.4). Para la mayoría de las tareas, las ANN transmiten información hacia adelante conformando lo que se conoce como una red neuronal de propagación, lo que significa que la información de cada nodo de la capa anterior se transmite a cada nodo de la siguiente capa, se transforma y se transmite hacia la siguiente [253]. Cada capa de una ANN puede contener cualquier número de nodos; sin embargo, el número de nodos que se encuentra dentro de la capa de salida generalmente corresponde al número de clases que se predicen, por ejemplo, un solo nodo con una activación sigmoidea para la clasificación binaria o una función de activación lineal si el objetivo es la regresión [254] [255].

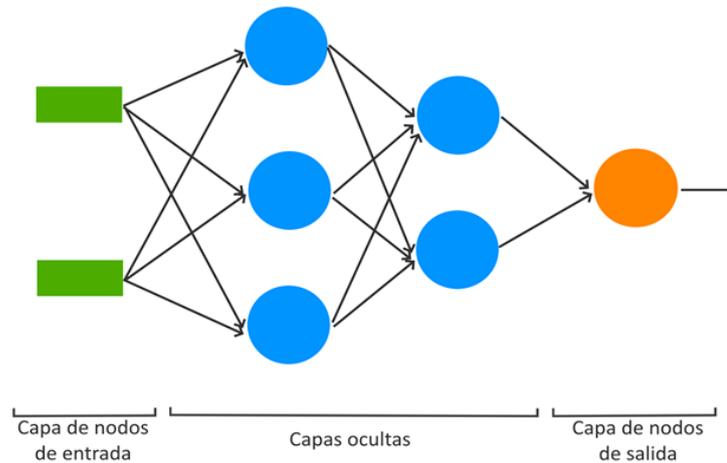


Figura 2.4. Estructura de una red neuronal multicapa de propagación hacia adelante.

Finalmente, los métodos de ensamblado son procedimientos de aprendizaje estadístico y computacional que se basan en el comportamiento de aprendizaje social humano buscando varias opiniones antes de tomar una decisión crucial. Algunos ejemplos de estas técnicas son los bosques aleatorios conocidos como “Random Forest”, o las metodologías de “Bagging”, “Boosting” y “Stacking”, que utilizan varios modelos individuales los cuales trabajan en conjunto al promediar, ponderar o apilar los resultados, logrando una mayor robustez frente a los nuevos datos que se introduzcan en el sistema al reflejar mejor la variabilidad presente en las muestras [256] [257]. Hoy en día, los métodos de ensamblado representan una de las principales líneas de investigación actuales en machine learning. Los estudios empíricos han demostrado que, tanto en problemas de clasificación como de regresión, las clasificaciones y predicciones mejoran respecto de los métodos multivariantes individuales [258] [259] [260].

En resumen, el uso de técnicas quimiométricas es esencial en el análisis de datos generados por lenguas electrónicas y bioelectrónicas. Desde el pretratamiento de las señales hasta la validación y optimización de los modelos, el análisis multivariante ofrece un conjunto de herramientas poderosas para extraer información relevante de los datos complejos y garantizar la precisión y fiabilidad de los resultados mejorando el rendimiento de las lenguas electrónicas en aplicaciones cada vez más sofisticadas.

2.6 Aplicación de lenguas electrónicas en la industria láctea

La industria láctea es un sector clave tanto a nivel mundial como nacional debido a su importancia en la dieta diaria de millones de personas por el alto valor nutricional de la leche. A nivel global, el mercado de los productos lácteos ha mostrado un crecimiento estable en los últimos años, con un aumento significativo en la producción y consumo, especialmente en economías emergentes como China e India [261] [262]. En España, la industria láctea representa una parte importante del sector agroalimentario, tanto en términos de producción como de exportación, con un enfoque particular en productos como la leche, el queso y los yogures. Sin embargo, con el incremento de la producción y la globalización de los mercados, también han aumentado los desafíos relacionados con el control de calidad en la industria láctea [263] [264].

La leche se define como “la secreción mamaria natural de los mamíferos, producida para satisfacer las necesidades nutricionales de sus crías”. En términos generales, la leche es un líquido altamente nutritivo que contiene una mezcla compleja de macronutrientes y micronutrientes esenciales. La leche de vaca, la más consumida a nivel mundial, está compuesta aproximadamente por un 87% de agua, 3-4% de grasa, 3-3.5% de proteínas principalmente caseína y proteínas del suero, 4.8% de carbohidratos en su mayoría lactosa, y alrededor de 0.7% de minerales, como el fósforo, el calcio y el magnesio. Además, la leche contiene vitaminas liposolubles e hidrosolubles como la vitamina A, la B2, la B12, la vitamina D, y la E, además de enzimas y hormonas en pequeñas cantidades [265] [266]. Esta composición la convierte en uno de los líquidos más complejos de la industria alimentaria.

Además, la leche es un producto altamente susceptible a la contaminación microbiana y a la adulteración, lo que hace que sea un reto significativo garantizar la seguridad alimentaria. El control de calidad lechero se basa en la determinación de una serie de parámetros fisicoquímicos que garantizan su idoneidad para el consumo y su procesamiento industrial. Entre las técnicas más comunes para evaluar estos parámetros se incluyen el análisis de la composición de grasa, proteínas y lactosa mediante métodos como la espectroscopía infrarroja, el análisis de acidez titulable para determinar su frescura, y la densidad mediante equipos de densimetría conocidos como lactómetros. Por otra parte, también se utiliza la crioscopia para detectar la presencia de agua añadida, y la conductividad eléctrica para estimar la cantidad de sales y determinar la calidad higiénica del producto. Mientras que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas (MS) se utilizan para la detección de adulteraciones y contaminantes específicos, como los antibióticos y otros residuos químicos [267] [268]. Estos procedimientos suelen ser lentos, costosos y, en muchos casos, requieren que las muestras sean enviadas a laboratorios para análisis off-line. Además, debido a la naturaleza perecedera de la leche, existe el riesgo de que las muestras se deterioren o alteren durante el transporte, comprometiendo los resultados de los análisis.

En este contexto, las lenguas electrónicas han surgido como una tecnología innovadora pensada para mejorar significativamente el control de calidad en la industria láctea. Tal y como se ha presentado anteriormente, estos dispositivos a diferencia de los métodos tradicionales permiten analizar más de un parámetro a la vez incluso en tiempo real, ofreciendo una solución mucho más eficiente para detectar cambios en la composición global de las muestras, bien sea por envejecimiento, adulteraciones o contaminaciones. Además, estas tecnologías son capaces de procesar grandes volúmenes de datos y pueden integrarse fácilmente en las líneas de producción para el monitoreo continuo, lo que representa un gran avance para la modernización de los sistemas de control de calidad en la industria [241].

Las primeras aplicaciones de lenguas electrónicas en el control de calidad lechero datan de la década de los noventa. En 1995, Toko y colaboradores demostraron que un sensor electrónico podía correlacionar con gran precisión las propiedades organolépticas de la leche con los procesos de degradación proteica, algo solo conseguido hasta entonces por paneles de catadores expertos [269]. Posteriormente, en 1996, el mismo dispositivo fue utilizado para discriminar muestras de leche sometidas a distintos tratamientos de calentamiento, permitiendo diferenciar con éxito entre diferentes tiempos de procesado imperceptibles para los paneles humanos [270]. Otro avance importante fue logrado por Yamada en 1997, al demostrar que la lengua electrónica que diseñaron era capaz de detectar ligeras variaciones en la leche inducidas por la homogenización de los glóbulos de grasa según los cambios de presión a los que eran sometidas las muestras. un proceso en el que los cambios en la presión afectan a la distribución del tamaño de los glóbulos de grasa [271]. Estos estudios pioneros marcaron un hito en la aplicación de sistemas basados en lenguas electrónicas en la industria alimenticia, abriendo el camino para su uso en el control de calidad moderno.

Desde entonces, diferentes tipos de lenguas electrónicas han sido desarrolladas para el análisis de productos lácteos (Tabla 2.2). Winqvist et al. Presentaron en 1998 la que es considerada la primera lengua electrónica voltamperométrica; la cual permitía en función de las técnicas y electrodos utilizados obtener información sobre diferentes aspectos de la muestra como el deterioro de la calidad de la leche durante su almacenamiento a temperatura ambiente debido al crecimiento microbiano [272]. Otro ejemplo de aplicación de una lengua electrónica voltamétrica en la identificación y clasificación de muestras de leche según su tiempo de almacenamiento fue el sistema desarrollado por Wei y colaboradores, quienes utilizaron electrodos y voltametría de pulso rectangular multifrecuencia (MRPV) y de pulso escalonado (MSPV), en el análisis de las muestras llegando a predecir el recuento bacteriano y la viscosidad mediante técnicas avanzadas como SVM [273]

Tabla 2.2: Lenguas electrónicas aplicadas en la industria láctea.

	Sensor	Quimiometría	Aplicación	Referencia
Potenciometría	Membranas lipídicas	PCA	Descripción cuantitativa del sabor de la leche.	[270]
	Membranas lipídicas	PCA	Discriminación de leches según proceso de homogenización.	[271]
	ISEs	PCA, ANN	Clasificación de las leches según marca y origen.	[274]
	ISEs flujo continuo	PCA, SVM	Clasificación de leches según contenido graso y origen.	[275]
	Electrodos de estado sólido	PLS	Discriminación entre tiempos de fermentación y predicción de moléculas volátiles.	[276]
	ISEs	PCA, SIMCA, LDA	Discriminación entre leches de vacas sanas y afectadas con mastitis.	[277]
	Transistor de Efecto de Campo	PLS, PCA	Estimación del sabor amargo de hidrolizados de proteínas lácteas	[278]
	Cristales de cuarzo	PCA	Discriminación de quesos elaborados a partir de leche entera, cruda y pasteurizada	[279]
	Membranas poliméricas lipídicas	PCA, LDA	Determinación de mezclas de leche bovina y caprina	[280]
	Electrodos de estado sólido	PCA, PLS	Discriminación del envejecimiento y la relación proteína-grasa en el queso Cheddar	[281]
Membranas poliméricas lipídicas	PCA, LDA,	Discriminación de productos lácteos según el tipo de leche.	[282]	

Voltametría	Au, Ir, Pd, Pt y Rh	PCA, PLS, ANN	Monitoreo del deterioro de la calidad de la leche en el tiempo.	[283]
	Au y Pt	Wavelets, PCA	Monitoreo del crecimiento bacteriológico	[284]
	Au, Pt, Ag, Pd y Ti	PCA, PLS, LS-SVM	Detección de residuos de antibióticos en leche bovina	[285]
	Au, Pt y Rh	PCA	Discriminación entre leche desnatada y leche en polvo desnatada	[286]
	Au, Ag, Pt y Pd	PCA, PLS, LS-SVM	Monitoreo de la calidad y tiempo de almacenamiento de leche pasteurizada.	[273]
	Au, Ag, Pt y Pd	ANOVA, PCA, SMV, PLS	Monitoreo de los procesos de fermentación y almacenamiento de yogur	[287]
	Au, Ag y Pt	PCA, PLS-DA	Clasificación de leche según su marca comercial.	[288]
	Polipirrol (PPy)	PCA	Discriminar muestras de leche adulterada con agua	[289]
	Polipirrole (PPy)	PCA	Discriminación de la leche adulterada con sacarosa	[290]
Au y azul de Prusia	PCA	Discriminación en función del procesado o adulteraciones.	[291]	
Impedancia	Quitosano	ML	Diagnosticar mastitis bovina a partir de muestras de leche	[291]
	Nanofibras conductoras	PCA	Detección de tetraciclina en leche.	[292]

Los sensores potenciométricos también se han utilizado para monitorizar procesos de envejecimiento de muestras de leche pasteurizada y UHT. Se desarrolló una red de sensores capaces de discriminar de forma fiable entre leche fresca y estropeada, así como de seguir el deterioro de la calidad de la leche cuando esta se almacena a temperatura ambiente [293]. Por otro lado, los sistemas potenciométricos también han demostrado ser efectivos para la clasificación de la leche según su contenido graso y/o su origen. Un caso relevante fue el uso de una red miniaturizada de sensores potenciométricos de estado sólido en la determinación de diferencias entre muestras de leche según su marca comercial y su contenido graso [294]. En este estudio, las señales de la lengua electrónica fueron analizadas utilizando un modelo de red neuronal de máquina de vectores de soporte sin etapa de preprocesamiento, logrando una tasa de clasificación superior al 97%.

Por otra parte, los sistemas impedimétricos han sido los menos utilizados en los controles de calidad de los productos lácteos, siendo sus principales aplicaciones la detección de contaminantes microbiológicos [81]. Un ejemplo de aplicación de este tipo de lengua electrónica es la detección de bacterias en la leche donde se determinó como los cambios de impedancia dependían directamente de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra, permitiendo monitorizar de forma precisa la proliferación bacteriana, un aspecto particularmente importante para evitar la distribución de productos que podrían haberse malogrado durante el almacenamiento o el transporte [295].

Si hablamos de las principales aplicaciones de estos sistemas en la industria láctea, es importante destacar su eficacia en la detección de contaminaciones y adulteraciones en muestras de leche, uno de los problemas recurrentes del sector. Los agentes antimicrobianos como los antibióticos se administran rutinariamente a los animales tanto por razones terapéuticas como profilácticas. Sin embargo, el paso de antibióticos a la leche de animales medicados influye en la calidad de la leche cruda y dichos residuos constituyen un riesgo potencial para el consumidor, causando alergias y creando una posible resistencia de los microorganismos a los antibióticos introducidos [296] [297]. En este sentido se desarrolló una lengua electrónica voltamperométrica para detectar seis residuos de antibióticos en la leche bovina: eritromicina, cloranfenicol, sulfato de neomicina, sulfato de kanamicina, clorhidrato de tetraciclina y sulfato de estreptomina. Las muestras enriquecidas en estos residuos no solo fueron clasificadas mediante PCA, sino que se desarrollaron modelos de regresión para futuras muestras [285]. Otros trabajos utilizaron la técnica de EIS en microelectrodos interdigitados modificados con nanofibras de poliamida 6/polianilina (PA6/PANI) para detectar residuos de tetraciclina (TC) en muestras de leche entera y desnatada [292].

De la misma manera, la calidad de la leche que se introduce en la planta lechera debe ser controlada desde un punto de vista microbiológico. La mastitis bovina, una enfermedad infecciosa que afecta a la glándula mamaria, es una de las mayores preocupaciones de producción en la industria lechera, debido al alto costo asociado con la pérdida de

rendimiento y la leche descartada. La leche con mastitis contiene tanto patógenos como toxinas bacterianas; por lo tanto, su consumo aumenta el riesgo de ingestión y transmisión de patógenos e ingestión de toxinas [298] [299].

En los sistemas de ordeño robótico, la detección de mastitis se realiza actualmente mediante una combinación de inspección humana de los animales, conductividad eléctrica y análisis de los cambios en la producción de leche [300]. Sin embargo, Coatrini-Soares y colaboradores fueron capaces de aplicar una lengua electrónica basada en espectroscopia de impedancia para el diagnóstico de mastitis bovina en muestras de leche, el sistema fue capaz de distinguir entre la leche de una vaca infectada, una vaca en tratamiento y una vaca sana con una precisión del 100 %; para ello se utilizaron sensores optimizados con películas nanoestructuradas demostrando la eficacia de estos sistemas en resolver problemas reales de la industria láctea [301].

La adulteración de la leche de cabra con leche de vaca también es bastante frecuente, debido a las fluctuaciones estacionales de la producción de leche de cabra y a su mayor precio. Por lo tanto, es importante establecer y validar metodologías fáciles y confiables que puedan usarse para detectar este tipo de adulteraciones. Aunque en los últimos años se han propuesto diferentes métodos como HPLC o ensayos inmunológicos para detectar este tipo de prácticas, estos análisis requieren mucho tiempo, equipo especializado y personal calificado [280] [302]. Por este motivo, desarrollar lenguas electrónicas que se puedan utilizar de una manera simple, rápida y económica es de gran importancia. En algunos trabajos se han aplicado redes de electrodos potenciométricos en la determinación de adulteraciones de leche caprina mezclada con bovina [280]. El modelo de análisis discriminante lineal (LDA) aplicado pudo discriminar entre grupos de leche cruda descremada (vaca, cabra y cabra/vaca) con una especificidad y sensibilidad generales del 97% y el 93 %, en cada caso. En otros trabajos, se utilizaron técnicas de preprocesamiento de datos avanzadas, como el análisis de componentes principales por kernels (KPCA) y “extreme learning machine” (ELM), para la determinación cuantitativa de adulteración de leche caprina [303].

No obstante, el método más común para adulterar la leche es, sin duda, su dilución con agua. Posteriormente, se añade urea para incrementar el índice de sólidos no grasos (SNF) y darle un aspecto más concentrado. Dependiendo de la cantidad de agua añadida, se ajusta la concentración de urea para que la gravedad específica de la leche adulterada sea similar a la de la leche natural, de manera que el lactómetro no detecte ninguna diferencia. En muchos casos, los productores añaden agua a la leche para aumentar su volumen, lo que diluye su valor nutricional y por otra parte, compromete la seguridad del producto dado que concentraciones excesivas de urea en la leche pueden resultar tóxicas [304] [305]. Varios estudios han afrontado el reto de aplicar sistemas de redes de sensores a la cuantificación de urea en leche mediante la utilización de sistemas de espectroscopía de impedancias combinado con LDA [306], sistemas voltamétricos basados en microbalanzas de cristal de cuarzo [307] o el desarrollo de modelos de clasificación a partir de señales voltamétricas

mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (NPLS-DA) [308] entre otros.

La discriminación y clasificación de la leche según su origen y tipo comercial son otras de las áreas de aplicación en las cuales las lenguas electrónicas han demostrado un gran potencial. Debido a las variaciones en la composición nutricional de la leche entre distintas razas de vaca, así como a las diferencias en los procesos de producción y almacenamiento, es posible que dos muestras de leches comercializadas bajo el mismo nombre presenten diferencias significativas en sabor, textura y composición nutricional [309].

En un estudio, se utilizó una lengua electrónica potenciométrica basada en electrodos selectivos (ISE) para el análisis cualitativo de muestras procedentes de varias marcas de leche, utilizando productos con diferentes fechas de comercialización. Los valores de potencial obtenidos de estos sensores potenciométricos se procesaron mediante PCA y posteriormente redes neuronales artificiales (ANN), permitiendo una clasificación de elevada precisión [275]. Otros enfoques de lenguas electrónicas potenciométricas y su aplicación en la clasificación de productos lácteos según el tipo de leche utilizada en su producción emplearon redes integradas de electrodos de estado sólido basados en membranas de PVC, y sensores preparados mediante diferentes tipos de membranas poliméricas lipídicas acoplados a un software de procesamiento de datos basado en microcontroladores y un procedimiento de transformación ortogonal, para reconocer productos lácteos según sus marcas [310].

Por otra parte, existen muy pocos ejemplos de lenguas bioelectrónicas específicamente dedicadas al análisis de la leche en la literatura científica. Aunque se han estudiado numerosos tipos de biosensores individuales aplicados en la determinación de compuestos de interés como la lactosa, glucosa y galactosa, utilizando enzimas como la β -galactosidasa (β -Gal) [188], la galactosa oxidasa (GaOx) [312] y la glucosa oxidasa (GOx) [311], la inmovilización de múltiples enzimas en un único soporte que mantengan su capacidad electrocatalítica todavía se mantiene como un desafío, limitando el desarrollo de lenguas bioelectrónicas en la industria láctea. Sin embargo, el uso de nanomateriales podría ofrecer una solución a este problema, facilitando las reacciones electrocatalíticas de las enzimas y permitiendo su correcta inmovilización en la superficie de electrodos con propiedades electroquímicas mejoradas [313].

Algunos ejemplos de lenguas bioelectrónicas modificadas con nanomateriales aplicadas a la industria láctea incluyen sistemas basados en sensores voltamétricos modificados con películas nanoestructuradas [314] y nanohilos de plata [315], una lengua potenciométrica con sensores modificados con nanopartículas y ftalocianinas [316], o lenguas impedimétricas que emplean nanofibras electrohiladas [317] o nanofibras de polímeros conductores depositadas sobre electrodos interdigitados para detectar tetraciclina en muestras de leche [292]. Estas innovaciones subrayan el potencial de los nanomateriales para mejorar la capacidad de detección y funcionalidad de las lenguas bioelectrónicas en este sector.

En conclusión, las lenguas electrónicas proponen un nuevo método para el control de calidad en la industria láctea capaz de proporcionar medidas rápidas y precisas para detectar una amplia gama de contaminantes, adulterantes y variaciones en la composición de los productos lácteos. A medida que la tecnología continúa avanzando, con mejoras en la miniaturización de los dispositivos, el uso de nanomateriales para aumentar la sensibilidad y la integración de técnicas de “machine learning” para el análisis de datos, se espera que las lenguas electrónicas jueguen un papel cada vez más importante en la mejora de la seguridad alimenticia y la calidad de los productos lácteos a nivel global.

Capítulo 3

Resultados

En este capítulo se presentan cinco artículos, resultado del trabajo de investigación realizado durante esta tesis doctoral, enfocados en el desarrollo de lenguas electrónicas para el análisis de la calidad de la leche. A lo largo de estos estudios se abordan temas fundamentales para la industria láctea, como la preservación de las muestras, la detección de adulteraciones y la caracterización nutricional. Los trabajos incluyen desde sistemas sencillos basados en electrodos comerciales hasta dispositivos avanzados que combinan sensores electroquímicos modificados con nanomateriales y enzimas, mostrando cómo la aplicación de técnicas quimiométricas y el procesamiento de datos multivariantes permiten mejorar la precisión y sensibilidad en el control de calidad láctea.

