

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Bioanalizadores automatizados para la monitorización
continúa en procesos de control en la industria
agroalimentaria**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Vargas Orgaz

Directores

Ángel Julio Reviejo García
M^a Asunción Ruiz Barrio
Ana Guzmán Vázquez de Prada

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



BIOANALIZADORES AUTOMATIZADOS PARA LA
MONITORIZACIÓN CONTINUA EN PROCESOS DE
CONTROL EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

Directores:

Dr. Ángel Julio Reviejo García

Dr. M^a Asunción Ruiz Barrio

Dr. Ana Guzmán Vázquez de Prada

TESIS DOCTORAL

EVA VARGAS ORGAZ

MADRID, 2015

"La ciencia y la vida cotidiana no pueden y no deben ser separadas"

Rosalind Elsie Franklin

"No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas"

Rita Levi Montalcini

"No tuve una educación científica, pero siempre hay un camino para quien quiere aprender"

Ada E. Yonath

Aunque estas líneas encabecen esta Tesis Doctoral, en realidad han sido escritas como colofón a una ardua labor pero, finalmente, satisfactoria. Por todo ello, y llegado este momento, quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo:

A mis directores de Tesis: Ángel Julio Reviejo García, M^a Asunción Ruiz Barrio y Ana Guzmán Vázquez de Prada, por el esfuerzo y dedicación que les ha supuesto la dirección y supervisión de esta Tesis.

A los miembros del Grupo HCTLab de la Escuela Politécnica Superior de la UAM: Guillermo González de Rivera y Fernando J. López-Colino, por su trabajo en las partes relativas a la microelectrónica y la informática, necesarias en la automatización de los bioanalizadores.

A todos los miembros del Grupo de Electroanálisis y Biosensores Electroquímicos del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM, dirigido por el Profesor José Manuel Pingarrón Carrazón, con los que he tenido la oportunidad de compartir esta etapa: María G., Felipe, Rebe, Víctor, Susana, Concha, María M., Irene, Judith, Araceli, Paloma, Vero, Gonzalo, Lourdes, Vanessa, Berta, María P., Elena, Marcos, Paula, Alfredo y Reynaldo. A todos, gracias por los conocimientos de electroquímica (y de química en general) que me habéis regalado y por los buenos momentos que hemos compartido, irremediablemente escasos por las circunstancias en que se ha desarrollado esta Tesis.

A mi "Club del Sastre": Felipe, Rebe, María, Gema, Ana, Iván, mis "villaverdín@s", los "maños", y toda la gente con la que he compartido esta dificultosa etapa. Muchas gracias por estar siempre ahí, por vuestro cariño y apoyo constantes, por vuestra energía positiva, por vuestra paciencia, y por haberme ayudado siempre a desconectar, haciendo esta etapa más llevadera para mí.

Por último, de manera muy especial, a quienes siempre me han mostrado que con cariño, esfuerzo y perseverancia es posible realizar todo lo que uno se proponga: Pablo y Pilar, mis padres, y Pablo, mi chache. Sin vuestro amor y apoyo incondicionales seguramente nunca habría terminado esta Tesis. Muchas gracias por ser mis mayores consejeros y guías, y por no haberme dejado caer nunca. Muchas gracias por todo.

Índice

Resumen	1
i. Resumen en español	3
ii. Summary	7
1. Objetivos y plan de trabajo	11
2. Introducción general	17
2.1. Biosensores en la industria agroalimentaria	19
2.2. Técnicas de análisis en flujo: herramienta clave para la automatización en química analítica	28
2.2.1. Las técnicas de análisis en flujo en la monitorización y control de procesos	35
2.2.2. Biosensores amperométricos como detectores en los sistemas de análisis en flujo	36
2.2.3. El muestreo en los sistemas de flujo	38
3. Capítulo 1.- Bioanalizadores amperométricos en continuo para la monitorización de parámetros químicos en las industrias de la cerveza y el vino	45
3.1. Introducción	47
3.1.1. La automatización en la química analítica	47
3.1.2. Analizadores de procesos	54
3.1.2.1. Tecnología base del (bio)analizador	62
3.1.2.2. Bioanalizadores automáticos y automatizados para la monitorización de procesos en la industria	64
3.1.3. Análisis de etanol en cervezas de bajo contenido alcohólico	68
3.1.3.1. Antecedentes bibliográficos	71
3.1.4. Análisis de ácido láctico en cervezas	77
3.1.4.1. Antecedentes bibliográficos	83
3.1.5. Análisis de ácido málico en vinos	93
3.1.5.1. Antecedentes bibliográficos	98
3.2. Parte experimental	106
3.2.1. Instrumentación	106
3.2.1.1. Aparatos	106
3.2.1.2. Electrodo, células de trabajo y dispositivos	107
3.2.2. Reactivos y muestras	108
3.2.3. Procedimiento experimental	110
3.2.3.1. Preparación de disoluciones	110
3.2.3.2. Preparación de los biosensores	113
3.2.3.3. Obtención de los amperogramas en disoluciones agitadas	114
3.2.3.4. Medidas en flujo con detección amperométrica	114