This chapter presents five articles resulting from the research conducted during this doctoral thesis, focused on the development of electronic tongues for milk quality analysis. Throughout these studies, key issues for the dairy industry are addressed, such as sample preservation, adulteration detection, and nutritional characterization. These works cover from simple systems based on commercial electrodes to advanced devices that combine electrochemical sensors modified with nanomaterials and enzymes, demonstrating how the use of chemometric techniques and multivariate data processing enhances precision and sensitivity in dairy quality control.

Introducción

En este capítulo se presenta una selección de artículos publicados en revistas internacionales como resultado del trabajo de investigación realizado durante los estudios de doctorado dentro del grupo UVaSens en la Universidad de Valladolid. Los artículos aparecen en el siguiente orden:

- Artículo 1** **“Impact of milk preservation in the classification and prediction capabilities of a voltammetric electronic tongue”**
- Artículo 2** **“Analysis of milk adulteration by means of a potentiometric electronic tongue”**
- Artículo 3** **“Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors”**
- Artículo 4** **“Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles”**
- Artículo 5** **“A new data analysis approach for an AgNPs-modified impedimetric bioelectronic tongue for dairy analysis”**

A lo largo de los cinco artículos presentados, se explora el desarrollo y evolución de sensores electroquímicos para el análisis de la calidad de la leche, abordando desde la utilización de sistemas sencillos formados por redes de electrodos comerciales hasta la implementación de dispositivos de elevada complejidad en los que se emplean sensores electroquímicos modificados con nanomateriales y enzimas, combinados con métodos avanzados de estadística multivariante para el procesamiento de los datos generados. Estos trabajos comienzan con la necesidad de establecer protocolos fiables de conservación de las muestras de leche para su posterior análisis con lenguas electrónicas, abarcando desde la detección de adulteraciones hasta la caracterización detallada de la composición nutricional de muestras comerciales, utilizando sistemas de creciente complejidad técnica y analítica en cada uno de los estudios presentados.

El primer trabajo que se presenta aborda un aspecto crucial para la industria láctea: la preservación y almacenamiento de la leche, un tema vital para garantizar la reproducibilidad y precisión en los análisis electroquímicos. Este estudio se centra en la evaluación del impacto que tienen las técnicas de preservación en la capacidad predictiva del sistema, utilizando una lengua electrónica voltamétrica formada por tres electrodos serigrafados comerciales (C-SPE, PB-SPE, NiO-SPE) para evaluar los efectos de diferentes métodos de almacenamiento y preservación de la leche, como la congelación, el uso de azidol, un compuesto bacteriostático ampliamente utilizado en la industria láctea; así como la manipulación de las muestras mediante sonicación y dilución en agua de forma previa a su análisis con la lengua

electrónica. Este trabajo presenta una primera aproximación en el desarrollo de un sistema multisensor de análisis electroquímico aplicado en leche, destacando la importancia de estandarizar los protocolos de almacenamiento para asegurar la calidad de los resultados.

El segundo artículo se enfoca en el desarrollo de un sistema para la detección de adulteraciones en leche, una problemática relevante en la industria láctea. En este trabajo se emplea una lengua electrónica potenciométrica basada en sensores de membrana polimérica, diseñados para detectar variación de la composición global de la leche y discriminar entre muestras puras y adulterada. Las adulteraciones estudiadas incluyen la dilución con agua, la mezcla de leche caprina con bovina, y la presencia de residuos de medicamentos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina.

La lengua electrónica utilizada se compuso de 20 sensores potenciométricos cuyas membranas contienen plastificantes y aditivos que permiten aumentar la sensibilidad frente a pequeñas variaciones en la disolución. Los valores de potencial de los sensores se analizaron mediante PCA y regresión por PLS, permitiendo correlacionar las respuestas de los sensores con parámetros fisicoquímicos medidos por métodos tradicionales como el contenido graso, proteico o de lactosa. Este trabajo destaca la capacidad de los sensores de estado sólido basados en membranas poliméricas para realizar un análisis rápido de adulteraciones en leche, lo cual tiene un gran potencial para aplicaciones industriales debido a su bajo coste y simplicidad operativa.

En el tercer artículo, se plantea el desafío de miniaturizar y simplificar el sistema de veinte sensores utilizados en el artículo anterior, sin comprometer su capacidad para evaluar parámetros nutricionales y de calidad en la leche. Para ello se aplicaron algoritmos genéticos combinados con un análisis por mínimos cuadrados parciales, para seleccionar aquellos sensores que aportaban más información en la discriminación de cambios en la composición de las muestras. Así mismo, se analiza la capacidad de cada uno de los sensores para predecir diferentes parámetros fisicoquímicos teniendo en cuenta los valores determinados por técnicas tradicionales. Igualmente se trata de disminuirla redundancia de información y facilitar su implementación en entornos industriales. Una vez elegidos los sensores que conformarían la red final, se utilizaron técnicas de reducción de dimensionalidad y análisis multivariante, como PCA y SVM, para garantizar el correcto funcionamiento del sistema.

El cuarto artículo introduce un salto en complejidad técnica, presentando un sistema de lengua bioelectrónica que combina biosensores enzimáticos con nanomateriales, específicamente nanopartículas de oro, para mejorar la selectividad y sensibilidad en la detección de compuestos nutricionales clave en la leche. Las enzimas utilizadas incluyen galactosa oxidasa, lactato deshidrogenasa y ureasa, todas inmovilizadas en membranas de PVC modificadas con nanopartículas de oro, lo que aumenta significativamente la eficiencia de detección electroquímica de compuestos como la galactosa, ácido láctico y urea. Además, se utilizaron modelos avanzados de procesamiento de datos, como SVM y metodologías de ensamble, para optimizar la clasificación de las muestras según su denominación comercial,

así como para establecer modelos de predicción de los principales parámetros fisicoquímicos del control de calidad lechero. Este enfoque no solo mejoró la precisión de los análisis, permitiendo la discriminación de hasta doce tipos de leche con distintas composiciones nutricionales, sino que demostró la capacidad de los métodos de ensemble de mejorar los resultados de clasificación y predicción obtenidos con lenguas electrónicas.

Finalmente, el quinto estudio continúa con la progresión en el desarrollo de sistemas multisensores de mayor complejidad, introduciendo una lengua bioelectrónica impedimétrica mejorada con AgNPs y enzimas específicas, diseñada para la caracterización de muestras de leche. A diferencia de los métodos electroquímicos anteriores, esta técnica permite medir tanto especies electroactivas como no electroactivas en la leche, lo que amplía su capacidad de detección. Los sensores se basaron en microelectrodos interdigitados (IDE) sobre los cuales se inmovilizaron por adsorción física y crosslinking AgNPs y enzimas (glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y ureasa) para mejorar la transferencia de electrones en la superficie del transductor y aumentar la especificidad del sistema hacia moléculas de interés respectivamente. Además, los datos de espectroscopía de impedancias fueron analizados mediante el sistema de circuitos equivalentes. Los valores de capacitancia y resistencia a la transferencia así obtenidos se utilizaron como información para realizar análisis por PCA y SVM, permitiendo la clasificación de las muestras y la predicción precisa de valores nutricionales como el contenido proteico, graso y de lactosa.

En conjunto, estos estudios reflejan las aportaciones realizadas por esta tesis al avance en el desarrollo de lenguas electrónicas aplicadas a la industria láctea, desde el establecimiento de protocolos de conservación de muestras para su análisis electroquímico, la detección de adulteraciones y la caracterización de su composición nutricional, dos puntos críticos del control lechero, hasta el desarrollo de dispositivos altamente especializados que combinan materiales avanzados con biorreceptores de elevada especificidad. Los trabajos presentados en estos cinco artículos no solo buscan mejorar la precisión y sensibilidad de los diferentes sensores electroquímicos desde la perspectiva de la ciencia básica, sino que también están concebidos desde un enfoque práctico para su aplicación en la industria láctea, lo que subraya la relevancia de estos desarrollos para garantizar la calidad y seguridad en el sector.

3.1 Artículo 1 “Impact of milk preservation in the classification and prediction capabilities of a voltammetric electronic tongue”

La preservación y almacenamiento de la leche es un aspecto crucial en la industria láctea, no solo para garantizar su calidad, sino también para asegurar que los métodos de análisis empleados sean confiables y reproducibles. La leche es una matriz compleja compuesta por grasas, proteínas y otros compuestos que tienden a degradarse con rapidez, especialmente cuando no se almacenan adecuadamente. Este proceso de degradación afecta directamente la capacidad de los métodos electroquímicos, como las lenguas electrónicas voltamétricas para ofrecer resultados precisos y consistentes. Las lenguas electrónicas han demostrado ser herramientas prometedoras en la clasificación y predicción de los valores nutricionales de la leche, sin embargo, las condiciones de almacenamiento previas a su análisis, como la congelación o el uso de conservantes, pueden modificar las propiedades electroquímicas de la leche, afectando la precisión de los resultados obtenidos.

Por lo tanto, para poder implementar lenguas electrónicas en la industria láctea, es necesario desarrollar protocolos de muestreo y almacenamiento que eviten cambios significativos en la composición de las muestras de leche y que al mismo tiempo no interfieran con las mediciones electroquímicas. Por ejemplo, la congelación de la leche es un método común para su almacenamiento, pero puede inducir la formación de cristales de hielo y la separación de fases, lo que afecta la respuesta de los sensores. De igual forma, el uso de conservantes como el azidiol es efectivo para prevenir el crecimiento microbiano, pero no detiene completamente la actividad enzimática, lo que lleva a cambios en la composición de la leche a lo largo del tiempo y puede producir también alteraciones de la señal electroquímica.

El objetivo de este estudio es investigar el impacto de los métodos de almacenamiento y preservación más comunes en la industria láctea, en la capacidad de clasificación y regresión de un sistema voltamétrico de lengua electrónica, optimizando y estandarizando los protocolos que permitan una mayor reproducibilidad y precisión de las medidas, garantizando al mismo tiempo que la composición original de la leche no se vea significativamente alterada. Para ello se evaluaron los efectos de dos técnicas de preservación, la congelación y el uso de azidiol, así como el efecto de la dilución y sonicación de las muestras, en las respuestas de los sensores voltamétricos.

La lengua electrónica utilizada en este trabajo consistió en tres sensores voltamétricos serigrafados comerciales, con diferentes materiales sensibles inmovilizados en su superficie. Los materiales que componían los electrodos fueron: carbono (C-SPE), azul de Prusia (PB-SPE) y nanopartículas de óxido de níquel (NiO-SPE), lo que aseguraba la selectividad cruzada en la red de sensores al proporcionar distintas respuestas electroquímicas a los

diferentes componentes de las muestras de leche. Se analizaron un total de 180 muestras de leche cruda de 20 vacas individuales, cuya composición se determinó mediante técnicas tradicionales, evaluando parámetros fisicoquímicos como el contenido de grasa, proteínas, urea, ácido β -hidroxibutírico (BHB) y el conteo de células somáticas (CCS). Antes de los análisis, las muestras de leche se sometieron a distintos métodos de preservación: congelación a -20°C , adición de azidiol y almacenamiento a 4°C . Además, se determinaron los efectos de la dilución con agua y la sonicación para reducir el ensuciamiento de la red debido a la precipitación de grasas y proteínas en la superficie de los electrodos. Todas las muestras fueron analizadas en el momento de su entrega y tras siete días de almacenamiento.

Los resultados obtenidos revelaron que la congelación es el método más eficiente para preservar la leche destinada a su análisis mediante lenguas electrónicas voltamétricas. Las muestras congeladas y luego descongeladas mostraron una pérdida mínima en la definición de los picos electroquímicos, lo que permitió obtener respuestas reproducibles entre alícuotas de la misma vaca. Las muestras preservadas con azidiol presentaron una mayor variabilidad en las respuestas de los sensores, especialmente después de siete días de almacenamiento. La PCA mostró como las muestras de leche almacenadas bajo diferentes condiciones formaban agrupaciones claras, lo que indica que los métodos de preservación alteran la composición de la leche y, por tanto, su señal electroquímica. En particular, las muestras congeladas y luego sonicadas para resuspender las micelas de grasa mostraron una mayor homogeneidad en su distribución en comparación con el resto de las metodologías, sugiriendo un menor impacto del almacenamiento en la señal voltamétrica.

Además, se utilizó un modelo de regresión SVM para predecir los parámetros fisicoquímicos de técnicas tradicionales en las muestras analizadas utilizando los datos registrados con la lengua electrónica. El modelo mostró una alta correlación entre las señales obtenidas por la red de sensores y los valores determinados mediante métodos tradicionales, con coeficientes de correlación por encima del 0.9 para la mayoría de los parámetros evaluados. Los bajos valores de los errores de predicción indicaron que la lengua electrónica era capaz de proporcionar estimaciones precisas del contenido de grasa, proteínas, urea, CCS y BHB en una sola medida. El contenido de grasa fue el parámetro que se determinó con mayor precisión, lo que se atribuye a la influencia directa de los ácidos grasos y la viscosidad en la respuesta de los sensores.

Este estudio demuestra que la elección del método de preservación es crucial para garantizar la precisión de los resultados obtenidos mediante lenguas electrónicas en el análisis de muestras de leche. La congelación y posterior sonicación de las muestras se identificó como el método más eficiente para minimizar el ensuciamiento de los electrodos y preservar la integridad de la leche. Por otro lado, aunque el uso de azidiol fue eficaz para prevenir el crecimiento microbiano, no detuvo completamente los cambios en la composición global de la leche, lo que afecta las mediciones electroquímicas a largo plazo. Además, el uso de la lengua electrónica permitió discriminar con precisión muestras de leche de vacas individuales

y predecir parámetros fisicoquímicos, demostrando que la estandarización de los protocolos de almacenamiento es clave para asegurar la reproducibilidad y precisión de estos sistemas en su implementación en la industria láctea.

Este artículo fue publicado en *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volumen 393, C. Salvo-Comino, C. Perez-Gonzalez, P. Martin-Bartolome, F. Martin-Pedrosa, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodriguez-Mendez. Impact of milk preservation in the classification and prediction capabilities of a voltammetric electronic tongue, 134138, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134138>, Copyright Elsevier (2023).

This article was published in *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 393, C. Salvo-Comino, C. Perez-Gonzalez, P. Martin-Bartolome, F. Martin-Pedrosa, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodriguez-Mendez. Impact of milk preservation in the classification and prediction capabilities of a voltammetric electronic language, 134138, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134138>, Copyright Elsevier (2023).

3.2 Artículo 2 “Analysis of milk adulteration by means of a potentiometric electronic tongue”

La adulteración de la leche es otro problema de gran relevancia en la industria láctea, no solo por las implicaciones económicas sino también por los riesgos que supone para la salud pública. La manipulación de la leche para aumentar sus volúmenes mediante la adición de agua, o la mezcla de leches de diferentes especies, es una práctica que puede alterar las propiedades nutricionales del producto, poniendo en peligro la calidad de la dieta de los consumidores. Este fenómeno ha sido documentado en numerosos estudios que señalan que, en regiones donde la leche caprina es altamente valorada por sus propiedades nutricionales, la mezcla con leche bovina es una práctica común debido a las fluctuaciones en la producción de leche caprina y su mayor coste en el mercado. Por ejemplo, según datos recientes, la leche de cabra puede alcanzar precios hasta un 50% más elevados que la leche de vaca en ciertos mercados europeos, incentivando a algunos productores a adulterarla con leche bovina de menor precio. A nivel mundial, se estima que entre un 10% y un 30% de los productos lácteos pueden estar adulterados en alguna medida, lo que subraya la magnitud del problema.

Otro aspecto crítico de la adulteración de muestras de leche es la presencia de posibles residuos de medicamentos, especialmente en vacas lecheras tratadas por enfermedades como la mastitis bovina, una inflamación de las glándulas mamarias que afecta tanto a la cantidad como a la seguridad de la leche producida. La mastitis es una de las enfermedades más comunes en las explotaciones lecheras, y su tratamiento involucra el uso de antibióticos, cuyas trazas pueden acabar en la leche consumida. En países como España, un 25% de los casos de mastitis clínica requieren tratamientos antibióticos que generan residuos que, si no son controlados adecuadamente, pueden suponer riesgos para la salud pública al favorecer la aparición de resistencias a antibióticos. La aparición de restos de antibióticos y otros medicamentos en la leche representa un desafío a nivel industrial importante, ya que los métodos tradicionales para su detección son costosos y requieren equipos especializados, lo que limita su aplicación en tiempo real en entornos industriales. La creciente preocupación por la seguridad alimentaria y la necesidad de proteger la salud del consumidor han impulsado la investigación en tecnologías más rápidas y económicas para detectar estas adulteraciones.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar y evaluar un dispositivo multisensor formado por una red de sensores potenciométricos en la determinación de adulteraciones en muestras de leche, como la adulteración con agua, la mezcla de leche caprina con bovina y la detección de residuos de medicamentos en muestras procedentes de vacas tratadas por mastitis. Para ello, se utilizó una lengua electrónica potenciométrica compuesta por veinte sensores con membranas basadas en matrices poliméricas. Estos sensores, formados por distintos plastificantes combinados con diferentes aditivos e introducidos en una membrana

de PVC, poseen diferentes propiedades electroquímicas, lo que incrementa su habilidad para detectar pequeños cambios en la composición de la leche adulterada.

La red de sensores se colocó en contacto con la muestra de leche, registrando el cambio en el potencial eléctrico generado por la interacción de los iones y otros componentes, como grasas, proteínas y azúcares, con la superficie de la membrana del sensor. Este potencial está directamente relacionado con la composición de la muestra, permitiendo detectar pequeñas variaciones en sus componentes. Los datos recopilados fueron procesados utilizando técnicas de análisis multivariante, PCA, que permitió identificar patrones en las respuestas de la red de sensores y agrupar las muestras según su grado de adulteración. Además, se aplicó la técnica de regresión por mínimos cuadrados parciales para correlacionar las respuestas de los sensores con parámetros fisicoquímicos medidos por métodos tradicionales, como el HPLC para la determinación del contenido de lactosa, y la gravimetría para el contenido de grasa.

Los resultados mostraron que la lengua electrónica desarrollada fue capaz de diferenciar eficazmente entre distintas variedades de leche, como la leche cruda y pasteurizada, así como detectar adulteraciones con agua y la mezcla de leche caprina con bovina. El análisis por PCA permitió una clara diferenciación entre las muestras no adulteradas y aquellas adulteradas con agua, incluso en niveles de adulteración del 25% difíciles de detectar mediante técnicas tradicionales. Además, el dispositivo fue capaz de identificar residuos de medicamentos en leche de vacas tratadas con mastitis, una ventaja crucial en el control lechero. Por otro lado, el modelo de regresión PLS mostró una fuerte correlación entre los datos potenciométricos y los parámetros fisicoquímicos, con coeficientes de correlación (R^2) por encima del 0.9 para la mayoría de los componentes evaluados.

La lengua electrónica potenciométrica desarrollada en este estudio destaca por su rapidez y eficiencia en comparación con las técnicas tradicionales, que suelen requerir largos tiempos de análisis y equipos costosos. Su capacidad para realizar múltiples mediciones on line, sin que sea necesario un pretratamiento exhaustivo de las muestras, la convierte en una herramienta particularmente versátil para la detección de adulterantes en la leche, especialmente en entornos industriales donde se manejan grandes volúmenes y se necesita una respuesta rápida y confiable. Esta tecnología ofrece una solución innovadora y eficaz para discriminar entre diferentes tipos de leche y detectar adulteraciones comunes, como la adición de agua o la mezcla de leche caprina y bovina. Su fiabilidad en la correlación de los datos electroquímicos con parámetros fisicoquímicos proporciona una evaluación integral de la calidad de la leche, contribuyendo significativamente a mejorar los controles de calidad, así como a garantizar la transparencia y seguridad en el proceso de producción de los productos lácteos.

Este artículo fue publicado en Journal of Dairy Science, C. Perez-Gonzalez, C. Garcia-Hernandez, C. Garcia-Cabazon, M.L. Rodriguez-Mendez, L.Dias, , F. Martin-Pedrosa. Analysis of milk adulteration by means of a potentiometric electronic tongue, <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25140>, Copyright Elsevier (2024).

This article was published in Journal of Dairy Science, C. Perez-Gonzalez, C. Garcia-Hernandez, C. Garcia-Cabazon, M.L. Rodriguez-Mendez, L.Dias, , F. Martin-Pedrosa. Analysis of milk adulteration by means of a potentiometric electronic tongue, <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25140>, Copyright Elsevier (2024).

3.3 Artículo 3 “Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors”

La preservación y almacenamiento de la leche es un aspecto crucial en la industria láctea, no solo para garantizar su calidad, sino también para asegurar que los métodos de análisis empleados sean confiables y reproducibles. La leche es una matriz compleja compuesta por grasas, proteínas y otros compuestos que tienden a degradarse con rapidez, especialmente cuando no se almacenan adecuadamente. Este proceso de degradación afecta directamente la capacidad de los métodos electroquímicos, como las lenguas electrónicas voltamétricas para ofrecer resultados precisos y consistentes. Las lenguas electrónicas han demostrado ser herramientas prometedoras en la clasificación y predicción de la composición de la leche, sin embargo, las formas de almacenarlas previo a su análisis, como la congelación o el uso de conservantes, pueden modificar las propiedades electroquímicas de la leche, afectando la precisión de los resultados obtenidos.

El objetivo principal de este estudio fue desarrollar una lengua electrónica portátil y simplificada que, utilizando un conjunto optimizado de sensores, mantenga la capacidad de evaluar con precisión la composición de la leche. En lugar de ampliar el número de sensores, como se hizo en investigaciones anteriores para aumentar la capacidad de discriminación, este enfoque se centra en la miniaturización y optimización mediante algoritmos de selección de sensores. De esta manera, se asegura que los sistemas portátiles no solo sean más fáciles de integrar en procesos industriales, sino que también mantengan la fiabilidad en la detección de parámetros clave sin comprometer la calidad del análisis.

La metodología empleada en este trabajo comenzó con la fabricación del conjunto original de 20 sensores potenciométricos basados en membranas poliméricas, diseñados para detectar diferentes compuestos presentes en la leche, como sales, azúcares y ácidos orgánicos. Tras caracterizar los sensores y evaluar sus sensibilidades frente a disoluciones patrón, se realizaron mediciones de 13 muestras de leche con distintos porcentajes de grasa y enriquecimientos nutricionales, como calcio y ácido fólico, las cuales habían sido previamente analizadas mediante métodos tradicionales. Para optimizar el sistema y reducir el número de sensores, se emplearon algoritmos genéticos, seleccionando un conjunto óptimo de cinco sensores que ofrecieran la mayor cantidad de información relevante y permitieran predecir con alta precisión los parámetros fisicoquímicos de las muestras, minimizando la redundancia en los datos.

Este proceso de optimización se basó en la correlación entre las respuestas de los sensores seleccionados y los parámetros fisicoquímicos de la leche, como la acidez, la densidad, y los contenidos de proteínas, lactosa y grasa. Los modelos de regresión mediante SVM fueron utilizados para validar el rendimiento predictivo del sistema simplificado,

demostrando su capacidad para predecir con precisión estos parámetros clave. Además, el sistema fue probado para monitorear el deterioro de la leche no sellada, evaluando cambios en su composición a lo largo del tiempo mediante PCA y SVM, confirmando su eficacia para detectar y predecir el aumento de la acidez, característico de los procesos de envejecimiento de productos lácteos.

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto como el sistema de lengua electrónica simplificado, con solo cinco sensores, era capaz de discriminar eficazmente distintos variedades de leche comercial, clasificándolos según su contenido graso y características nutricionales. Además, el sistema mostró un rendimiento comparable al de redes de sensores más complejas, logrando una correlación significativa con parámetros fisicoquímicos tradicionales, principalmente la acidez y el contenido de lactosa. En cuanto a la detección del deterioro de muestras, el sistema fue capaz de identificar cambios en la acidez de la leche no sellada, validando su potencial para el monitoreo de frescura en productos lácteos.

La conclusión final de este estudio es la viabilidad de utilizar lenguas electrónicas simplificadas y portátiles en el control de calidad en la industria láctea, marcando un avance importante hacia la miniaturización y optimización de las tecnologías de detección en este sector. Este sistema fue capaz de ofrecer una solución rápida y eficiente para evaluar la calidad de productos lácteos, gracias a su capacidad para discriminar entre distintos tipos de leche y predecir con precisión parámetros clave, demostrando una vez más su potencial como una herramienta práctica capaz de asegurar la seguridad y calidad de los productos lácteos.

Este artículo fue publicado en *Frontiers in Chemistry*, Volumen 9, C. Perez-Gonzalez, C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, L. Dias, M.A. Rodriguez-Perez, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodriguez-Mendez. Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors, 706460, <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.706460>, Copyright Frontiers (2021).

This article was published in *Frontiers in Chemistry*, Volume 9, C. Perez-Gonzalez, C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, L. Dias, M.A. Rodriguez-Perez, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodriguez-Mendez. Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors, 706460, <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.706460>, Copyright Frontiers (2021).

3.4 Artículo 4 “Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles”

En el trabajo anterior, se desarrolló una lengua electrónica potenciométrica simplificada y compacta, que demostró su capacidad para discriminar diferentes tipos de leche con distintos contenidos nutricionales, detectar el envejecimiento de estos productos y predecir parámetros fisicoquímicos clave. Aunque este sistema resultó eficaz, nos planteamos seguir mejorando la sensibilidad y selectividad del sistema para detectar con mayor precisión compuestos específicos en la leche, como la lactosa o el ácido láctico. El estudio presentado en este artículo busca modificar la tecnología desarrollada hasta ahora, incorporando nanomateriales y enzimas para potenciar el rendimiento del sistema y optimizar su capacidad de análisis en el control de calidad de productos lácteos.

La utilización de nanomateriales metálicos y enzimas en la fabricación de biosensores ha demostrado ser una estrategia eficaz para mejorar el rendimiento de las lenguas electrónicas, al potenciar la detección de compuestos clave. Por otro lado, el análisis de datos generado por estas lenguas electrónicas también puede beneficiarse de metodologías avanzadas, como los algoritmos de aprendizaje automático y los enfoques de ensamble, para mejorar la precisión en la clasificación y la predicción de parámetros fisicoquímicos. Este trabajo se enmarca en este enfoque innovador, proponiendo el desarrollo de una lengua bioelectrónica que combina nanopartículas de oro y biosensores enzimáticos para mejorar la sensibilidad y especificidad del sistema. Al integrar nanopartículas de oro y enzimas en las membranas de los sensores, se esperaba mejorar significativamente la capacidad de discriminación entre diferentes composiciones de leche y aumentar la precisión en la predicción de parámetros fisicoquímicos, superando las limitaciones de los dispositivos desarrollados hasta el momento optimizando tanto los sensores como el procesamiento de sus respuestas gracias a la implementación de metodologías de ensamble.

Para ello se prepararon membranas poliméricas basadas en PVC carboxilado dopado con nanopartículas de oro coloidal, un 20% de plastificante en masa y un 3% de aditivo. Sobre esta superficie se procedió a la inmovilización de las enzimas como galactosa oxidasa, lactato deshidrogenasa y ureasa mediante el método de la carbodiimida asegurando un anclaje estable en el tiempo del biorreceptor. Los sensores contienen por tanto un plastificante para mejorar la flexibilidad, un aditivo para la selectividad iónica, nanomateriales metálicos para potenciar las propiedades electroquímicas y enzimas que aseguran una alta especificidad del sensor hacia compuestos de interés en la muestra. La combinación de plastificante, aditivo, nanopartículas y enzimas dio lugar a una red de nueve sensores que se empleó en el análisis de soluciones patrón de los compuestos a analizar, así como en muestras de leche comerciales con distintas composiciones nutricionales.

Los datos obtenidos mediante la red de sensores en disoluciones patrón confirmaron el efecto sinérgico de las enzimas combinadas con las nanopartículas de oro, aumentando la sensibilidad frente a moléculas de interés como el ácido láctico, la urea o la lactosa, disminuyendo los límites de detección en hasta un orden de magnitud respecto a los mismos sensores que presentaban una o ninguna de estas modificaciones, confirmando el éxito de la inmovilización enzimática y el efecto sinérgico de las nanopartículas y el enzima. Además, los datos de potencial obtenidos se procesan mediante análisis de componentes principales para evaluar la capacidad del sistema de discriminar entre disoluciones patrón antes de proceder al análisis de muestras de leche comerciales consiguiendo un 82% de varianza explicada en sus dos primeras componentes.

En el caso de las muestras de leche, no solo se consiguió una clara discriminación en función de la composición nutricional de las doce muestras de leche analizadas (clásica, sin lactosa, con calcio y con ácido fólico) sino que además fue posible establecer un modelo de regresión por SVM para la predicción de los principales parámetros fisicoquímicos del control lechero con coeficientes de correlación por encima del 0.95 en todos los casos tanto para la calibración como la validación del sistema. Es más, para mejorar la precisión del sistema en la predicción parámetros fisicoquímicos en futuras muestras, se emplearon modelos de metodología de ensamble que combina los resultados de distintos algoritmos de clasificación para optimizar la precisión global. En concreto, se aplicó el método de "Stochastic Gradient Boosting" para combinar los resultados de los algoritmos SVM, redes neuronales cuasi-recurrentes y modelos de regresión Cubist. Esta estrategia permitió mejorar las correlaciones entre los valores de potencial obtenidos con la lengua bioelectrónica y los parámetros fisicoquímicos tradicionales de calidad de la leche obteniendo valores de correlación por encima del 0.99 en todos los casos.

En este trabajo se demuestra, por tanto, como el sistema de lengua bioelectrónica desarrollado permitió mejorar significativamente la capacidad de análisis de la composición de la leche, tanto en términos de precisión como de discriminación entre distintas categorías de productos lácteos, gracias al efecto sinérgico entre las nanopartículas de oro y las enzimas. Además, se hizo una primera aproximación a la implementación de técnicas avanzadas de procesamiento de datos, como un modelo de ensamble, el cual ha demostrado mejorar notablemente la predicción de los parámetros fisicoquímicos, lo que aseguraría un control de calidad más eficiente en la industria láctea. Este enfoque representa un avance significativo hacia el desarrollo de sistemas portátiles analíticos de alta precisión que puedan integrarse en los procesos de control de calidad láctea.

Este artículo fue publicado en Food Control, Volumen 145, C. Perez-Gonzalez, C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, C. Garcia-Cabazon, M.L. Rodriguez-Mendez. Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles, 109425, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109425>, Copyright Elsevier (2022).

This article was published in Frontiers in Food Control, Volume 145, C. Perez-Gonzalez, C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, C. Garcia-Cabazon, M.L. Rodriguez-Mendez. Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles, 109425, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109425>, Copyright Elsevier (2022).

3.5 Artículo 5 “A new data analysis approach for an AgNPs-modified impedimetric bioelectronic tongue for dairy analysis”

Tras el éxito logrado en la mejora de la sensibilidad y especificidad de lenguas bioelectrónicas potenciométricas mediante la incorporación de nanomateriales y enzimas, resulta de gran interés estudiar la eficacia de dichas modificaciones en otros tipos de sensores como es el caso de los sensores impedimétricos. Este tipo de sensores ofrecen una ventaja significativa ya que permiten detectar tanto especies electroactivas como no electroactivas presentes en la leche, ampliando el rango de compuestos que pueden ser analizados. Al transferir las técnicas de modificación con nanopartículas y enzimas a este tipo de transductor, es posible no solo mejorar la precisión y sensibilidad del sistema, sino también estudiar en mayor profundidad el efecto electrocatalítico de los nanomateriales utilizados en la modificación de los sensores.

El objetivo que se persigue en este trabajo fue el desarrollo de una lengua bioelectrónica impedimétrica, que combinara AgNPs y enzimas, para su posterior aplicación en la caracterización de muestras de leche. Para lograrlo, se optimiza un conjunto de biosensores basados en microelectrodos interdigitados (IDE), los cuales se modifican con AgNPs para aumentar la sensibilidad del sistema. Además, se inmovilizan enzimas como la beta-galactosidasa, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, lipasa y ureasa sobre la superficie de los sensores para mejorar la selectividad hacia compuestos específicos presentes en la leche. Posteriormente, los datos obtenidos mediante espectroscopía de impedancia electroquímica se analizan utilizando técnicas de reducción de dimensionalidad y métodos de clasificación supervisados, como el análisis de componentes principales y las máquinas de soporte vectorial, lo que garantiza una clasificación y predicción más precisa de los parámetros físicoquímicos clave.

El uso de esta nueva tecnología se centra en el uso combinado de AgNPs con enzimas para favorecer la transferencia electrónica y la actividad catalítica de los sensores, ampliando así la capacidad de detección y discriminación entre los diferentes componentes de la leche. Este enfoque no solo mejora la sensibilidad y selectividad del sistema, sino que también permite realizar ensayos directamente relacionados con transferencia electrónica en la superficie del electrodo aportando información más concisa sobre las posibles interacciones que tienen lugar entre la matriz láctea y la superficie del sensor donde se han inmovilizado estos materiales.

Para explorar a fondo el rendimiento del sistema bioelectrónico desarrollado, fue esencial la correcta optimización del sistema para establecer las mejores condiciones de funcionamiento. Los electrodos de oro IDE sirvieron como sustrato base sobre el cual se depositaron suspensiones de nanopartículas de plata mediante “drop-casting”. La variación

en las concentraciones de nanopartículas, entre 20 y 40 μL , permitió maximizar la superficie activa de los sensores, asegurando una mayor interacción con los compuestos de interés. Posteriormente, se inmovilizaron las enzimas galactosa oxidasa, glucosa oxidasa y lipasa sobre la superficie de los electrodos. La aplicación de una capa de Nafion, una membrana de intercambio de protones, aseguró una inmovilización estable por atrapamiento del biorreceptor preservando la actividad enzimática a largo plazo y evitando su difusión al medio durante el análisis de muestras.

Una vez los sensores fueron preparados, se procedió a determinar su capacidad para caracterizar muestras de leche comercial. Los ensayos de EIS electroquímica fueron llevados a cabo dentro de un amplio rango de frecuencias (0.1 Hz a 100 kHz) con el fin de obtener una representación detallada de las interacciones electroquímicas en los sensores. Los datos recolectados se presentaron en diagramas de Nyquist, donde se evaluaron variables críticas como la resistencia a la transferencia electrónica (R_{ct}) y la capacitancia en la interfaz electrodo-electrolito, parámetros clave para medir la eficiencia de los sensores. Las comparaciones entre los biosensores modificados con AgNPs y aquellos no modificados revelaron el impacto positivo de combinar AgNPs y enzimas en la sensibilidad del sistema, permitiendo la discriminación entre distintos tipos de leche comercial según su composición nutricional (clásica, enriquecida con calcio y sin lactosa).

Para optimizar el análisis de los datos impedimétricos obtenidos, se procedió al preprocesado de las señales de impedancia mediante circuitos equivalentes. Este proceso permitió simplificar las señales complejas en modelos más sencillos, reduciendo el número de variables sin disminuir la información obtenida durante los ensayos. A partir de los datos ajustados y los datos impedimétricos originales, se emplearon técnicas de quimiometría para comparar la eficacia de ambos enfoques. El análisis de PCA mostró una varianza explicada del 85% en sus dos primeras componentes, lo que refleja la capacidad del sistema para discriminar entre leches clásicas, enriquecidas con calcio y sin lactosa. Por otro lado, los modelos SVM alcanzaron una precisión del 100% en la clasificación de las muestras de leche durante la fase de entrenamiento, y una precisión de 95% durante la validación cruzada en el modelo de circuitos equivalentes superior al 92% obtenido con los datos originales de impedancia. Posteriormente, las señales de ambos métodos de procesamiento de datos fueron analizadas mediante SVM para establecer correlaciones precisas con los parámetros físicoquímicos medidos tradicionalmente, como acidez, densidad, proteínas, grasa, lactosa y urea. Los resultados mostraron que el enfoque basado en circuitos equivalentes proporcionó mejores predicciones con valores de R^2 de hasta 0.96 en la fase de validación, demostrando ser la metodología de procesamiento de datos más adecuada para la lengua bioelectrónica impedimétrica.

En resumen, este trabajo demuestra cómo la modificación con nanopartículas de plata y enzimas de una plataforma impedimétrica permite mejorar significativamente la capacidad de los sensores para analizar muestras complejas como la leche. La implementación de

circuitos equivalentes en el procesamiento de los datos ha permitido mejorar la precisión en la predicción de los parámetros fisicoquímicos, consolidándose como la estrategia más adecuada de análisis. Con esta optimización tanto en el diseño de los sensores como en las estrategias de análisis de datos, se logra un sistema robusto y eficiente aplicable en los controles de calidad de la industria láctea, capaz de discriminar con alta precisión entre distintas composiciones nutricionales.

Este artículo fue publicado en *Food Control*, Volumen 156, C. Perez-Gonzalez, C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, M.L. Rodriguez-Mendez, C. Garcia-Cabezon. A new data analysis approach for an AgNPs-modified impedimetric bioelectronic tongue for dairy analysis, 110136, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110136>, Copyright Elsevier (2024).

This article was published in *Frontiers Food Control*, Volume 156, C. Perez-Gonzalez, C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, M.L. Rodriguez-Mendez, C. Garcia-Cabezon. A new data analysis approach for an AgNPs-modified impedimetric bioelectronic tongue for dairy analysis, 110136, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110136>, Copyright Elsevier (2024).



Capítulo 4

Conclusiones y Perspectivas Futuras

En este capítulo se presentan las principales conclusiones obtenidas en los trabajos desarrollados a lo largo de esta tesis doctoral, tomando como referencia los objetivos planteados en el capítulo 1 referentes a la creación de lenguas electrónicas y bioelectrónicas aplicadas al análisis de la leche en la industria láctea. Además, se exponen las perspectivas futuras y los retos tecnológicos de futuras investigaciones para la implementación de estas herramientas en entornos industriales.

This chapter presents the conclusions drawn from the work carried out throughout this doctoral thesis, based on the objectives set for the development of electronic and bioelectronic tongues applied to milk analysis in the dairy industry. Additionally, it outlines future perspectives and technological challenges for upcoming research aimed at implementing these tools in industrial environments.

4.1 Conclusiones

A lo largo de los trabajos que componen la presente tesis doctoral, se ha conseguido desarrollar múltiples sistemas de lenguas electrónicas basadas en sensores y biosensores electroquímicos para su aplicación en el control de calidad de la industria láctea. Estos sistemas no solo han permitido mejorar la sensibilidad y reproducibilidad en la detección de compuestos clave en leche de vaca, sino que también han facilitado la creación de modelos predictivos capaces de correlacionar estos resultados con técnicas analíticas tradicionales, optimizando así el control de calidad y la seguridad en la industria láctea.

A lo largo de este capítulo se exponen las conclusiones derivadas de los resultados experimentales que apoyan la consecución de los objetivos de investigación que se propusieron en esta tesis relativos a la tecnología de lenguas electrónicas aplicada al análisis de leche.

1. La aplicación de una lengua electrónica voltamétrica basada en sensores comerciales permitió demostrar la gran influencia que el método de almacenamiento y el proceso de conservación de la leche tienen en los resultados electroquímicos. Se comprobó que la congelación a -20°C y posterior descongelación en oscilación orbital provocaban menos cambios en la matriz láctea que la utilización de técnicas de preservación como la adición de azidiol, facilitando su almacenaje durante largos períodos de tiempo. Cuestión esencial cuando el análisis no puede realizarse in-situ. Del mismo modo se determinó que la dilución de la matriz seguida de sonicación contribuía significativamente a disminuir el ensuciamiento de los sensores mejorando la reproducibilidad de las señales electroquímicas. Aplicando las condiciones de análisis optimizadas la lengua electrónica voltamétrica permitió la discriminación de leche procedente de vacas individuales en base a su composición, llegando a establecer modelos de correlación con sus principales valores fisicoquímicos obtenidos mediante técnicas convencionales.

2. Se ha desarrollado una lengua electrónica potenciométrica compuesta de 20 sensores de membrana polimérica, compuestos de una combinación de diferentes aditivos, plastificantes y PVC, que permitieron la discriminación de diferentes tipos de leche por su origen y estado de tratamiento. Además, este sistema permitió la identificación de adulteraciones en leche cruda y pasteurizada, como la adición de agua, la mezcla de leche caprina con bovina y la contaminación por tratamientos veterinarios. Los sensores mostraron alta selectividad cruzada frente a los cambios de composición de las muestras analizadas que permitieron correlacionar las respuestas electroquímicas con parámetros fisicoquímicos clave, como el contenido de grasa, proteínas y lactosa. Estos resultados validaron el sistema como una herramienta rápida y eficiente para la detección de adulteraciones, un paso crucial del control lechero para garantizar la integridad y la calidad de los productos lácteos en la industria alimentaria, salvaguardando la salud y la confianza de los consumidores.

3. Se ha logrado la optimización del sistema de lengua electrónica potenciométrica diseñada mediante la selección de los cinco sensores que aportaban mayor varianza al sistema mediante la combinación de algoritmos genéticos y análisis por PLS, reduciendo el número de sensores de veinte a un conjunto óptimo de cinco sensores sin comprometer la capacidad del sistema para evaluar parámetros nutricionales como la grasa, las proteínas y la lactosa. El uso de técnicas como PCA y SVM garantizó que el sistema optimizado era capaz de mantener su capacidad de discriminación entre distintas variedades de leche comercial según su composición y su correlación con diferentes factores fisicoquímicos. Este logro representa un paso crucial hacia la implementación de lenguas electrónicas en entornos industriales, ya que permite reducir la información redundante y facilitar la integración de estos dispositivos en procesos automatizados.

4. Se ha desarrollado un sistema de lengua bioelectrónica con características mejoradas, la mejora en la especificidad del sistema permitió predecir las características químicas de la leche con una precisión de del 99%. Las nanopartículas de oro, integradas en la matriz de PVC, han demostrado mejorar sustancialmente la respuesta potenciométrica de los sensores al aumentar el potencial de membrana incrementando la eficiencia de la detección del sistema. Las concentraciones de AuNPs de hasta el 10% en masa produjeron las mejores respuestas electroquímicas sin ninguna mejora adicional en los valores de sensibilidad al superar estos valores. Estas nanopartículas de oro actuaron como amplificadores de las señales electroquímicas, favoreciendo la transferencia de electrones y potenciando la actividad electrocatalítica de las enzimas inmovilizadas. Este efecto sinérgico entre las nanopartículas y las enzimas (Galactosa Oxidasa, Lactato Deshidrogenasa y Ureasa) fue claramente demostrado por el aumento de la sensibilidad y la reducción de los límites de detección en aquellos sensores implementados con ambas modificaciones (AuNPs-Enzima), comparados con los sensores con una (AuNPs/Enzima) o ninguna modificación, para compuestos claves presentes en la leche, como KCl, CaCl₂, ácido láctico, urea y galactosa.

El sistema de lengua bioelectrónica desarrollado también fue utilizado con éxito en la discriminación de distintos tipos de leche comercial aplicando análisis de componentes principales según su contenido nutricional, logrando una capacidad de clasificación superior al 95%. Además, el sistema permite predecir la acidez, densidad, %proteínas, %lactosa, %grasa y materia seca con bajos errores y altos coeficientes de correlación por encima del 0.99. Estos resultados demuestran que los modelos SVM construidos a partir de la correlación de los datos de la lengua bioelectrónica y los parámetros fisicoquímicos tienen potencial para su uso en la evaluación simultánea de hasta ocho parámetros fisicoquímicos en una sola medida, reduciendo así el tiempo de análisis. Además, se ha demostrado que la aplicación de metodologías de ensamble puede mejorar aún más los valores de correlación obtenidos entre la lengua bioelectrónica y los parámetros fisicoquímicos, esto supone un adicional incremento en la eficiencia de los dispositivos lo que permitiría la implementación exitosa de estos dispositivos en nuevas aplicaciones en la industria láctea.

5. A partir de biosensores impedimétricos, se ha desarrollado una nueva lengua bioelectrónica aplicada con éxito al análisis de muestras de leche. La modificación de los sensores interdigitados con nanopartículas de plata (AgNPs) que mejoran significativamente la transferencia de electrones en la superficie de los electrodos permite reducir la resistencia a la transferencia de electrones; esto se reflejó en una notable reducción del módulo de impedancias, lo que confirmó que las nanopartículas inmovilizadas facilitaban el transporte de electrones, mejorando la capacidad del sistema para detectar compuestos clave en las muestras de leche. Además, se demostró que, una vez más, la combinación de nanopartículas metálicas y enzimas mejora notablemente la sensibilidad y especificidad del sistema hacia compuestos de interés, como glucosa, galactosa, lactosa, urea y triglicéridos. La sinergia entre las nanopartículas y las enzimas indujo un aumento en la actividad catalítica, lo que se tradujo en un descenso la resistencia a la transferencia electrónica en la superficie de los sensores y su módulo de impedancias.

La caracterización superficial de los sensores realizada por microscopía de fuerza atómica (AFM) permitió constatar la distribución homogénea de las nanopartículas de plata en la superficie de los sensores, así como el aumento de rugosidad superficial tras realizar la inmovilización enzimática asegurando su presencia en la superficie del sensor durante los análisis electroquímicos.

Por otra parte, se ha demostrado que el uso de circuitos equivalentes para el procesado de datos de la lengua bioelectrónica impedimétrica diseñada supone una opción más eficiente al reducir la dimensionalidad de los datos sin perder capacidad de discriminación o predicción en el proceso. Este nuevo enfoque proporcionó resultados más precisos en el análisis multivariante, el análisis de componentes principales (PCA) permitió discriminar entre muestras de leche comercial (clásica, enriquecida con calcio y libre de lactosa) en función de su composición nutricional y desarrollar modelos de predicción mediante SVM con correlaciones superiores al 0.9 con los valores fisicoquímicos utilizados habitualmente en el control lechero. Estos resultados confirmaron que el sistema de lengua bioelectrónica, junto con el enfoque de procesamiento de datos basado en circuitos equivalentes, permiten obtener una mayor capacidad predictiva a la vez que mejora la precisión en el análisis de muestras de leche comparándolo con otras aproximaciones comúnmente utilizadas en la bibliografía, lo que lo convierte en una herramienta prometedora para el análisis rutinario de productos lácteos.

Las conclusiones finales de la presente tesis doctoral en función de los objetivos planteados en esta tesis doctoral son las siguientes:

a) Las lenguas electrónicas y bioelectrónicas desarrolladas en estos trabajos han demostrado ser alternativas válidas y fiables en el análisis de productos lácteos. La combinación de sensores electroquímicos (voltamétricos, potenciométricos o impedimétricos) con técnicas avanzadas de análisis de datos ha permitido una caracterización precisa de muestras de leche, validando su utilidad en el control de calidad industrial de estos

productos desde la detección de adulteraciones hasta la predicción de parámetros fisicoquímicos comúnmente utilizados en el análisis tradicional de este producto.

b) El empleo de nanomateriales, en particular nanopartículas metálicas, ha permitido optimizar la respuesta electrocatalítica de los sensores, incrementando la sensibilidad en la determinación de compuestos importantes en el control lechero. La integración de nanopartículas de oro o plata ha resultado en un mayor rendimiento electroquímico, obteniendo límites de detección más bajos y respuestas más estables gracias a su habilidad para favorecer la transferencia electrónica en la superficie de los sensores.

c) Se ha logrado implementar con éxito biosensores enzimáticos mediante la unión covalente o el atrapamiento de enzimas en la superficie de los electrodos permitiendo aumentar la especificidad de los sensores, detectando simultáneamente azúcares, ácidos orgánicos y bases presentes en leche líquida. Además, se ha demostrado el efecto sinérgico de enzimas y nanomateriales metálicos, siendo estos últimos capaces de favorecer la actividad electrocatalítica de las enzimas.

d) La metodología de trabajo desarrollada permitió analizar muestras de leche UHT, pasteurizada y cruda, gracias al desarrollo de protocolos de trabajo que aseguran resultados de elevada reproducibilidad, minimizando el efecto de la conservación, tratamiento y procesado de las muestras en el análisis electroquímico. La evaluación de los límites de detección, de la sensibilidad y de la estabilidad de los sensores, ha demostrado la capacidad de los sistemas desarrollados para analizar especies de interés en la leche.

e) Se ha validado el uso de lenguas electrónicas para detectar adulteraciones, como la dilución con agua o la mezcla de leche caprina y bovina, con alta precisión a la vez que detectar sustancias capaces de comprometer la seguridad alimentaria del producto. Los sistemas desarrollados también permitieron evaluar parámetros nutricionales como el contenido de grasa, proteínas y lactosa, lo que confirma su aplicabilidad en la industria para la verificación de calidad y autenticidad de muestras de leche.

f) La utilización de técnicas quimiométricas, como la regresión por mínimos cuadrados parciales y la regresión de máquinas de soporte vectorial permitió una discriminación efectiva de las diferentes variedades de leche dependiendo de su composición, su origen, frescura y posibles adulteraciones, así como la implementación de modelos de regresión para la predicción de parámetros fisicoquímicos clave en el control lechero. Además, se demostró como la utilización de técnicas de análisis multivariante avanzadas, como los algoritmos genéticos y los métodos de ensamble, han permitido optimizar el comportamiento de estas lenguas electrónicas mediante la selección de sensores y la mejora de los modelos de clasificación o regresión respectivamente.

4.1. Conclusions

Throughout this doctoral thesis, multiple electronic tongue systems based on electrochemical sensors and biosensors have been developed for their application in the dairy industry. These systems showed an improved capability to detect key compounds in liquid milk in terms of sensitivity and reproducibility, they have also facilitated the creation of predictive models capable of correlating these results with traditional analytical techniques, thereby optimizing quality control and authenticity in the dairy industry.

This chapter presents the results from the experiments that demonstrate the achievement of the research objectives proposed for this thesis concerning the use of electronic tongue technology in milk analysis.

1. The application of a voltammetric electronic tongue demonstrated how storage and preservation practices affect the precision of electrochemical data. It was found that freezing at -20°C and subsequent thawing caused fewer changes in the milk matrix compared to preservation techniques such as azidiol, allowing long-term storage. Additionally, dilution followed by sonication significantly reduced sensor fouling, improving the reproducibility of electrochemical signals. Under optimized analytical conditions, the voltammetric electronic tongue was able to discriminate milks from individual cows based on their composition, establishing correlation models with its main physicochemical values.

2. A potentiometric electronic tongue system was developed. This system was made of twenty polymeric membrane sensors composed of a combination of various additives, plasticizers, and PVC. The electronic tongue enabled the determination of possible adulterations in raw and pasteurized milk, such as the addition of water, mixing of bovine milk with caprine milk, and contamination from veterinary treatments. The sensors exhibited high cross-selectivity to changes in sample composition, allowing the correlation of electrochemical responses with key physicochemical parameters, such as protein, fat or lactose content. These results validated the system as an efficient and fast tool for detecting adulterations, a crucial step in dairy control to ensure the integrity and quality of dairy products, safeguarding consumer health.

3. The optimization of the potentiometric electronic tongue was achieved by a combination of genetic algorithms and PLS to select the sensors with the highest variance contribution to the system. This reduced the number of sensors from twenty to an optimal set of five sensors without compromising the system's ability to evaluate nutritional parameters like fat, proteins, and lactose. Techniques such as PCA and SVM ensured that the optimized system maintained its discrimination capacity, ensuring its ability to differentiate between various types of commercial milk based on their composition and their correlation with different physicochemical factors. This achievement represents a crucial step toward the industrial implementation of electronic tongues, reducing data redundancy and facilitating the integration of these devices into automated processes.

4. A bioelectronic tongue system with enhanced features was developed to predict the chemical properties of milk with previously unheard-of accuracy. Gold nanoparticles, mixed into the PVC matrix, significantly improved the potentiometric response of the sensors by increasing membrane potential and enhancing the systems detection efficiency. It was determined that higher AuNP concentrations, up to 10% m/m, produced the best electrochemical responses without further improvements in sensitivity beyond this concentration. These gold nanoparticles acted as amplifiers of electrochemical signals, promoting electron transfer and enhancing the electrocatalytic activity of immobilized enzymes. The synergistic effect between nanoparticles and enzymes (Galactose Oxidase, Lactate Dehydrogenase, and Urease) was clearly demonstrated by increased sensitivity and reduced detection limits in sensors with both modifications (AuNPs-Enzyme), compared to those with one (AuNPs/Enzyme) or no modifications, for key compounds in milk such as CaCl_2 , KCl, urea, lactic acid, and galactose.

The bioelectronic tongue developed was also successfully used to distinguish between different types of milk by principal component analysis (PCA) based on their nutritional content, achieving a classification capability over 95%. Furthermore, the system was able to predict density, acidity, %lactose, %protein, %fat, and dry matter achieving high correlation with coefficients above 0.99 and very low errors. The results show that SVM models constructed using the electronic tongue and physicochemical characteristics can be used to evaluate up to eight physicochemical factors at once, cutting down on analysis time. Additionally, it was demonstrated that employing ensemble methodologies allow us to enhance correlations between bioelectronic tongues original data and the physicochemical parameters obtained by traditional methods, increasing the devices efficacy, which would enable the successful implementation of these devices in new applications within the dairy industry.

5. It was possible to combine impedimetric biosensors to develop a bioelectronic tongue for milk sample analysis. Silver nanoparticles (AgNPs) significantly improved electron transfer on the electrode surface by reducing electron transfer resistance decreasing the impedance modulus. This behavior confirmed that immobilized nanoparticles facilitated electron transport, improving the system ability to detect key compounds in milk samples. Additionally, the combination of metal nanoparticles and enzymes once again showed significantly improved sensitivity and specificity towards compounds of interest such as glucose, galactose, lactose, urea, and triglycerides. The synergy between nanoparticles and enzymes induced an increase in catalytic activity, resulting in a decrease in impedance modulus and electron transfer resistance on sensor surfaces.

Atomic force microscopy also demonstrated the homogeneous distribution of silver nanoparticles on sensor surfaces, as well as increased surface roughness after enzyme immobilization, ensuring their presence on the sensor surface during electrochemical analyses.

Furthermore, it has been demonstrated that the use of equivalent circuits in bioelectronic tongue data processing is a more efficient option, reducing data dimensionality without losing discrimination or predictive capabilities. This approach provided more accurate results in multivariate analysis. PCA was able to discriminate between commercial milk samples (classical, calcium-enriched, and lactose-free) based on their nutritional composition and SVM predictive models had excellent correlations to commonly used chemical parameters in milk quality control. These results confirmed that the bioelectronic tongue system, along with the equivalent circuit-based data processing approach, provides greater predictive capability and accuracy in milk sample analysis compared to other approaches, making it a promising tool for routine dairy product analysis.

The final conclusions of this doctoral thesis, based on the objectives proposed, are as follows:

a) The electronic and bioelectronic tongues developed in this work have proven to be valid and reliable alternatives for milk sample analysis. The combination of electrochemical sensors (voltammetric, potentiometric, and impedimetric) with advanced data analysis techniques has enabled detailed milk characterization, validating their utility in industrial quality control, from adulteration detection to the prediction of physicochemical parameters.

b) The use of nanomaterials, especially metallic nanoparticles, has been shown to optimize the electrocatalytic response of the sensors, increasing sensitivity in detecting compounds of interest in milk. The integration of gold and silver nanoparticles resulted in improved electrochemical performance, achieving lower detection limits and more stable responses due to their ability to promote electron transfer on sensor surfaces.

c) Enzymatic biosensors were successfully implemented by covalently binding or entrapping enzymes on electrode surfaces, increasing the specificity of the sensors and allowing simultaneous detection of sugars, organic acids, and bases present in liquid milk. Moreover, the synergistic effect of enzymes and metallic nanomaterials was demonstrated, enhancing the electrocatalytic activity of enzymes.

d) The developed methodology enabled the analysis of UHT, pasteurized, and raw milk samples to establish analysis protocols that ensured highly reproducible results, minimizing the effect of sample processing on electrochemical analysis. Detection limits, sensitivity, and stability of the sensors were also evaluated, demonstrating the systems ability to analyze relevant species in milk.

e) The use of electronic tongues for detecting adulterations, such as dilution with water or mixing of goat and cow milk, was validated with high precision. The developed systems also enabled the evaluation of nutritional parameters such as protein, fat or lactose content, confirming their applicability in industries as a verifying technique of the authenticity and quality in dairy products.

f) Chemometric techniques, such as partial least squares regression, support vector machine regression, and principal component analysis, allowed effective discrimination of milk samples based on their nutritional composition, origin, freshness, and potential adulterations, as well as the development of regression models for predicting key physicochemical parameters in dairy control. Additionally, advanced multivariate analysis techniques such as genetic algorithms and ensemble methods have been shown to optimize electronic tongues by selecting sensors and improving classification or regression models.

4.2 Perspectivas futuras

Las lenguas electrónicas representan una de las herramientas más prometedoras para el análisis de calidad en diversas industrias alimentarias, incluyendo la industria láctea, que demanda soluciones cada vez más precisas, fiables y rápidas en el control de sus productos. A medida que esta tecnología continúa evolucionando, se prevé un futuro en el que será crucial el desarrollo de herramientas robustas, con capacidades analíticas cada vez más sofisticadas, que permitan realizar mediciones precisas de manera rápida y automatizada.

Uno de los principales retos que todavía hoy sigue vigente en el área de las lenguas electrónicas para su aplicación a nivel industrial, es la necesidad de disponer de mayor información sobre las interacciones entre los diferentes elementos que conforman estos dispositivos. Las lenguas electrónicas están compuestas por sensores que comprenden diferentes elementos sensibles de alta complejidad, que son los encargados de aportar selectividad a distintos tipos de compuestos presentes en las muestras. Los mecanismos de interacción entre estos elementos, sigue siendo un área que requiere investigación intensiva, ya que esta información es esencial para la optimización de estos componentes con objeto de mejorar la selectividad, sensibilidad y tiempo de respuesta de los sensores. En particular, una de las áreas que demanda mayor atención es el estudio de las interacciones que ocurren dentro de las matrices poliméricas de los sensores potenciométricos, los cuales han demostrado ser extremadamente útiles para la detección de una amplia gama de analitos en la industria láctea. En este sentido, dentro del grupo UVaSens en el cual se enmarca el desarrollo de esta tesis, se ha realizado un trabajo, actualmente en proceso de publicación, cuyo objetivo es determinar qué propiedades estructurales de los polímeros lipídicos favorecen o no la sensibilidad de los sensores y su estabilidad a lo largo del tiempo. Este estudio ha permitido identificar patrones estructurales que pueden ser aprovechados para diseñar sensores potenciométricos más eficientes en la detección de compuestos específicos presentes en la leche, con una mayor robustez y tiempos de vida útil más largos.

Por otra parte, existe un largo camino por recorrer en cuanto al uso de nanomateriales en la fabricación de sensores electroquímicos, lo que representa una de las áreas más prometedoras en el desarrollo de sistemas multisensoriales. Los nanomateriales, debido a sus propiedades únicas a nivel atómico y molecular, han permitido mejorar significativamente la sensibilidad y selectividad de sensores y biosensores. Además, su capacidad para interactuar con los analitos a nivel nanoscópico ofrece nuevas oportunidades de detección de compuestos en concentraciones extremadamente bajas, lo que es crucial en el control de los parámetros de la calidad de matrices complejas como la leche. A medida que la nanotecnología avanza, se espera que su implementación en la fabricación de sensores electroquímicos permita el desarrollo de dispositivos más compactos, eficientes y económicos, capaces de ser integrados en líneas de producción industriales para realizar análisis in-situ y en tiempo real.

El uso de biorreceptores de alta especificidad también está ganando importancia en el desarrollo de lenguas bioelectrónicas, especialmente en el caso de los aptámeros, que representan una de las innovaciones más relevantes en el campo de la biosensórica. Los aptámeros son secuencias cortas de ARN o ADN que pueden ser diseñadas para unirse a moléculas específicas con una afinidad extraordinaria, su facilidad de síntesis y modificación permite adaptarlos a una multitud de aplicaciones, incluyendo la industria láctea. Durante el primer periodo de estancia predoctoral de esta tesis doctoral realizado en la Sheffield Hallam University, se desarrolló una primera aproximación al diseño de biosensores impedimétricos basados en aptámeros para la cuantificación de aflatoxina M1 en leche cruda. Este proyecto, que actualmente se encuentra en su fase final de desarrollo, ha permitido abrir una nueva línea de investigación para el uso de aptámeros como biorreceptores en el análisis de contaminantes en la industria láctea, con resultados prometedores en términos de sensibilidad y especificidad para su aplicación en lenguas bioelectrónicas impedimétricas.

Otra tendencia que está ganando fuerza en el campo de las lenguas electrónicas es el desarrollo de sensores que emplean MIPs. Estos sensores ofrecen ventajas significativas para su aplicación en la industria, ya que permiten la creación de cavidades específicas dentro de la estructura del polímero, diseñadas para reconocer y captar selectivamente determinadas moléculas. Los polímeros de impresión molecular tienen la capacidad de replicar las propiedades de los anticuerpos y otros biorreceptores, pero con una mayor estabilidad y un menor coste de producción. Aunque el trabajo sobre polímeros de impresión molecular no forma parte central de esta tesis, cabe indicar que se ha desarrollado un sensor potenciométrico específico y sensible para la detección de lactosa en muestras de leche, utilizando polímeros de impresión molecular a base de polipirrol electropolimerizado. La caracterización y aplicación de este sensor han sido estudiadas en profundidad, y los resultados, actualmente en fase de publicación, abren nuevas posibilidades en la mejora de la precisión de los análisis de productos lácteos sin lactosa.

En este contexto, la presente tesis doctoral plantea el inicio de una investigación todavía más amplia orientada a desarrollar soluciones que respondan a los múltiples desafíos todavía vigentes hoy en día en la industria láctea. A través del desarrollo de nuevas tecnologías, el estudio de las interacciones moleculares y el uso de materiales avanzados, se espera mejorar la robustez, la selectividad y la durabilidad de las lenguas electrónicas y bioelectrónicas, lo que permitirá implementar estas herramientas de manera eficaz en entornos industriales. Además, la incorporación de nuevos biorreceptores y nanomateriales en el diseño de los sensores ofrece un futuro prometedor, con la posibilidad de desarrollar dispositivos cada vez más específicos y sensibles. Aunque aún queda un largo camino por recorrer, el trabajo realizado hasta el momento sugiere que las lenguas electrónicas tienen un potencial inmenso para transformar el análisis de calidad en la industria láctea, proporcionando soluciones rápidas, precisas y adaptadas a las necesidades cambiantes del mercado.

4.2. *Future perspectives*

Electronic tongues represent one of the most promising tools for quality analysis in various industries, including the dairy industry, which demands increasingly precise, fast, and reliable solutions for product control. As this technology continues to evolve, a future is envisioned where robust tools with increasingly sophisticated analytical capabilities will be crucial, allowing for accurate measurements in a fast and automated manner.

One of the main challenges foreseen in the application of electronic tongues in industry is the need to study in greater depth the interaction of the various elements that make up these devices. Electronic tongues consist of sensors that contain different complex sensitive elements, responsible for providing selectivity to different types of compounds present in the samples. The interaction mechanisms between these elements remain an area requiring intensive research, as optimizing these components is essential to improve the response time, selectivity and sensitivity of the sensors. In particular, one area that demands more attention is the study of interactions within the polymer matrices of potentiometric sensors, which have proven extremely useful for detecting a wide range of analytes in the dairy industry. In this regard, within the research group associated with this doctoral thesis, ongoing work is currently in the publication process. This research aims to determine which structural properties of lipid polymers favor or hinder the sensitivity and stability of sensors over time. This study has identified structural patterns that can be leveraged to design more efficient potentiometric sensors for detecting specific compounds in milk, with greater robustness and longer operational lifespans.

Additionally, there is a long road ahead in terms of using nanomaterials in the fabrication of electrochemical sensors, which represents one of the most promising areas in the development of multisensor systems. Nanomaterials, due to their unique properties at the atomic and molecular levels, have significantly improved the sensitivity and selectivity of sensors and biosensors. Furthermore, their ability to interact with analytes at the nanoscale opens up new opportunities for detecting compounds at extremely low concentrations, which is crucial in quality analysis of complex matrices like milk. As nanomaterial technology advances, it is expected that their implementation in the manufacture of electrochemical sensors will lead to the development of more compact, efficient, and cost-effective devices, capable of being integrated into industrial production lines for real-time analysis.

The use of highly specific bioreceptors is also gaining importance in the development of bioelectronic tongues, particularly with the rise of aptamers, which represent one of the most significant innovations in biosensing. Aptamers are short DNA or RNA sequences designed to bind to specific molecules with extraordinary affinity. Their easy synthesis and modification allow them to be adapted to a multitude of applications, including the dairy industry. During the initial phase of this doctoral thesis at Sheffield Hallam University, an initial approach was developed for designing impedimetric biosensors based on aptamers for

quantifying aflatoxin M1 in milk samples. This project, currently in its final stages of development, has opened a new line of research into the use of aptamers as bioreceptors in the detection of contaminants for dairy industry, showing promising results in terms of sensitivity and specificity for application in bioelectronic tongues.

Another growing trend in the field of electronic tongues is the development of sensors employing MIPs. These sensors offer significant advantages for industrial applications, as they allow the creation of specific cavities within the polymer structure, designed to selectively recognize and capture certain molecules. Molecularly imprinted polymers have the ability to replicate the properties of antibodies and other bioreceptors but with greater stability and lower production costs. Although the work on molecularly imprinted polymers is not a central focus of this thesis, it is important to note that a specific and sensitive potentiometric sensor has been built for lactose determination in raw milk samples, using electropolymerized polypyrrole-based molecularly imprinted polymers. The characterization and application of this sensor have been thoroughly studied, and the results, currently in the process of publication, open new possibilities for improving the accuracy of dairy analysis.

In this context, this doctoral thesis marks the beginning of even broader research aimed at developing solutions to address the challenges of dairy industry. Through the application of innovative technologies, the study of molecular interactions, and the utilization of advanced materials, it is expected to improve the robustness, selectivity, and durability of electronic and bioelectronic tongues, enabling the effective implementation of these tools in industrial environments. Additionally, the incorporation of new bioreceptors and nanomaterials into sensor design offers a promising future, with the potential to develop devices that are increasingly specific and sensitive. Although there is still a long way to go, the work carried out so far suggests that electronic tongues hold immense potential to transform quality analysis in the dairy industry, providing faster, more accurate solutions that are tailored to the ever-changing needs of the market.

Capítulo 5

Bibliografía

En este apartado de la tesis se presenta la recopilación de las referencias bibliográficas utilizadas a lo largo de la totalidad de este trabajo.

This section of the thesis presents the compilation of bibliographical references used throughout this work.

- [1] FAO, “Dairy Market Review: Overview of global dairy market development,” *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, no. April, 2021.
 - [2] FAO, “Dairy market review,” *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, no. April, 2020.
 - [3] S. Pages and I. Report, “Consumer Trends Analysis: Understanding Consumer Trends and Drivers of Behavior in the Spanish Dairy Food Market,” *PR Newswire*, no. October, 2014.
 - [4] Z. Bouamra-Mechemache, V. Réquillart, C. Soregaroli, and A. Trévisiol, “Demand for dairy products in the EU,” *Food Policy*, vol. 33, no. 6, 2008, doi: 10.1016/j.foodpol.2008.05.001.
 - [5] J. F. Mostert and P. J. Jooste, “Quality Control in the Dairy Industry,” in *Dairy Microbiology Handbook*, 2002. doi: 10.1002/0471723959.ch14.
 - [6] E. T. Ryser and J. L. Kornacki, “1. Standard Methods,” in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 18th edition*, 2024. doi: 10.2105/9780875533438ch01.
 - [7] F. Winquist, C. Krantz-Rülcker, and I. Lundström, “Electronic tongues,” *MRS Bull*, vol. 29, no. 10, 2004, doi: 10.1557/mrs2004.210.
 - [8] “‘Electronic tongue’ (All Fields) – 2,513 – Web of Science Core Collection.” Accessed: Oct. 24, 2024. [Online]. Available: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/summary/5741cf07-0b8a-439e-9566-0cb3734f26d0-0115e5353c/relevance/1>
 - [9] W. Wang and Y. Liu, “Electronic tongue for food sensory evaluation,” in *Evaluation Technologies for Food Quality*, 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-814217-2.00003-2.
 - [10] E. Demir, K. K. Kırboga, and M. Işık, “An overview of stability and lifetime of electrochemical biosensors,” in *Novel Nanostructured Materials for Electrochemical Biosensing Applications*, 2023. doi: 10.1016/B978-0-443-15334-1.00022-5.
 - [11] A. P. F. Turner, “Biosensors: Sense and sensibility,” *Chem Soc Rev*, vol. 42, no. 8, 2013, doi: 10.1039/c3cs35528d.
 - [12] Z. Hua, T. Yu, D. Liu, and Y. Xianyu, “Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection,” 2021. doi: 10.1016/j.bios.2021.113076.
 - [13] X. Cetó, S. Pérez, and B. Prieto-Simón, “Fundamentals and application of voltammetric electronic tongues in quantitative analysis,” 2022. doi: 10.1016/j.trac.2022.116765.
 - [14] L. G. Dias, A. M. Peres, T. P. Barcelos, J. Sá Morais, and A. A. S. C. MacHado, “Semi-quantitative and quantitative analysis of soft drinks using an electronic tongue,” in *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2011. doi: 10.1016/j.snb.2010.01.005.
-

- [15] Y. G. Vlasov, Y. E. Ermolenko, A. V. Legin, A. M. Rudnitskaya, and V. V. Kolodnikov, "Chemical sensors and their systems," *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 65, no. 9, 2010, doi: 10.1134/S1061934810090029.
- [16] M. L. Piana, L. Persano Oddo, A. Bentabol, E. Bruneau, S. Bogdanov, and C. Guyot Declerck, "Sensory analysis applied to honey: state of the art," *Apidologie*, vol. 35, no. Suppl. 1, 2004, doi: 10.1051/apido:2004048.
- [17] A. C. Noble and I. Lesschaeve, "Sensory analysis of food flavour," in *Flavour in Food*, 2006. doi: 10.1533/9781845691400.1.62.
- [18] K. Persaud, "Electronic Noses and Tongues in the Food Industry," in *Electronic Noses and Tongues in Food Science*, 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-800243-8.00001-9.
- [19] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, and A. D'Amico, "Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids: (IUPAC technical report)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 77, no. 11, 2005, doi: 10.1351/pac200577111965.
- [20] X. Cetó, A. González-Calabuig, J. Capdevila, A. Puig-Pujol, and M. Del Valle, "Instrumental measurement of wine sensory descriptors using a voltammetric electronic tongue," *Sens Actuators B Chem*, vol. 207, no. PB, 2015, doi: 10.1016/j.snb.2014.09.081.
- [21] Y. Zou, H. Wan, X. Zhang, H. Da, and P. Wang, "Electronic nose and electronic tongue," in *Bioinspired Smell and Taste Sensors*, 2015. doi: 10.1007/978-94-017-7333-1_2.
- [22] M. del Valle, "Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems," *International Journal of Electrochemistry*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/986025.
- [23] K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko, and K. Yamafuji, "Multichannel taste sensor using lipid membranes," *Sens Actuators B Chem*, vol. 2, no. 3, 1990, doi: 10.1016/0925-4005(90)85006-K.
- [24] F. Winquist, I. Lundström, and P. Wide, "Combination of an electronic tongue and an electronic nose," *Sens Actuators B Chem*, vol. 58, no. 1–3, 1999, doi: 10.1016/S0925-4005(99)00155-0.
- [25] B. Aouadi *et al.*, "Historical evolution and food control achievements of near infrared spectroscopy, electronic nose, and electronic tongue—critical overview," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 19, 2020, doi: 10.3390/s20195479.
- [26] A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, Y. Vlasov, C. Di Natale, and A. D'Amico, "Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: Recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception," *Anal Chim Acta*, vol. 484, no. 1, 2003, doi: 10.1016/S0003-2670(03)00301-5.
-

- [27] M. Pein *et al.*, “Independent comparison study of six different electronic tongues applied for pharmaceutical analysis,” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 114, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.05.026.
- [28] P. Wang, Q. Liu, Y. Xu, H. Cai, and Y. Li, “Olfactory and taste cell sensor and its applications in biomedicine,” *Sens Actuators A Phys*, vol. 139, no. 1-2 SPEC. ISS., 2007, doi: 10.1016/j.sna.2007.05.018.
- [29] Y. Vlasov, A. Legin, and A. Rudnitskaya, “Electronic tongues and their analytical application,” 2002. doi: 10.1007/s00216-002-1310-2.
- [30] L. Lu, Z. Hu, X. Hu, D. Li, and S. Tian, “Electronic tongue and electronic nose for food quality and safety,” 2022. doi: 10.1016/j.foodres.2022.112214.
- [31] P. Ciosek and W. Wróblewski, “Potentiometric electronic tongues for foodstuff and biosample recognition-an overview,” *Sensors*, vol. 11, no. 5, 2011, doi: 10.3390/s110504688.
- [32] H. Jiang, M. Zhang, B. Bhandari, and B. Adhikari, “Application of electronic tongue for fresh foods quality evaluation: A review,” 2018. doi: 10.1080/87559129.2018.1424184.
- [33] A. K. Jain, R. P. W. Duin, and J. Mao, “Statistical pattern recognition: A review,” *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 22, no. 1, 2000, doi: 10.1109/34.824819.
- [34] Q. Ouyang, J. Zhao, and Q. Chen, “Instrumental intelligent test of food sensory quality as mimic of human panel test combining multiple cross-perception sensors and data fusion,” *Anal Chim Acta*, vol. 841, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.06.001.
- [35] J. Tan and J. Xu, “Applications of electronic nose (e-nose) and electronic tongue (e-tongue) in food quality-related properties determination: A review,” 2020. doi: 10.1016/j.aiia.2020.06.003.
- [36] D. Tibaduiza *et al.*, “Electronic Tongues and Noses: A General Overview,” *Biosensors 2024, Vol. 14, Page 190*, vol. 14, no. 4, p. 190, Apr. 2024, doi: 10.3390/BIOS14040190.
- [37] M. del Valle, “Electronic tongues employing electrochemical sensors,” 2010. doi: 10.1002/elan.201000013.
- [38] M. T. Kalit, K. Marković, S. Kalit, N. Vahčić, and J. Havranek, “Application of electronic nose and electronic tongue in the dairy industry,” 2014. doi: 10.15567/mljekarstvo.2014.0402.
- [39] M. D. Ryan and J. Q. Chambers, “Dynamic Electrochemistry: Methodology and Application,” *Anal Chem*, vol. 64, no. 12, 1992, doi: 10.1021/ac00036a005.
- [40] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, “A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry,” *J Chem Educ*, vol. 95, no. 2, 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
-

- [41] K. Darowicki, J. Orlikowski, and A. Arutunow, "Dynamic electrochemical impedance spectroscopy measurements of passive layer cracking under static tensile stresses," *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 8, no. 6, 2004, doi: 10.1007/s10008-003-0470-0.
- [42] C. M. A. Brett, "Electrochemistry," *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.10742-5.
- [43] Y. San Francisco St Louis Bangkok Bogotá Caracas Lisbon London Madrid and D. Harvey, "Boston Burr Ridge, IL Dubuque, IA Madison, WI New Modern Analytical Chemistry," 2000, Accessed: Oct. 24, 2024. [Online]. Available: www.mhhe.com
- [44] L. K. Bieniasz, "Basic Assumptions and Equations of Electroanalytical Models," 2015. doi: 10.1007/978-3-662-44882-3_2.
- [45] T. Nishiumi, M. M. Abdul, and K. Aoki, "Determination of the number of electrons by chronoamperometry at small electrodes," *Electrochem commun*, vol. 7, no. 12, 2005, doi: 10.1016/j.elecom.2005.08.030.
- [46] X. Bo, J. C. Ndamanisha, J. Bai, and L. Guo, "Nonenzymatic amperometric sensor of hydrogen peroxide and glucose based on Pt nanoparticles/ordered mesoporous carbon nanocomposite," *Talanta*, vol. 82, no. 1, 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2010.03.063.
- [47] P. Bollella and L. Gorton, "Enzyme based amperometric biosensors," 2018. doi: 10.1016/j.coelec.2018.06.003.
- [48] R. J. Forster, "Kinetic separation of amperometric sensor responses," in *Analyst*, 1996. doi: 10.1039/an9962100733.
- [49] G. Alarcon-Angeles, G. A. Álvarez-Romero, and A. Merkoçi, "Electrochemical biosensors: Enzyme kinetics and role of nanomaterials," in *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.13477-8.
- [50] H. A. Saputra, "Electrochemical sensors: basic principles, engineering, and state of the art," 2023. doi: 10.1007/s00706-023-03113-z.
- [51] C. Batchelor-Mcauley, E. Kätelhön, E. O. Barnes, R. G. Compton, E. Laborda, and A. Molina, "Recent Advances in Voltammetry," *ChemistryOpen*, vol. 4, no. 3, 2015, doi: 10.1002/open.201500042.
- [52] V. D. Parker, "Chapter 3 Linear Sweep and Cyclic Voltammetry," *Comprehensive Chemical Kinetics*, vol. 26, no. C, 1986, doi: 10.1016/S0069-8040(08)70027-X.
- [53] S. Francis, E. P. Koshy, and B. Mathew, "Electroanalytical techniques: A tool for nanomaterial characterization," in *Design, Fabrication, and Characterization of Multifunctional Nanomaterials*, 2021. doi: 10.1016/B978-0-12-820558-7.00004-2.
-

- [54] M. Lovrić, “Square-wave voltammetry,” in *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, 2010. doi: 10.1007/978-3-642-02915-8_6.
- [55] F. Winqvist, P. Wide, and I. Lundström, “An electronic tongue based on voltammetry,” *Anal Chim Acta*, vol. 357, no. 1–2, 1997, doi: 10.1016/S0003-2670(97)00498-4.
- [56] A. M. Bond and R. D. Braun, “Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry,” *J Electrochem Soc*, vol. 127, no. 12, 1980, doi: 10.1149/1.2129594.
- [57] *Principles of Polarography*. 1965. doi: 10.1016/c2013-0-10851-3.
- [58] R. S. Nicholson and I. Shain, “Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems,” *Anal Chem*, vol. 36, no. 4, 1964, doi: 10.1021/ac60210a007.
- [59] J. Bobacka, A. Ivaska, and A. Lewenstam, “Potentiometric ion sensors,” 2008. doi: 10.1021/cr068100w.
- [60] E. Bakker, E. Pretsch, and P. Bühlmann, “Selectivity of potentiometric ion sensors,” 2000. doi: 10.1021/ac991146n.
- [61] K. C. Honeychurch, “Printed thick-film biosensors,” in *Printed Films: Materials Science and Applications in Sensors, Electronics and Photonics*, 2012. doi: 10.1533/9780857096210.2.366.
- [62] L. Escuder-Gilabert and M. Peris, “Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis,” 2010. doi: 10.1016/j.aca.2010.03.017.
- [63] L. G. Dias, A. Fernandes, A. C. A. Veloso, A. A. S. C. Machado, J. A. Pereira, and A. M. Peres, “Single-cultivar extra virgin olive oil classification using a potentiometric electronic tongue,” *Food Chem*, vol. 160, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.072.
- [64] I. Escriche, M. Kadar, E. Domenech, and L. Gil-Sánchez, “A potentiometric electronic tongue for the discrimination of honey according to the botanical origin. Comparison with traditional methodologies: Physicochemical parameters and volatile profile,” *J Food Eng*, vol. 109, no. 3, 2012, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.036.
- [65] E. W. Nery and L. T. Kubota, “Integrated, paper-based potentiometric electronic tongue for the analysis of beer and wine,” *Anal Chim Acta*, vol. 918, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.03.004.
- [66] S. Pettinelli, C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Mencarelli, C. Garcia-Cabezón, and M. L. Rodríguez-Mendez, “High-performance bioelectronic tongue for the simultaneous analysis of phenols, sugars and organic acids in wines,” *J Sci Food Agric*, 2023, doi: 10.1002/jsfa.13174.
- [67] V. da C. Arca, A. M. Peres, A. A. S. C. Machado, E. Bona, and L. G. Dias, “Sugars’ quantifications using a potentiometric electronic tongue with cross-selective sensors:
-

- Influence of an ionic background,” *Chemosensors*, vol. 7, no. 3, 2019, doi: 10.3390/chemosensors7030043.
- [68] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, “Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics,” *Chem Rev*, vol. 97, no. 8, 1997, doi: 10.1021/cr940394a.
- [69] T. V. Moreno *et al.*, “Potentiometric sensors with chalcogenide glasses as sensitive membranes: A short review,” *J Non Cryst Solids*, vol. 495, 2018, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2018.04.057.
- [70] M. Cuartero and G. A. Crespo, “All-solid-state potentiometric sensors: A new wave for in situ aquatic research,” 2018. doi: 10.1016/j.coelec.2018.04.004.
- [71] H. A. Zamani and F. Faridbod, “Liquid membrane potentiometric sensor for determination of Fe³⁺ ion,” *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 69, no. 11, 2014, doi: 10.1134/S1061934814110069.
- [72] H. S. Yim *et al.*, “Polymer membrane-based ion-, gas- and bio-selective potentiometric sensors,” *Biosens Bioelectron*, vol. 8, no. 1, 1993, doi: 10.1016/0956-5663(93)80041-M.
- [73] H. Kaden, H. Jahn, and M. Berthold, “Study of the glass/polypyrrole interface in an all-solid-state pH sensor,” in *Solid State Ionics*, 2004. doi: 10.1016/S0167-2738(03)00216-9.
- [74] M. Cuartero, M. Parrilla, and G. A. Crespo, “Wearable potentiometric sensors for medical applications,” 2019. doi: 10.3390/s19020363.
- [75] F. Faridbod, M. R. Ganjali, R. Dinarvand, and P. Norouzi, “Developments in the field of conducting and non-conducting polymer based potentiometric membrane sensors for ions over the past decade,” 2008. doi: 10.3390/s8042331.
- [76] C. Carey, “Plasticizer effects in the PVC membrane of the dibasic phosphate selective electrode,” *Chemosensors*, vol. 3, no. 4, 2015, doi: 10.3390/chemosensors3040284.
- [77] G. J. Moody, R. B. Oke, and J. D. R. Thomas, “A calcium-sensitive electrode based on a liquid ion exchanger in a poly(vinyl chloride) matrix,” *Analyst*, vol. 95, no. 1136, 1970, doi: 10.1039/an9709500910.
- [78] I. S. Muratova, L. A. Kartsova, and K. N. Mikhelson, “Voltammetric vs. potentiometric sensing of dopamine: Advantages and disadvantages, novel cell designs, fundamental limitations and promising options,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 207, no. PB, 2015, doi: 10.1016/j.snb.2014.07.034.
- [79] M. Parrilla, M. Cuartero, and G. A. Crespo, “Wearable potentiometric ion sensors,” 2019. doi: 10.1016/j.trac.2018.11.024.
- [80] J. Ding and W. Qin, “Recent advances in potentiometric biosensors,” 2020. doi: 10.1016/j.trac.2019.115803.
-

- [81] S. Brosel-Oliu, N. Uria, N. Abramova, and A. Bratov, "Impedimetric Sensors for Bacteria Detection," in *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*, 2015. doi: 10.5772/60741.
- [82] A. C. Lazanas and M. I. Prodromidis, "Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial," 2023. doi: 10.1021/acsmesuresciau.2c00070.
- [83] S. Wang, J. Zhang, O. Gharbi, V. Vivier, M. Gao, and M. E. Orazem, "Electrochemical impedance spectroscopy," 2021. doi: 10.1038/s43586-021-00039-w.
- [84] M. I. Prodromidis, "Impedimetric immunosensors-A review," 2010. doi: 10.1016/j.electacta.2009.01.081.
- [85] J. S. Park *et al.*, "Multi-parametric cell profiling with a CMOS quad-modality cellular interfacing array for label-free fully automated drug screening," *Lab Chip*, vol. 18, no. 19, 2018, doi: 10.1039/c8lc00156a.
- [86] Z. O. Uygun and H. D. Ertuğrul Uygun, "A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors," *Sens Actuators B Chem*, vol. 202, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.05.029.
- [87] J. S. Daniels and N. Pourmand, "Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges," 2007. doi: 10.1002/elan.200603855.
- [88] A. Riul, R. R. Malmegrim, F. J. Fonseca, and L. H. C. Mattoso, "An artificial taste sensor based on conducting polymers," *Biosens Bioelectron*, vol. 18, no. 11, 2003, doi: 10.1016/S0956-5663(03)00069-1.
- [89] Y. Wang, J. Ping, Z. Ye, J. Wu, and Y. Ying, "Impedimetric immunosensor based on gold nanoparticles modified graphene paper for label-free detection of Escherichia coli O157: H7," *Biosens Bioelectron*, vol. 49, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.05.061.
- [90] K. B. R. Teodoro, F. M. Shimizu, V. P. Scagion, and D. S. Correa, "Ternary nanocomposites based on cellulose nanowhiskers, silver nanoparticles and electrospun nanofibers: Use in an electronic tongue for heavy metal detection," *Sens Actuators B Chem*, vol. 290, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.03.125.
- [91] W. A. Christinelli *et al.*, "Two-dimensional MoS₂-based impedimetric electronic tongue for the discrimination of endocrine disrupting chemicals using machine learning," *Sens Actuators B Chem*, vol. 336, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.129696.
- [92] C. Garcia-Hernandez, C. Salvo Comino, F. Martín-Pedrosa, M. L. Rodríguez-Mendez, and C. Garcia-Cabezón, "Impedimetric electronic tongue based on nanocomposites for the analysis of red wines. Improving the variable selection method," *Sens Actuators B Chem*, vol. 277, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.09.023.
-

- [93] K. Nemčėková and J. Labuda, "Advanced materials-integrated electrochemical sensors as promising medical diagnostics tools: A review," 2021. doi: 10.1016/j.msec.2020.111751.
- [94] R. Singh, R. Gupta, D. Bansal, R. Bhateria, and M. Sharma, "A Review on Recent Trends and Future Developments in Electrochemical Sensing," 2023. doi: 10.1021/acsomega.3c08060.
- [95] T. Yin and W. Qin, "Applications of nanomaterials in potentiometric sensors," 2013. doi: 10.1016/j.trac.2013.06.009.
- [96] P. L. Padnya, A. V. Porfireva, G. A. Evtugyn, and I. I. Stoikov, "Solid contact potentiometric sensors based on a new class of ionic liquids on thiacalixarene platform," *Front Chem*, vol. 6, no. NOV, 2018, doi: 10.3389/fchem.2018.00594.
- [97] M. Josowicz, "Applications of conducting polymers in potentiometric sensors," *Analyst*, vol. 120, no. 4, 1995, doi: 10.1039/an9952001019.
- [98] A. Mahmoud, M. Echabaane, K. Omri, L. El Mir, and R. Ben Chaabane, "Development of an impedimetric non enzymatic sensor based on ZnO and Cu doped ZnO nanoparticles for the detection of glucose," *J Alloys Compd*, vol. 786, 2019, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.02.060.
- [99] B. J. Brownlee, J. C. Claussen, and B. D. Iverson, "3D interdigitated vertically aligned carbon nanotube electrodes for electrochemical impedimetric biosensing," *ACS Appl Nano Mater*, vol. 3, no. 10, 2020, doi: 10.1021/acsanm.0c02121.
- [100] M. A. Ali *et al.*, "Microfluidic impedimetric sensor for soil nitrate detection using graphene oxide and conductive nanofibers enabled sensing interface," *Sens Actuators B Chem*, vol. 239, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.09.101.
- [101] A. Baghizadeh, H. Karimi-Maleh, Z. Khoshnama, A. Hassankhani, and M. Abbasghorbani, "A Voltammetric Sensor for Simultaneous Determination of Vitamin C and Vitamin B6 in Food Samples Using ZrO₂ Nanoparticle/Ionic Liquids Carbon Paste Electrode," *Food Anal Methods*, vol. 8, no. 3, 2015, doi: 10.1007/s12161-014-9926-3.
- [102] C. C. Harley, V. Annibaldi, T. Yu, and C. B. Breslin, "The selective electrochemical sensing of dopamine at a polypyrrole film doped with an anionic β -cyclodextrin," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 855, 2019, doi: 10.1016/j.jelechem.2019.113614.
- [103] D. Akyüz and A. Koca, "An electrochemical sensor for the detection of pesticides based on the hybrid of manganese phthalocyanine and polyaniline," *Sens Actuators B Chem*, vol. 283, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2018.11.155.
- [104] H. Karimi-Maleh, K. Ahanjan, M. Taghavi, and M. Ghaemy, "A novel voltammetric sensor employing zinc oxide nanoparticles and a new ferrocene-derivative modified
-

- carbon paste electrode for determination of captopril in drug samples,” *Analytical Methods*, vol. 8, no. 8, 2016, doi: 10.1039/c5ay03284a.
- [105] M. Zahran, Z. Khalifa, M. A. H. Zahran, and M. Abdel Azzem, “Recent advances in silver nanoparticle-based electrochemical sensors for determining organic pollutants in water: A review,” 2021. doi: 10.1039/d1ma00769f.
- [106] D. O. Perevezentseva, A. V. Korshunov, E. V. Gorchakov, V. I. Bimatov, and I. E. Phedorov, “Au-nanoparticles based sensors for voltammetric determination of glutathione,” *Curr Anal Chem*, vol. 13, no. 3, 2017, doi: 10.2174/1573411012666160606175735.
- [107] F. Faridbod and A. Shafaat, “Ionic liquids based polymeric membrane drug sensors,” 2017. doi: 10.2174/1573411012666160601150123.
- [108] E. Jaworska, M. Gniadek, K. Maksymiuk, and A. Michalska, “Polypyrrole Nanoparticles Based Disposable Potentiometric Sensors,” *Electroanalysis*, vol. 29, no. 12, 2017, doi: 10.1002/elan.201700441.
- [109] F. Faridbod, A. Shafaat, and M. R. Ganjali, “Conducting polymer all solid state potentiometric sensor for the tramadol assay,” *Int J Electrochem Sci*, vol. 11, no. 12, 2016, doi: 10.20964/2016.12.37.
- [110] S. S. M. Hassan, A. H. Kamel, A. E. G. E. Amr, H. S. M. Abd-Rabboh, M. A. Al-Omar, and E. A. Elsayed, “A New Validated Potentiometric Method for Sulfite Assay in Beverages Using Cobalt(II) Phthalocyanine as a Sensory Recognition Element,” *Molecules*, vol. 25, no. 13, 2020, doi: 10.3390/molecules25133076.
- [111] T. A. Ali, G. G. Mohamed, and A. R. Othman, “Design and Construction of New Potentiometric Sensors for Determination of Copper(II) Ion Based on Copper Oxide Nanoparticles,” *Int J Electrochem Sci*, vol. 10, no. 10, pp. 8041–8057, Oct. 2015, doi: 10.1016/S1452-3981(23)11075-3.
- [112] B. Paczosa-Bator, R. Piech, C. Wardak, and L. Cabaj, “Application of graphene supporting platinum nanoparticles layer in electrochemical sensors with potentiometric and voltammetric detection,” *Ionics (Kiel)*, vol. 24, no. 8, 2018, doi: 10.1007/s11581-017-2356-7.
- [113] J. C. Chou *et al.*, “Novel Potentiometric Non-Enzymatic Ascorbic Acid Sensor Based on Molybdenum Oxide Film and Copper Nanoparticles,” *IEEE Sens J*, vol. 22, no. 1, 2022, doi: 10.1109/JSEN.2021.3128941.
- [114] S. Lyudmyla, Z. Olena, A. Valentyna, and D. Sergiy, “Potentiometric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles,” *Applied Nanoscience (Switzerland)*, vol. 13, no. 7, 2023, doi: 10.1007/s13204-022-02715-z.
-

- [115] S. Upasham *et al.*, “Electrochemical impedimetric biosensors, featuring the use of Room Temperature Ionic Liquids (RTILs): Special focus on non-faradaic sensing,” *Biosens Bioelectron*, vol. 177, 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112940.
- [116] L. Wang, W. Zhang, S. Samavat, D. Deganello, and K. S. Teng, “Vertically aligned graphene prepared by photonic annealing for ultrasensitive biosensors,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 12, no. 31, 2020, doi: 10.1021/acsami.0c08036.
- [117] H. J. Nogueira Pedroza Dias Mello and M. Mulato, “Impedimetric and Capacitive Transducer Platform for Chemical Sensors Based on Electrodeposited Polyaniline Thin Films,” *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 126, no. 29, 2022, doi: 10.1021/acs.jpcc.2c02736.
- [118] C. B. A. Hassine, H. Kahri, and H. Barhoumi, “A novel impedimetric sensor based on CuO(NPs)/polyaniline/murexide composite for cholesterol detection,” *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 19, no. 5, 2022, doi: 10.1007/s13738-021-02404-8.
- [119] F. Zina, N. M. Nooredeen, S. Azzouzi, M. Ben Ali, M. N. Abbas, and A. Errachid, “Novel Sensitive Impedimetric Microsensor for Phosphate Detection Based on a Novel Copper Phthalocyanine Derivative,” *Anal Lett*, vol. 51, no. 3, 2018, doi: 10.1080/00032719.2017.1322096.
- [120] F. Selimoğlu *et al.*, “Silver nanoparticle doped graphene-based impedimetric biosensor towards sensitive detection of procalcitonin,” *Mater Chem Phys*, vol. 297, 2023, doi: 10.1016/j.matchemphys.2023.127339.
- [121] P. Jolly *et al.*, “Self-assembled gold nanoparticles for impedimetric and amperometric detection of a prostate cancer biomarker,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 251, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.05.040.
- [122] D. Wei and A. Ivaska, “Applications of ionic liquids in electrochemical sensors,” 2008. doi: 10.1016/j.aca.2007.12.011.
- [123] R. Hagiwara and Y. Ito, “Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions,” 2000. doi: 10.1016/S0022-1139(99)00267-5.
- [124] N. Kashyap, S. Paul, D. Bhusan Bora, S. Kalita, and R. Borah, “Dual functional behaviour of dicationic ionic liquid as extractant and hydrophobic biphasic solvent for extraction of Pb(II) in water,” *J Mol Liq*, vol. 392, 2023, doi: 10.1016/j.molliq.2023.123521.
- [125] E. Demir, H. Silah, and B. Uslu, “Phthalocyanine Modified Electrodes in Electrochemical Analysis,” 2022. doi: 10.1080/10408347.2020.1806702.
- [126] Mounesh and K. R. V. Reddy, “Detection of Nanomolar Concentrations H₂O₂ Using Cobalt (II) Phthalocyanine Modified GCE with MWCNTs,” *Analytical Chemistry Letters*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.1080/22297928.2020.1745683.
-

- [127] P. Alessio, C. S. Martin, J. A. De Saja, and M. L. Rodriguez-Mendez, "Mimetic biosensors composed by layer-by-layer films of phospholipid, phthalocyanine and silver nanoparticles to polyphenol detection," *Sens Actuators B Chem*, vol. 233, 2016, doi: 10.1016/j.snb.2016.04.139.
- [128] P. Lei, Y. Zhou, R. Zhu, Y. Liu, C. Dong, and S. Shuang, "Facile synthesis of iron phthalocyanine functionalized N,B-doped reduced graphene oxide nanocomposites and sensitive electrochemical detection for glutathione," *Sens Actuators B Chem*, vol. 297, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.126756.
- [129] P. GREGORY, "Industrial applications of phthalocyanines," *J Porphyr Phthalocyanines*, vol. 04, no. 04, 2000, doi: 10.1002/(sici)1099-1409(200006/07)4:4<432::aid-jpp254>3.0.co;2-n.
- [130] A. Günsel, A. T. Bilgiçli, B. Tüzün, H. Pişkin, M. N. Yarasir, and B. Gündüz, "Optoelectronic parameters of peripherally tetra-substituted copper(ii) phthalocyanines and fabrication of a photoconductive diode for various conditions," *New Journal of Chemistry*, vol. 44, no. 2, 2019, doi: 10.1039/c9nj05287a.
- [131] A. Koca, A. R. Özkaya, M. Selçukoğlu, and E. Hamuryudan, "Electrochemical and spectroelectrochemical characterization of the phthalocyanines with pentafluorobenzoyloxy substituents," *Electrochim Acta*, vol. 52, no. 7, 2007, doi: 10.1016/j.electacta.2006.09.025.
- [132] C. Garcia-Hernandez *et al.*, "An electrochemical quartz crystal microbalance multisensor system based on phthalocyanine nanostructured films: Discrimination of musts," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 11, 2015, doi: 10.3390/s151129233.
- [133] E. Zampetti, S. Pantalei, A. Macagnano, E. Proietti, C. Di Natale, and A. D'Amico, "Use of a multiplexed oscillator in a miniaturized electronic nose based on a multichannel quartz crystal microbalance," *Sens Actuators B Chem*, vol. 131, no. 1, 2008, doi: 10.1016/j.snb.2007.12.011.
- [134] M. El Rhazi, S. Majid, M. Elbasri, F. E. Salih, L. Oularbi, and K. Lafdi, "Recent progress in nanocomposites based on conducting polymer: application as electrochemical sensors," *Int Nano Lett*, vol. 8, no. 2, 2018, doi: 10.1007/s40089-018-0238-2.
- [135] C. S. Inagaki, M. M. Oliveira, and A. J. G. Zarbin, "Direct and one-step synthesis of polythiophene/gold nanoparticles thin films through liquid/liquid interfacial polymerization," *J Colloid Interface Sci*, vol. 516, 2018, doi: 10.1016/j.jcis.2018.01.076.
- [136] A. John, L. Benny, A. R. Cherian, S. Y. Narahari, A. Varghese, and G. Hegde, "Electrochemical sensors using conducting polymer/noble metal nanoparticle nanocomposites for the detection of various analytes: a review," 2021. doi: 10.1007/s40097-020-00372-8.
-

- [137] Z. H. Jin, Y. L. Liu, J. J. Chen, S. L. Cai, J. Q. Xu, and W. H. Huang, "Conductive Polymer-Coated Carbon Nanotubes to Construct Stretchable and Transparent Electrochemical Sensors," *Anal Chem*, vol. 89, no. 3, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04616.
- [138] A. Liu, I. Honma, and H. Zhou, "Simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid at their physiological level in the presence of ascorbic acid using poly(acrylic acid)-multiwalled carbon-nanotube composite-covered glassy-carbon electrode," *Biosens Bioelectron*, vol. 23, no. 1, 2007, doi: 10.1016/j.bios.2007.03.019.
- [139] Y. Liu and S. Kumar, "Polymer/carbon nanotube nano composite fibers-A review," in *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2014. doi: 10.1021/am405136s.
- [140] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, and Y. Lin, "Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures," 2015. doi: 10.1021/ac5039863.
- [141] W. Q. Lim and Z. Gao, "Metal Oxide Nanoparticles in Electroanalysis," 2015. doi: 10.1002/elan.201500024.
- [142] E. Fazio *et al.*, "Metal-oxide based nanomaterials: Synthesis, characterization and their applications in electrical and electrochemical sensors," 2021. doi: 10.3390/s21072494.
- [143] R. Ding, Y. H. Cheong, A. Ahamed, and G. Lisak, "Heavy Metals Detection with Paper-Based Electrochemical Sensors," *Anal Chem*, vol. 93, no. 4, 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.0c04247.
- [144] N. Lavanya *et al.*, "Simultaneous electrochemical determination of epinephrine and uric acid in the presence of ascorbic acid using SnO₂/graphene nanocomposite modified glassy carbon electrode," *Sens Actuators B Chem*, vol. 221, 2015, doi: 10.1016/j.snb.2015.08.020.
- [145] C. Garcia-Hernandez *et al.*, "Monitoring the phenolic ripening of red grapes using a multisensor system based on metal-oxide nanoparticles," *Front Chem*, vol. 6, no. APR, 2018, doi: 10.3389/fchem.2018.00131.
- [146] S. Abalde-Cela, S. Carregal-Romero, J. P. Coelho, and A. Guerrero-Martínez, "Recent progress on colloidal metal nanoparticles as signal enhancers in nanosensing," 2016. doi: 10.1016/j.cis.2015.05.002.
- [147] T. Xiao, J. Huang, D. Wang, T. Meng, and X. Yang, "Au and Au-Based nanomaterials: Synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications," 2020. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120210.
- [148] H. Shu, L. Cao, G. Chang, H. He, Y. Zhang, and Y. He, "Direct electrodeposition of gold nanostructures onto glassy carbon electrodes for non-enzymatic detection of glucose," *Electrochim Acta*, vol. 132, 2014, doi: 10.1016/j.electacta.2014.04.031.
-

- [149] Z. Lu, J. Zhang, W. Dai, X. Lin, J. Ye, and J. Ye, "A screen-printed carbon electrode modified with a bismuth film and gold nanoparticles for simultaneous stripping voltammetric determination of Zn(II), Pb(II) and Cu(II)," *Microchimica Acta*, vol. 184, no. 12, 2017, doi: 10.1007/s00604-017-2521-8.
- [150] S. L. Ting, S. J. Ee, A. Ananthanarayanan, K. C. Leong, and P. Chen, "Graphene quantum dots functionalized gold nanoparticles for sensitive electrochemical detection of heavy metal ions," *Electrochim Acta*, vol. 172, 2015, doi: 10.1016/j.electacta.2015.01.026.
- [151] S. Xu *et al.*, "Silver Nanoparticle-Enzyme Composite Films for Hydrogen Peroxide Detection," *ACS Appl Nano Mater*, vol. 2, no. 9, 2019, doi: 10.1021/acsanm.9b01346.
- [152] E. Hutter and D. Maysinger, "Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity," 2013. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.002.
- [153] J. E. Gagner, M. D. Lopez, J. S. Dordick, and R. W. Siegel, "Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function," *Biomaterials*, vol. 32, no. 29, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.091.
- [154] A. P. F. Turner, "Biosensors: Fundamentals and applications - Historic book now open access," 2015. doi: 10.1016/j.bios.2014.10.027.
- [155] D. R. Thvenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 71, no. 12, 1999, doi: 10.1351/pac199971122333.
- [156] L. C. Clark and C. Lyons, "ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 102, no. 1, 1962, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [157] M. Son and T. H. Park, "The bioelectronic nose and tongue using olfactory and taste receptors: Analytical tools for food quality and safety assessment," 2018. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.017.
- [158] S. N. Jha, *Nondestructive evaluation of food quality: Theory and practice*. 2010. doi: 10.1007/978-3-642-15796-7.
- [159] E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, "Biosensor technologies for analyses of food contaminants," in *Nanobiosensors*, 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-804301-1.00008-4.
- [160] J. Wang, "Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges," 2001. doi: 10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23.
- [161] A. A. Ali, A. B. Altemimi, N. Alhelfi, and S. A. Ibrahim, "Application of biosensors for detection of pathogenic food bacteria: A review," 2020. doi: 10.3390/BIOS10060058.
-

- [162] N. Chauhan, J. Narang, and U. Jain, "Amperometric acetylcholinesterase biosensor for pesticides monitoring utilising iron oxide nanoparticles and poly(indole-5-carboxylic acid)," *J Exp Nanosci*, vol. 11, no. 2, 2016, doi: 10.1080/17458080.2015.1030712.
- [163] U. B. Trivedi *et al.*, "Potentiometric biosensor for urea determination in milk," *Sens Actuators B Chem*, vol. 140, no. 1, 2009, doi: 10.1016/j.snb.2009.04.022.
- [164] J. A. Preuß, P. Reich, N. Bahner, and J. Bahnemann, "Impedimetric aptamer-based biosensors: Applications," in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 174, 2020. doi: 10.1007/10_2020_125.
- [165] S. Sharma, H. Byrne, and R. J. O'Kennedy, "Antibodies and antibody-derived analytical biosensors," *Essays Biochem*, vol. 60, no. 1, 2016, doi: 10.1042/EBC20150002.
- [166] B. Sequeira-Antunes and H. A. Ferreira, "Nucleic Acid Aptamer-Based Biosensors: A Review," 2023. doi: 10.3390/biomedicines11123201.
- [167] A. Mehlhorn, P. Rahimi, and Y. Joseph, "Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review," 2018. doi: 10.3390/bios8020054.
- [168] C. Karunakaran, T. Madasamy, and N. K. Sathy, "Enzymatic Biosensors," in *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-803100-1.00003-7.
- [169] P. D'Orazio, "Biosensors in clinical chemistry," 2003. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00241-9.
- [170] J. Wang, "Electrochemical glucose biosensors," 2008. doi: 10.1021/cr068123a.
- [171] G. S. Wilson and R. Gifford, "Biosensors for real-time in vivo measurements," 2005. doi: 10.1016/j.bios.2004.12.003.
- [172] S. K. Arya, M. Datta, and B. D. Malhotra, "Recent advances in cholesterol biosensor," *Biosens Bioelectron*, vol. 23, no. 7, 2008, doi: 10.1016/j.bios.2007.10.018.
- [173] C. S. Pundir, V. Narwal, and B. Batra, "Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review," 2016. doi: 10.1016/j.bios.2016.07.076.
- [174] Z. Taleat, A. Khoshroo, and M. Mazloum-Ardakani, "Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013)," 2014. doi: 10.1007/s00604-014-1181-1.
- [175] S. Andreescu and J. L. Marty, "Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications," 2006. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.01.001.
- [176] S. D. Wijayanti, L. Tsvik, and D. Haltrich, "Recent Advances in Electrochemical Enzyme-Based Biosensors for Food and Beverage Analysis," 2023. doi: 10.3390/foods12183355.
-

- [177] A. Mulchandani and K. Rogers, *Enzyme and Microbial Biosensors*. 1998. doi: 10.1385/0896034100.
- [178] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques," 2007. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
- [179] S. D. Minter, Ed., "Enzyme Stabilization and Immobilization," vol. 1504, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6499-4.
- [180] E. Katchalski-Katzir, "Immobilized enzymes - learning from past successes and failures," 1993. doi: 10.1016/0167-7799(93)90080-S.
- [181] H. H. Nguyen, S. H. Lee, U. J. Lee, C. D. Fermin, and M. Kim, "Immobilized enzymes in biosensor applications," 2019. doi: 10.3390/ma12010121.
- [182] H. H. Nguyen and M. Kim, "An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization," *Applied Science and Convergence Technology*, vol. 26, no. 6, 2017, doi: 10.5757/asct.2017.26.6.157.
- [183] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, and R. A. Wahab, "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes," 2015. doi: 10.1080/13102818.2015.1008192.
- [184] R. Karunakaran and M. Keskin, "Biosensors: Components, mechanisms, and applications," in *Analytical Techniques in Biosciences: from Basics to Applications*, 2022. doi: 10.1016/B978-0-12-822654-4.00011-7.
- [185] M. G. Lionetto, R. Caricato, A. Calisi, M. E. Giordano, and T. Schettino, "Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives," 2013. doi: 10.1155/2013/321213.
- [186] O. Gursoy, S. Sen Gursoy, S. Cogal, and G. Celik Cogal, "Development of a new two-enzyme biosensor based on poly(pyrrole-co-3,4-ethylenedioxythiophene) for lactose determination in milk," *Polym Eng Sci*, vol. 58, no. 6, pp. 839–848, Jun. 2018, doi: 10.1002/pen.24632.
- [187] J. Ahlawat, V. Aggarwal, R. Jaiwal, and C. S. Pundir, "An Improved Amperometric Lactose Biosensor Based on Enzyme Nanoparticles," *Int J Appl Sci Biotechnol*, vol. 10, no. 1, 2022, doi: 10.3126/ijasbt.v10i1.44155.
- [188] A. R. de Brito *et al.*, "Application of the electrochemical biosensor in the detection of lactose in skimmed milk," *Surfaces and Interfaces*, vol. 22, 2021, doi: 10.1016/j.surfin.2020.100839.
- [189] X. Zhang, Q. Guo, and D. Cui, "Recent advances in nanotechnology applied to biosensors," 2009. doi: 10.3390/s90201033.
-

- [190] M. Ramesh, R. Janani, C. Deepa, and L. Rajeshkumar, "Nanotechnology-Enabled Biosensors: A Review of Fundamentals, Design Principles, Materials, and Applications," 2023. doi: 10.3390/bios13010040.
- [191] J. J. Belbruno, "Molecularly Imprinted Polymers," Jan. 09, 2019, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00171.
- [192] J. Wackerlig and R. Schirhagl, "Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review," 2016. doi: 10.1021/acs.analchem.5b03804.
- [193] C. C. Villa, L. T. Sánchez, G. A. Valencia, S. Ahmed, and T. J. Gutiérrez, "Molecularly imprinted polymers for food applications: A review," 2021. doi: 10.1016/j.tifs.2021.03.003.
- [194] C. J. Allender, C. Richardson, B. Woodhouse, C. M. Heard, and K. R. Brain, "Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers," *Int J Pharm*, vol. 195, no. 1–2, 2000, doi: 10.1016/S0378-5173(99)00355-5.
- [195] J. S. Lee, A. N. Cho, Y. Jin, J. Kim, S. Kim, and S. W. Cho, "Bio-artificial tongue with tongue extracellular matrix and primary taste cells," *Biomaterials*, vol. 151, 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.019.
- [196] J. Wang *et al.*, "A bioelectronic taste sensor based on bioengineered *Escherichia coli* cells combined with ITO-constructed electrochemical sensors," *Anal Chim Acta*, vol. 1079, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.06.023.
- [197] T. Zhao *et al.*, "Self-powered gustation electronic skin for mimicking taste buds based on piezoelectric-enzymatic reaction coupling process," *Nanotechnology*, vol. 29, no. 7, 2018, doi: 10.1088/1361-6528/aaa2b9.
- [198] C. Garcia-Hernandez, C. Garcia-Cabezon, F. Martin-Pedrosa, and M. L. Rodriguez-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*, vol. 289, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.107.
- [199] A. Herrera-Chacon, A. González-Calabuig, I. Campos, and M. del Valle, "Bioelectronic tongue using MIP sensors for the resolution of volatile phenolic compounds," *Sens Actuators B Chem*, vol. 258, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.11.136.
- [200] E. Tønning *et al.*, "Chemometric exploration of an amperometric biosensor array for fast determination of wastewater quality," *Biosens Bioelectron*, vol. 21, no. 4, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.12.023.
- [201] N. S. Rajput, R. R. Das, V. N. Mishra, K. P. Singh, and R. Dwivedi, "A fully neural implementation of unitary response model for classification of gases/odors using the responses of thick film gas sensor array," *Sens Actuators B Chem*, vol. 155, no. 2, 2011, doi: 10.1016/j.snb.2011.01.043.
-

- [202] H. Wang, G. Zhao, Y. Yin, Z. Wang, and G. Liu, "Screen-printed electrode modified by bismuth /Fe₃O₄ nanoparticle/ionic liquid composite using internal standard normalization for accurate determination of Cd(II) in soil," *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 1, 2018, doi: 10.3390/s18010006.
- [203] D. J. Strike, M. G. H. Meijerink, and M. Koudelka-Hep, "Electronic noses - A mini-review," 1999. doi: 10.1007/s002160051375.
- [204] X. Zhao, P. Li, K. Xiao, X. Meng, L. Han, and C. Yu, "Sensor drift compensation based on the improved lstm and svm multi-class ensemble learning models," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 18, 2019, doi: 10.3390/s19183844.
- [205] J. M. Margarit-Taulé, M. Martín-Ezquerria, R. Escudé-Pujol, C. Jiménez-Jorquera, and S. C. Liu, "Cross-compensation of FET sensor drift and matrix effects in the industrial continuous monitoring of ion concentrations," *Sens Actuators B Chem*, vol. 353, 2022, doi: 10.1016/j.snb.2021.131123.
- [206] D. Granato, V. Ô. M. de Araújo Calado, and B. Jarvis, "Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology," 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.024.
- [207] L. Moreno-Barón *et al.*, "Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic tongue," *Sens Actuators B Chem*, vol. 113, no. 1, 2006, doi: 10.1016/j.snb.2005.03.063.
- [208] P. Li, Y. Pei, and J. Li, "A comprehensive survey on design and application of autoencoder in deep learning," 2023. doi: 10.1016/j.asoc.2023.110176.
- [209] F. J. Acevedo Rodriguez, R. J. López-Sastre, P. Gil-Jiménez, N. Ruiz-Reyes, and S. Maldonado Bascón, "Fixed kernel regression for voltammogram feature extraction," *Meas Sci Technol*, vol. 20, no. 12, 2009, doi: 10.1088/0957-0233/20/12/125202.
- [210] D. A. Harrington and P. Van Den Driessche, "Mechanism and equivalent circuits in electrochemical impedance spectroscopy," in *Electrochimica Acta*, 2011. doi: 10.1016/j.electacta.2011.01.067.
- [211] A. D'Amico, C. Di Natale, C. Falconi, G. Pennazza, M. Santonico, and I. Lundstrom, "Equivalent electric circuits for chemical sensors in the Langmuir regime," *Sens Actuators B Chem*, vol. 238, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.07.011.
- [212] S. D. Brown, R. S. Bear, and T. B. Blank, "Chemometrics," *Anal Chem*, vol. 64, no. 12, 1992, doi: 10.1021/ac00036a002.
- [213] A. Sohail and F. Arif, "Supervised and unsupervised algorithms for bioinformatics and data science," *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 151, 2020, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2019.11.012.
-

- [214] M. N. Mohamad Asri, W. N. S. Mat Desa, and D. Ismail, “Combined Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA): an efficient chemometric approach in aged gel inks discrimination,” *Australian Journal of Forensic Sciences*, vol. 52, no. 1, 2020, doi: 10.1080/00450618.2018.1466913.
- [215] D. Granato, J. S. Santos, G. B. Escher, B. L. Ferreira, and R. M. Maggio, “Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective,” 2018. doi: 10.1016/j.tifs.2017.12.006.
- [216] L. A. Berrueta, R. M. Alonso-Salces, and K. Héberger, “Supervised pattern recognition in food analysis,” 2007. doi: 10.1016/j.chroma.2007.05.024.
- [217] H. Abdi and L. J. Williams, “Principal component analysis,” *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat*, vol. 2, no. 4, pp. 433–459, Jul. 2010, doi: 10.1002/WICS.101.
- [218] R. Bro and A. K. Smilde, “Principal component analysis,” 2014. doi: 10.1039/c3ay41907j.
- [219] M. Greenacre, P. J. F. Groenen, T. Hastie, A. I. D’Enza, A. Markos, and E. Tuzhilina, “Principal component analysis,” *Nature Reviews Methods Primers*, vol. 2, no. 1, 2022, doi: 10.1038/s43586-022-00184-w.
- [220] K. Pearson, “LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space,” *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 2, no. 11, 1901, doi: 10.1080/14786440109462720.
- [221] C.-W. Borchardt, “Développements sur l’équation à l’aide de laquelle on détermine les inégalités séculaires du mouvement des planètes,” *J Math Pures Appl*, vol. 12, pp. 50–67, 1847, Accessed: Oct. 24, 2024. [Online]. Available: http://www.numdam.org/item?id=JMPA_1847_1_12__50_0
- [222] Y. Zhao *et al.*, “Modeling and application of sensory evaluation of blueberry wine based on principal component analysis,” *Curr Res Food Sci*, vol. 6, 2023, doi: 10.1016/j.crfs.2022.11.022.
- [223] K. W. Chapman, H. T. Lawless, and K. J. Boor, “Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk,” *J Dairy Sci*, vol. 84, no. 1, 2001, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74446-3.
- [224] M. Phillips *et al.*, “Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath,” *Tuberculosis*, vol. 87, no. 1, 2007, doi: 10.1016/j.tube.2006.03.004.
- [225] J. Troiano, B. R. Johnson, S. Powell, and S. Schoenig, “Use of cluster and principal component analyses to profile areas in California where ground water has been contaminated by pesticides,” *Environ Monit Assess*, vol. 32, no. 3, 1994, doi: 10.1007/BF00546281.
-

- [226] A. J. Izenman, "Linear Discriminant Analysis," 2013. doi: 10.1007/978-0-387-78189-1_8.
- [227] A. Sharma and K. K. Paliwal, "Linear discriminant analysis for the small sample size problem: an overview," *International Journal of Machine Learning and Cybernetics*, vol. 6, no. 3, 2015, doi: 10.1007/s13042-013-0226-9.
- [228] P. Xanthopoulos, P. M. Pardalos, and T. B. Trafalis, "Linear Discriminant Analysis," 2013. doi: 10.1007/978-1-4419-9878-1_4.
- [229] C. Gold and P. Sollich, "Model selection for support vector machine classification," *Neurocomputing*, vol. 55, no. 1–2, 2003, doi: 10.1016/S0925-2312(03)00375-8.
- [230] J. Cervantes, F. Garcia-Lamont, L. Rodríguez-Mazahua, and A. Lopez, "A comprehensive survey on support vector machine classification: Applications, challenges and trends," *Neurocomputing*, vol. 408, 2020, doi: 10.1016/j.neucom.2019.10.118.
- [231] C. Xia, M. Zhang, and J. Cao, "A hybrid application of soft computing methods with wavelet SVM and neural network to electric power load forecasting," *Journal of Electrical Systems and Information Technology*, vol. 5, no. 3, 2018, doi: 10.1016/j.jesit.2017.05.008.
- [232] Y. Xiao, H. Wang, and W. Xu, "Parameter selection of gaussian kernel for one-class SVM," *IEEE Trans Cybern*, vol. 45, no. 5, 2015, doi: 10.1109/TCYB.2014.2340433.
- [233] M. Awad and R. Khanna, "Support Vector Regression," in *Efficient Learning Machines*, 2015. doi: 10.1007/978-1-4302-5990-9_4.
- [234] R. G. Brereton and G. R. Lloyd, "Support Vector Machines for classification and regression," 2010. doi: 10.1039/b918972f.
- [235] P. Geladi and B. R. Kowalski, "Partial least-squares regression: a tutorial," *Anal Chim Acta*, vol. 185, no. C, 1986, doi: 10.1016/0003-2670(86)80028-9.
- [236] H. Abdi and L. J. Williams, "Partial least squares methods: Partial least squares correlation and partial least square regression," *Methods in Molecular Biology*, vol. 930, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-059-5_23.
- [237] H. Abdi, "Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression)," *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat*, vol. 2, no. 1, 2010, doi: 10.1002/wics.51.
- [238] S. J. Lee and A. C. Noble, "Use of partial least squares regression and multidimensional scaling on aroma models of California Chardonnay wines," *Am J Enol Vitic*, vol. 57, no. 3, 2006, doi: 10.5344/ajev.2006.57.3.363.
- [239] L. Zeng, A. Pernet, M. Cléroux, B. Bach, L. Froidevaux, and I. Preda, "Development of Distillation Sensors for Spirit Beverages Production Monitoring Based on
-

- Impedance Spectroscopy Measurement and Partial Least-Squares Regression,” *ACS Omega*, vol. 8, no. 17, 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c00481.
- [240] Á. A. Arrieta, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja, C. A. Blanco, and D. Nimubona, “Prediction of bitterness and alcoholic strength in beer using an electronic tongue,” *Food Chem*, vol. 123, no. 3, 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.006.
- [241] P. Ciosek, “Milk and Dairy Products Analysis by Means of an Electronic Tongue,” in *Electronic Noses and Tongues in Food Science*, 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-800243-8.00021-4.
- [242] L. Sobrino-Gregorio, F. Tanleque-Alberto, R. Bataller, J. Soto, and I. Escriche, “Using an automatic pulse voltammetric electronic tongue to verify the origin of honey from Spain, Honduras, and Mozambique,” *J Sci Food Agric*, vol. 100, no. 1, 2020, doi: 10.1002/jsfa.10022.
- [243] J. E. Fitzgerald, J. Zhu, J. P. Bravo-Vasquez, and H. Fenniri, “Cross-reactive, self-encoded polymer film arrays for sensor applications,” *RSC Adv*, vol. 6, no. 86, 2016, doi: 10.1039/c6ra13874h.
- [244] M. W. Browne, “Cross-validation methods,” *J Math Psychol*, vol. 44, no. 1, 2000, doi: 10.1006/jmps.1999.1279.
- [245] T. T. Wong, “Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and leave-one-out cross validation,” *Pattern Recognit*, vol. 48, no. 9, 2015, doi: 10.1016/j.patcog.2015.03.009.
- [246] J. D. Rodríguez, A. Pérez, and J. A. Lozano, “Sensitivity Analysis of k-Fold Cross Validation in Prediction Error Estimation,” *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 32, no. 3, 2010, doi: 10.1109/TPAMI.2009.187.
- [247] N. Prieto *et al.*, “Application of a GA-PLS strategy for variable reduction of electronic tongue signals,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 183, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2013.03.114.
- [248] Y. hong Zhong *et al.*, “A convolutional neural network based auto features extraction method for tea classification with electronic tongue,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 9, no. 12, 2019, doi: 10.3390/app9122518.
- [249] Y. Mao, S. Cheng, B. Shi, L. Zhao, S. Tian, and H. Wang, “An Optimized Detection Method for Chinese Red Huajiao Geographical Origin Determination, Based on Electronic Tongue and Ensemble Recognition Algorithm,” *Food Anal Methods*, vol. 15, no. 9, 2022, doi: 10.1007/s12161-022-02285-4.
- [250] R. Leardi and A. Lupiáñez González, “Genetic algorithms applied to feature selection in PLS regression: How and when to use them,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 41, no. 2, 1998, doi: 10.1016/S0169-7439(98)00051-3.
-

- [251] T. C. B. de Morais, D. R. Rodrigues, U. T. de Carvalho Polari Souto, and S. G. Lemos, "A simple voltammetric electronic tongue for the analysis of coffee adulterations," *Food Chem*, vol. 273, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.136.
- [252] Y. chen Wu and J. wen Feng, "Development and Application of Artificial Neural Network," *Wirel Pers Commun*, vol. 102, no. 2, 2018, doi: 10.1007/s11277-017-5224-x.
- [253] J. Schmidhuber, "Deep Learning in neural networks: An overview," 2015. doi: 10.1016/j.neunet.2014.09.003.
- [254] T. Hastie, R. Tibshirani, and J. Friedman, "The Elements of Statistical Learning," 2009, doi: 10.1007/978-0-387-84858-7.
- [255] Y. Lecun, Y. Bengio, and G. Hinton, "Deep learning," *Nature* 2015 521:7553, vol. 521, no. 7553, pp. 436–444, May 2015, doi: 10.1038/nature14539.
- [256] M. Galar, A. Fernandez, E. Barrenechea, H. Bustince, and F. Herrera, "A review on ensembles for the class imbalance problem: Bagging-, boosting-, and hybrid-based approaches," 2012. doi: 10.1109/TSMCC.2011.2161285.
- [257] M. F. Zaman and H. Hirose, "Classification performance of bagging and boosting type ensemble methods with small training sets," *New Gener Comput*, vol. 29, no. 3, 2011, doi: 10.1007/s00354-011-0303-0.
- [258] T. G. Dietterich, "Ensemble methods in machine learning," in *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 2000. doi: 10.1007/3-540-45014-9_1.
- [259] Y. Mao, S. Cheng, B. Shi, L. Zhao, S. Tian, and H. Wang, "An Optimized Detection Method for Chinese Red Huajiao Geographical Origin Determination, Based on Electronic Tongue and Ensemble Recognition Algorithm," *Food Anal Methods*, vol. 15, no. 9, pp. 2414–2423, Sep. 2022, doi: 10.1007/S12161-022-02285-4/FIGURES/6.
- [260] D. C. Braz *et al.*, "Using machine learning and an electronic tongue for discriminating saliva samples from oral cavity cancer patients and healthy individuals," *Talanta*, vol. 243, 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123327.
- [261] S. More, "Global trends in milk quality: Implications for the Irish dairy industry," 2009. doi: 10.1186/2046-0481-62-S4-S5.
- [262] F. Fuller, J. Beghin, and S. Rozelle, "Consumption of dairy products in urban China: Results from Beijing, Shangai and Guangzhou," *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, vol. 51, no. 4, 2007, doi: 10.1111/j.1467-8489.2007.00379.x.
- [263] M. Kapelko, A. Oude Lansink, and S. Stefanou, "Assessing the Impact of Changing Economic Environment on Productivity Growth: The Case of the Spanish Dairy
-

- Processing Industry,” *Journal of Food Products Marketing*, vol. 23, no. 4, 2017, doi: 10.1080/10454446.2014.1000448.
- [264] F. Devlieghere, L. Vermeiren, and J. Debevere, “New preservation technologies: Possibilities and limitations,” in *International Dairy Journal*, 2004. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.07.002.
- [265] J. A. O’Mahony and P. F. Fox, “Milk: An Overview,” in *Milk Proteins: from Expression to Food, Second Edition*, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-405171-3.00002-7.
- [266] A. Haug, A. T. Høstmark, and O. M. Harstad, “Bovine milk in human nutrition - A review,” 2007. doi: 10.1186/1476-511X-6-25.
- [267] R. Harmon, “Mastitis and milk quality,” in *Milk Quality*, 1995. doi: 10.1007/978-1-4615-2195-2_3.
- [268] R. Jenness, “Composition of Milk,” in *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 1988. doi: 10.1007/978-1-4615-7050-9_1.
- [269] K. Toko *et al.*, “Heat effect on the taste of milk studied using a taste sensor,” *Jpn J Appl Phys*, vol. 34, no. 11R, 1995, doi: 10.1143/JJAP.34.6287.
- [270] K. Toko, “Taste sensor with global selectivity,” 1996. doi: 10.1016/0928-4931(96)00134-8.
- [271] H. Yamada, Y. Mizota, K. Toko, and T. Doi, “Highly sensitive discrimination of taste of milk with homogenization treatment using a taste sensor,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 5, no. 1, 1997, doi: 10.1016/S0928-4931(97)00021-0.
- [272] F. Winquist, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, and I. Lundström, “Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry,” *Meas Sci Technol*, vol. 9, no. 12, 1998, doi: 10.1088/0957-0233/9/12/002.
- [273] Z. Wei, J. Wang, and X. Zhang, “Monitoring of quality and storage time of unsealed pasteurized milk by voltammetric electronic tongue,” *Electrochim Acta*, vol. 88, 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2012.10.042.
- [274] P. Ciosek, E. Augustyniak, and W. Wróblewski, “Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitive electrode-based electronic tongue for qualitative analysis of beverages,” *Analyst*, vol. 129, no. 7, 2004, doi: 10.1039/b401390e.
- [275] P. Ciosek and W. Wróblewski, “Performance of selective and partially selective sensors in the recognition of beverages,” *Talanta*, vol. 71, no. 2, 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2006.05.022.
- [276] A. Buczkowska *et al.*, “The monitoring of methane fermentation in sequencing batch bioreactor with flow-through array of miniaturized solid state electrodes,” *Talanta*, vol. 81, no. 4–5, 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2010.02.039.
-

- [277] T. Mottram, A. Rudnitskaya, A. Legin, J. L. Fitzpatrick, and P. D. Eckersall, "Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk," *Biosens Bioelectron*, vol. 22, no. 11, 2007, doi: 10.1016/j.bios.2006.11.006.
- [278] J. Newman, N. Harbourne, D. O'Riordan, J. C. Jacquier, and M. O'Sullivan, "Comparison of a trained sensory panel and an electronic tongue in the assessment of bitter dairy protein hydrolysates," *J Food Eng*, vol. 128, 2014, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.12.019.
- [279] N. I. P. Valente, A. Rudnitskaya, J. A. B. P. Oliveira, E. M. M. Gaspar, and M. T. S. R. Gomes, "Cheeses Made from Raw and Pasteurized Cow's Milk Analysed by an Electronic Nose and an Electronic Tongue," *Sensors 2018, Vol. 18, Page 2415*, vol. 18, no. 8, p. 2415, Jul. 2018, doi: 10.3390/S18082415.
- [280] L. A. Dias, A. M. Peres, A. C. A. Veloso, F. S. Reis, M. Vilas-Boas, and A. A. S. C. Machado, "An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk," *Sens Actuators B Chem*, vol. 136, no. 1, 2009, doi: 10.1016/j.snb.2008.09.025.
- [281] J. B. Lipkowitz, C. F. Ross, C. Diako, and D. M. Smith, "Discriminating aging and protein-to-fat ratio in Cheddar cheese using sensory analysis and a potentiometric electronic tongue," *J Dairy Sci*, vol. 101, no. 3, 2018, doi: 10.3168/jds.2017-13820.
- [282] I. Tazi, K. Triyana, D. Siswanta, A. C. A. Veloso, A. M. Peres, and L. G. Dias, "Dairy products discrimination according to the milk type using an electrochemical multisensor device coupled with chemometric tools," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 12, no. 4, 2018, doi: 10.1007/s11694-018-9855-8.
- [283] F. Winquist, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, and I. Lundström, "Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry," *Meas Sci Technol*, vol. 9, no. 12, p. 1937, Dec. 1998, doi: 10.1088/0957-0233/9/12/002.
- [284] L. Robertsson and P. Wide, "Analyzing bacteriological growth using wavelet transform," in *Conference Record - IEEE Instrumentation and Measurement Technology Conference*, 2004. doi: 10.1109/IMTC.2004.1351196.
- [285] Z. Wei and J. Wang, "Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system," *Anal Chim Acta*, vol. 694, no. 1–2, 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.02.053.
- [286] A. Shripad Kulkarni, H. B. Nemade, and R. Swaminathan, "Replacement of conventional reference electrode with platinum electrode for electronic tongue based analysis of dairy products," *Results Chem*, vol. 6, 2023, doi: 10.1016/j.rechem.2023.101185.
-

- [287] Z. Wei, W. Zhang, Y. Wang, and J. Wang, "Monitoring the fermentation, post-ripeness and storage processes of set yogurt using voltammetric electronic tongue," *J Food Eng*, vol. 203, 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.01.022.
- [288] Y. Yu *et al.*, "Pure milk brands classification by means of a voltammetric electronic tongue and multivariate analysis," *Int J Electrochem Sci*, vol. 10, no. 5, 2014, doi: 10.1016/s1452-3981(23)06630-0.
- [289] A. Arrieta, O. Fuentes, and M. Palencia, "New Portable Electronic Tongue Integrated on a Single Chip to Analysis Raw Milk," *Indian J Sci Technol*, vol. 11, no. 2, pp. 1–6, Oct. 2018, doi: 10.17485/IJST/2018/V11I2/117529.
- [290] A. Arrieta, I. Barrera, and J. Mendoza, "Application of a Polypyrrole Sensor Array Integrated into a Smart Electronic Tongue for the Discrimination of Milk Adulterated with Sucrose," *International Journal of Technology*, vol. 14, no. 1, 2023, doi: 10.14716/ijtech.v14i1.5613.
- [291] T. R. L. C. Paixão and M. Bertotti, "Fabrication of disposable voltammetric electronic tongues by using Prussian Blue films electrodeposited onto CD-R gold surfaces and recognition of milk adulteration," *Sens Actuators B Chem*, vol. 137, no. 1, 2009, doi: 10.1016/j.snb.2008.10.045.
- [292] V. P. Scagion *et al.*, "An electronic tongue based on conducting electrospun nanofibers for detecting tetracycline in milk samples," *RSC Adv*, vol. 6, no. 105, 2016, doi: 10.1039/c6ra21326j.
- [293] M. Y. M. Sim, T. J. Shya, M. N. Ahmad, A. Y. M. Shakaff, A. R. Othman, and M. S. Hitam, "Monitoring of milk quality with disposable taste sensor," *Sensors*, vol. 3, no. 9, 2003, doi: 10.3390/s30900340.
- [294] P. Ciosek, K. Brudzewski, and W. Wróblewski, "Milk classification by means of an electronic tongue and Support Vector Machine neural network," in *Measurement Science and Technology*, 2006. doi: 10.1088/0957-0233/17/6/014.
- [295] N. Uria, J. Moral-Vico, N. Abramova, A. Bratov, and F. X. Muñoz, "Fast determination of viable bacterial cells in milk samples using impedimetric sensor and a novel calibration method," *Electrochim Acta*, vol. 198, 2016, doi: 10.1016/j.electacta.2016.03.060.
- [296] M. S. Brady and S. E. Katz, "Antibiotic/Antimicrobial Residues in Milk," *J Food Prot*, vol. 51, no. 1, 1988, doi: 10.4315/0362-028x-51.1.8.
- [297] K. Ghanbari and M. Roushani, "A novel electrochemical aptasensor for highly sensitive and quantitative detection of the streptomycin antibiotic," *Bioelectrochemistry*, vol. 120, 2018, doi: 10.1016/j.bioelechem.2017.11.006.
-

- [298] D. Juronen, A. Kuusk, K. Kivirand, A. Rincken, and T. Rincken, "Immunosensing system for rapid multiplex detection of mastitis-causing pathogens in milk," *Talanta*, vol. 178, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2017.10.043.
- [299] S. C. Macdiarmid, "Antibacterial drugs used against mastitis in cattle by the systemic route," *N Z Vet J*, vol. 26, no. 12, 1978, doi: 10.1080/00480169.1978.34574.
- [300] A. Ashraf and M. Imran, "Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm," 2018. doi: 10.1007/s11250-018-1629-0.
- [301] A. Coatrini-Soares *et al.*, "Microfluidic E-tongue to diagnose bovine mastitis with milk samples using Machine learning with Decision Tree models," *Chemical Engineering Journal*, vol. 451, 2023, doi: 10.1016/j.cej.2022.138523.
- [302] E. V. dos S. Pereira, D. D. de S. Fernandes, M. C. U. de Araújo, P. H. G. D. Diniz, and M. I. S. Maciel, "Simultaneous determination of goat milk adulteration with cow milk and their fat and protein contents using NIR spectroscopy and PLS algorithms," *LWT*, vol. 127, 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2020.109427.
- [303] H. Han, Z. Wang, C. Li, Z. Ma, Z. Yang, and X. Ma, "Purity detection of goat milk based on electronic tongue and improved artificial fish swarm optimized extreme learning machine," in *IFAC-PapersOnLine*, 2019. doi: 10.1016/j.ifacol.2019.12.588.
- [304] A. Sadat, P. Mustajab, and I. A. Khan, "Determining the adulteration of natural milk with synthetic milk using ac conductance measurement," *J Food Eng*, vol. 77, no. 3, 2006, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.06.062.
- [305] K. M. Khan, H. Krishna, S. K. Majumder, and P. K. Gupta, "Detection of Urea Adulteration in Milk Using Near-Infrared Raman Spectroscopy," *Food Anal Methods*, vol. 8, no. 1, 2015, doi: 10.1007/s12161-014-9873-z.
- [306] T. A. Minetto, B. D. França, G. da Silva Dariz, E. A. Veiga, A. C. Galvão, and W. da Silva Robazza, "Identifying adulteration of raw bovine milk with urea through electrochemical impedance spectroscopy coupled with chemometric techniques," *Food Chem*, vol. 385, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132678.
- [307] L. Bueno, W. R. de Araujo, M. O. Salles, M. Y. Kussuda, and T. R. L. C. Paixão, "Voltammetric electronic tongue for discrimination of milk adulterated with urea, formaldehyde and melamine," *Chemosensors*, vol. 2, no. 4, 2014, doi: 10.3390/chemosensors2040251.
- [308] L. A. Li, Y. Yu, J. Yang, R. Yang, G. Dong, and T. Jin, "Voltammetric electronic tongue for the qualitative analysis of milk adulterated with urea combined with multi-way data analysis," *Int J Electrochem Sci*, vol. 10, no. 7, 2015, doi: 10.1016/s1452-3981(23)17309-3.
-

- [309] A. Merwan, A. Nezif, and T. Metekia, “Review on milk and milk product safety, quality assurance and control,” *International Journal of Livestock Production*, vol. 9, no. 4, 2018, doi: 10.5897/ijlp2017.0403.
- [310] I. Tazi, A. Choiriyah, D. Siswanta, and K. Triyana, “Detection of taste change of bovine and goat milk in room ambient using electronic tongue,” *Indonesian Journal of Chemistry*, vol. 17, no. 3, 2017, doi: 10.22146/ijc.25288.
- [311] G. Halpin, S. McEntee, C. Dwyer, F. Lawless, and E. Dempsey, “Lactose Biosensor Development and Deployment in Dairy Product Analysis,” *J Electrochem Soc*, vol. 169, no. 3, 2022, doi: 10.1149/1945-7111/ac5e41.
- [312] S. K. Sharma, R. Singhal, B. D. Malhotra, N. Sehgal, and A. Kumar, “Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of galactose in milk,” *Electrochim Acta*, vol. 49, no. 15, 2004, doi: 10.1016/j.electacta.2004.01.024.
- [313] P. Skládal, “Smart bioelectronic tongues for food and drinks control,” 2020. doi: 10.1016/j.trac.2020.115887.
- [314] C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, C. García-Cabezón, and M. L. Rodríguez-Méndez, “Discrimination of milks with a multisensor system based on layer-by-layer films,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 8, 2018, doi: 10.3390/s18082716.
- [315] C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, and M. L. Rodríguez-Méndez, “Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles,” *Food Control*, vol. 145, 2023, doi: 10.1016/j.foodcont.2022.109425.
- [316] L. A. Mercante, V. P. Scagion, A. Pavinatto, R. C. Sanfelice, L. H. C. Mattoso, and D. S. Correa, “Electronic tongue based on nanostructured hybrid films of gold nanoparticles and phthalocyanines for milk analysis,” *J Nanomater*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/890637.
- [317] J. A. Ohlsson *et al.*, “Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products,” *Int Dairy J*, vol. 73, 2017, doi: 10.1016/j.idairyj.2017.06.004.
-

Capítulo 6

Anexos

En este capítulo se presentan los listados de publicaciones, congresos y jornadas nacionales e internacionales, así como los certificados de estancias de investigación en centros extranjeros llevadas a cabo durante el periodo de la tesis doctoral.

This chapter presents the list of publications, national and international conferences and workshops, as well as certificates of research stays at foreign institutions carried out during the doctoral thesis period.

6.1 Publicaciones

1. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, L. Dias, M. A. Rodríguez-Perez, C. García-Cabezón, M. L. Rodríguez-Méndez. Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors *Frontiers in Chemistry* (2021) *Frontiers in Chemistry*, 9. doi:10.3389/fchem.2021.706460.

Impact factor: 3.8 Q2, Chemistry, Multidisciplinary

2. C. Salvo-Comino, P. Martín-Bartolomé, J.L. Pura, C. Pérez-González, F. Martín Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Improving the performance of a bioelectronic tongue using silver nanowires: Application to milk analysis (2022) *Sensors and Actuators B: Chemical* 364, p. 131877. doi:10.1016/j.snb.2022.131877.

Impact factor: 8 Q1, Instrument and Instrumentation

3. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, M. L. Rodríguez-Méndez. Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles (2023) *Food Control*, 145, p. 109425. doi:10.1016/j.foodcont.2022.109425.

Impact factor: 5.6 Q1, Food Science & Technology

4. C. García-Cabezón, V. Godinho, C. Pérez-González, Y. Torres, F. Martín-Pedrosa. Electropolymerized polypyrrole silver nanocomposite coatings on porous Ti substrates with enhanced corrosion and antibacterial behavior for biomedical applications (2023) *Materials Today Chemistry*, 29, p. 101433. doi:10.1016/j.mtchem.2023.101433.

Impact factor: 7.1 Q1, Material Science, Multidisciplinary

5. C. Salvo-Comino, C. Pérez-González, P. Martín-Bartolomé, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Impact of milk preservation in the classification and prediction capabilities of a voltammetric electronic tongue (2023) *Sensors and Actuators B: Chemical*, 393, p. 134138. doi:10.1016/j.snb.2023.134138.

Impact factor: 8 Q1, Instrument and Instrumentation

6. S. Pettinelli, C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Mencarelli, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. High-performance bioelectronic tongue for
-

the simultaneous analysis of phenols, sugars and organic acids in wines (2023) *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi:10.1002/jsfa.13174.

Impact factor: 3.3 Q2, Food Science & Technology

7. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez-Mendez, C. García-Cabezón. A new data analysis approach for an AgNPs-modified impedimetric bioelectronic tongue for dairy analysis (2024) *Food Control*, 156, p. 110136. doi:10.1016/j.foodcont.2023.110136.

Impact factor: 5.6 Q1, Food Science & Technology

8. C. Pérez-González, C. García-Hernández, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez, L. Dias, F. Martín-Pedrosa. Analysis of milk adulteration by means of a potentiometric electronic tongue (2024) *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2024-25140.

Impact factor: 3.7 Q2, Food Science & Technology

9. C. Salvo Comino, C. Pérez González, M. L. Rodríguez Méndez. Sensor arrays (2024) *Sensory Polymers*, pp. 467–499. doi:10.1016/b978-0-443-13394-7.00012-4.
 10. C. Salvo-Comino, L.E. Alonso-Pastor; C. Pérez-González; S. Pettinelli; K.C. Núñez Carrero; M.A. Rodríguez-Pérez, M.L. Rodríguez-Méndez. Impact of Molecular Structure and Plasticization of PVC Membranes in the Response of Solid-State Ion-Selective Electrodes (2024) *Sensors and Actuators Reports*, UNDER REVIEW.
 11. C. García Cabezón, C. Pérez González, C. García Hernández, M.L. Rodríguez Mendez, L. Dias, F. Martín-Pedrosa. Advanced Characterization in Molecularly Imprinted Polypyrrole for Potentiometric Lactose Sensing (2024) *Sensors and Actuator B Chemical*, UNDER REVIEW.
 12. S. Pettinelli, C. Salvo Comino, C. Pérez-González, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, E. Barajas Tola, A. Martín Baz, M.L. Rodríguez-Mendez. Using multivariate techniques to evaluate the effect of cluster thinning in the wine quality: a comprehensive analysis on Tempranillo variety (2024) *LWT-Food Science and Technologies*, UNDER REVIEW.
-

6.2 Contribuciones en jornadas y congresos nacionales e internacionales

Jornadas

1. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. GarcíaCabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Sensores interdigitados impedimétricos para el análisis de productos lácteos (2022) VIII Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología (ORAL).
2. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Optimizing an electronic tongue for the dairy industry (2022) II Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad de Valladolid (POSTER).
3. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. GarcíaCabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Efecto del uso de nanomateriales en el desarrollo de biosensores impedimétricos (2023) IX Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología. (POSTER).
4. C. Pérez-González, S. Pettinelli, C. Salvo-Comino, A.J. Martín, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Enhancing Wine Quality: Analysis of Different Harvest Approaches on Tempranillo Grapes (2024) X Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología (ORAL).
5. C. Pérez-González, C. GarcíaCabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Aptasensores en Leche: Espectroscopía de Impedancias (2024) III Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad de Valladolid (POSTER).

Congresos Nacionales e Internacionales

1. C. Salvo-Comino, C. Pérez-González, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón and Maria Luz 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 (2021) First International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry (ONLINE-Proceedings).
 2. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Development of a Bioelectronic Tongue Modified with Gold Nanoparticles for Dairy Analysis (2021) First International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry (ONLINE-Proceedings).
 3. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martín-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Development of a potentiometric bioelectronic tongue
-

- modified with gold nanoparticles for dairy industry (2021) 13th Spanish Conference on Electron Devices (POSTER).
4. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, J-L. Pura, F. Martin-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Development of a bioelectronic tongue with gold nanoparticles and enzymes dedicated to milk analysis (2021) X Franco-Spanish Workshop CMC2 – IBERNAM (ORAL).
 5. J.L. Pura, C. Salvo-Comino, C. Pérez-González, C. Garcia-Cabezón, M.L. Rodriguez-Mendez. AFM characterization of AgNWs modified electrodes by LangmuirBlodgett: the effect of electrochemical measurements (2021) RSEQ Symposium (POSTER).
 6. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, J-L. Pura, F. Martin-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Impedimetric bio-electronic tongue based on silver nanoparticles for the analysis of milk (2022) The International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ORAL).
 7. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, F. Martin-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Lenguas electrónicas: Una nueva herramienta en el control de calidad de la industria láctea (2022) III Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos (ORAL)
 8. C. Salvo-Comino, C. Pérez-González, C. García-Cabezón, M.L. Rodriguez-Mendez. Influence of storage and preservation of milk on the performance of a voltammetric electronic tongue (2023) 243rd ECS Symposium (POSTER).
 9. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, F. Martin-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Impedance Spectroscopy: A New Tool For Dairy Analysis (2023) 243rd ECS Symposium (POSTER).
 10. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. New approach on impedimetric bioelectronic tongue for dairy characterization (2023) XI Franco-Spanish Workshop IBERNAM-CMC2 (POSTER).
 11. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, P. Nájera-Morales, F. Martin-Pedrosa, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Méndez. Enhanced Impedimetric sensors for food industry (2023) I Ibero-American Research Symposium: Opening, frontiers through new materials (ORAL-Invited).
 12. C. Campos-Machado, C. Salvo-Comino, C. Pérez-González, L. Caseli, M.L. Rodríguez-Méndez. Development of biosensors for phenol compounds utilizing
-

- Langmuir and Langmuir-Blodgett nano-organized films containing laccase (2024) 18th European Conference of Organized Films (POSTER).
13. C. Salvo-Comino, L.E. Alonso-Pastor, S. Pettinelli, C. Pérez-González, M.A. Rodríguez-Perez, M.L. Rodríguez-Méndez. Enhancing Potentiometric Sensor Performance: Investigating Plasticizer and PVC Membrane Synergy (2024) XIX Escuela Nacional de Materiales Moleculares-ENMM (POSTER).
 14. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, P. Nájera-Morales, F. Martín-Pedrosa, M.L. Rodríguez Méndez, C. García-Cabezón. Differential pulse voltammetry as an analytical tool for raw milk analysis using electrochemical biosensors (2024) 2nd International Electronic Confernece on Chemical Sensors and Analytical Chemistry (POSTER).
 15. C. Pérez-González, C. Salvo-Comino, S. Pettinelli, C. García-Cabezón, M.L. Rodríguez-Mendez. Nano-Enhanced Electrochemical Sensors: Introducing Nanomaterials in Enzymatic Sensing and Prediction Modeling (2024) XIX Escuela Nacional de Materiales Moleculares-ENMM (ORAL).
-

6.3 Proyectos de investigación y contratos con empresas

1. 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. RTI2018-097990-B-I00.
 2. Proyectos de Conocimiento-Investigación Orientada 2021 Programa Estatal. Agencia estatal de investigación, Fondos FEDER. Prototipo de lengua electrónica portátil basada en nanosensores potenciométricos para el análisis de leche. Validación y correlación con otras técnicas. PID2021-122365OB-I00.
 3. Proyectos POCTEP INTERREG VI A España-Portugal. Comisión europea, Fondos FEDER. Valorización y caracterización de variedades minoritarias de vid por métodos clásicos y nuevas tecnologías en el espacio transfronterizo. 0039_MINORSENS_2_E
 4. Contrato ART.60. Calidad Pascual SAU. Desarrollo de una red de sensores para el análisis de leches provenientes de alimentación de precisión del vacuno lechero "ALIVAC".
 5. Contrato ART.60. Fundación CIDAUT, ABN Pipe systems SLU, Asientos De Castilla Y Leon SL, INDEMAT SL, Aenium Engineering SL. Servicios de caracterización de materiales y análisis.
 6. Contrato ART.60. Servicio Técnico Repetitivo. Servicios relativos al estudio y caracterización de piezas metálicas en el ámbito del comportamiento en servicio.
-

6.4 Cursos de formación

1. Nombre: Ética y buenas prácticas en la investigación.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid ESDUVA.
 2. Pon en valor tu investigación en Ciencias Experimentales. Primera edición.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid ESDUVA.
 3. A Happy PhD': Productividad, bienestar y progreso del doctorando a tiempo parcial o a distancia.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid ESDUVA.
 4. Estadística e Inteligencia Artificial con R.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid ESDUVA.
 5. Protección del conocimiento: patentes, protección intelectual y derechos de autor.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid ESDUVA.
 6. Curso de habilidades comunicativas aplicado al concurso 3mt el arte de ser profesional.
Entidad organizadora: Universidad de Valladolid ESDUVA.
 7. Soy competente digital: construye tu mejor versión digital.
Entidad organizadora: Junta de Castilla y León Plataforma de Formación MOOC (CyL Digital).
 8. Advanced use of Atomic Force Microscope and electrochemical cell accessory.
Entidad organizadora: Oxford Instruments America.
-

6.5 Estancias de investigación

**Sheffield
Hallam
University**

**Materials and
Engineering
Research Institute**

Sheffield
Hallam University
City Campus
Howard Street
Sheffield S1 1WB

T +44 (0)114 225 5555
F +44 (0)114 225 4449
www.shu.ac.uk
enquiries@shu.ac.uk

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

1. Estudiante/ Student:
Nombre y apellidos/ Name and surname: Clara Pérez González
D.N.I./ National Identity Card: 18460336F
2. Universidad o centro de investigación de acogida / Host institution:
Centro de estancia / Host institution: Hallam Sheffield University
Dirección / Address: Howard St, Sheffield City Centre, Sheffield S1 1WB,
País / Country: Reino Unido
3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Academic supervisor in the Host Institution
Nombre y apellidos / Name and surname: Alexei Nabok
Categoría académica / Position: Professor
Correo electrónico / Email: a.nabok@shu.ac.uk
CERTIFICO: que el estudiante arriba mencionado ha realizado una estancia de investigación en este centro bajo mi supervisión en las siguientes fechas: desde 30 / 04 / 2023 hasta 01 / 08 / 2023 THIS IS TO CERTIFY: that the above mentioned student has performed a research stay in this Institution under my supervision in the following dates: From: 30 /04 /2023 To: 01 /08 /2023
4. Resumen de las actividades formativas/investigación conectadas a la tesis doctoral realizadas durante la estancia: / Summary of the training activities/research connected with the thesis which have been carried out during the stay: During this doctoral internship, the participant aimed to acquire knowledge in aptamer technology for the development of electrochemical aptamer-based sensors, specifically those utilizing impedance spectroscopy, with the broader goal of advancing electronic tongue technologies. The participant engaged in training that covered the design, fabrication, and optimization of aptasensors, leading to a solid understanding of the principles behind electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and its applications in detecting molecular interactions with high specificity and sensitivity. Additionally, the internship provided valuable training in ellipsometry, a technique essential for characterizing surface

modifications and confirming aptamer immobilization. Ellipsometry further enabled the study of aptamer conformational states, allowing deeper insights into structural changes critical for sensor performance and analyte recognition. This experience equipped the participant with comprehensive knowledge across both theoretical and practical aspects of aptamer-based sensor technology and advanced surface characterization techniques, ultimately contributing to innovations in the development of electronic tongue systems.

Lugar y fecha / City and date:

Sheffield, 7/11/2024

Firma y Sello / Signature & Stamp