3.2.3.5.	Determinaciones en muestras _____	116
3.2.3.5.1.	Determinación de etanol en cervezas "0,0" y "Sin" _____	116
3.2.3.5.2.	Determinación de ácido L-málico en vinos _____	118
3.2.3.5.3.	Determinación de ácido láctico en cervezas _____	121
3.3.	Resultados y discusión _____	124
3.3.1.	Bioanalizadores semiautomáticos _____	124
3.3.1.1.	Bioanalizadores de etanol para la monitorización del grado alcohólico en cervezas "0,0" y "Sin" _____	124
3.3.1.1.1.	Diseño, desarrollo y optimización de un sistema de flujo en continuo manual _____	124
3.3.1.1.1.1.	Optimización de las variables experimentales _____	124
3.3.1.1.1.1.1.	Selección del biosensor de etanol _____	124
3.3.1.1.1.1.2.	Selección de la célula electroquímica de flujo _____	127
3.3.1.1.1.1.3.	Diseño, desarrollo y optimización de la unidad muestreadora _____	128
3.3.1.1.1.1.4.	Diseño y desarrollo del dispositivo desgasificador _____	142
3.3.1.1.1.2.	Estudios de estabilidad _____	144
3.3.1.1.1.2.1.	Estabilidad del biosensor de etanol _____	144
3.3.1.1.1.2.2.	Estabilidad de la membrana PTFE _____	149
3.3.1.1.1.3.	Curvas de calibrado y características analíticas _____	149
3.3.1.1.1.4.	Análisis de muestras de cerveza _____	151
3.3.1.1.2.	Diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual _____	156
3.3.1.1.2.1.	Optimización de las variables experimentales _____	158
3.3.1.1.2.1.1.	Selección del biosensor de etanol _____	158
3.3.1.1.2.1.2.	Estudio de las variables hidrodinámicas: caudal y volumen de inyección _____	161
3.3.1.1.2.2.	Estudios de estabilidad _____	164
3.3.1.1.2.3.	Curvas de calibrado y características analíticas _____	170
3.3.1.1.2.4.	Análisis de muestras de cerveza _____	171
3.3.1.2.	Bioanalizador de ácido L-málico en vinos: diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual _____	173
3.3.1.2.1.	Optimización de las variables experimentales _____	173
3.3.1.2.1.1.	Desarrollo del biosensor de ácido L-málico _____	173
3.3.1.2.1.1.1.	Composición del biosensor y condiciones de trabajo _____	174

3.3.1.2.1.1.2.	Estudios de estabilidad _____	178
3.3.1.2.1.1.3.	Curvas de calibrado y características analíticas _____	180
3.3.1.2.1.1.4.	Estudio de interferencias _____	182
3.3.1.2.1.1.5.	Análisis de muestras de vino en discontinuo _____	183
3.3.1.2.1.2.	Diseño y desarrollo de un sistema FIA semiautomático _____	185
3.3.1.2.1.2.1.	Estudio de las variables hidrodinámicas: caudal y volumen de inyección _____	186
3.3.1.2.2.	Estudios de estabilidad _____	187
3.3.1.2.3.	Curvas de calibrado y características analíticas _____	189
3.3.1.2.4.	Análisis de muestras de vino _____	191
3.3.1.3.	Bioanalizador de ácido láctico en cervezas: diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual _____	193
3.3.1.3.1.	Optimización de las variables experimentales _____	193
3.3.1.3.1.1.	Selección del biosensor de ácido L-láctico _____	193
3.3.1.3.1.2.	Desarrollo del biosensor de ácido D-láctico _____	195
3.3.1.3.1.2.1.	Composición del biosensor y condiciones de trabajo _____	196
3.3.1.3.1.2.2.	Estudios de estabilidad _____	199
3.3.1.3.1.2.3.	Curvas de calibrado y características analíticas _____	202
3.3.1.3.1.2.4.	Estudio de interferencias _____	203
3.3.1.3.1.2.5.	Análisis de muestras de cerveza en discontinuo _____	205
3.3.1.3.1.3.	Selección de la célula electroquímica de flujo _____	209
3.3.1.3.1.4.	Diseño y optimización de un sistema FIA semiautomático _____	209
3.3.1.3.1.4.1.	Estudio del efecto del caudal _____	210
3.3.1.3.2.	Estudios de estabilidad _____	213
3.3.1.3.3.	Curvas de calibrado y características analíticas _____	215
3.3.1.3.4.	Análisis de muestras de cerveza _____	216
3.3.2.	Automatización de los bioanalizadores _____	220
3.3.2.1.	Bioanalizador automatizado de etanol _____	220
3.3.2.1.1.	Diseño del prototipo automatizado _____	221
3.3.2.1.1.1.	Diseño mecánico del instrumento _____	221
3.3.2.1.1.2.	Diseño electrónico del instrumento _____	228
3.3.2.1.1.3.	Diseño y desarrollo de los "softwares" de control del instrumento _____	230
3.3.2.1.1.3.1.	Análisis "on-line" _____	231
3.3.2.1.1.3.2.	Análisis "off-line" _____	242

3.3.2.1.2.	Características operacionales del bioanalizador automatizado	247
3.3.2.1.2.1.	Curvas de calibrado y características analíticas	247
3.3.2.1.2.2.	Precisión instrumental y tiempo de respuesta	250
3.3.2.1.2.3.	Estabilidad	259
3.3.2.1.3.	Validación del prototipo automatizado: análisis de muestras de cerveza	264
3.3.2.2.	Bioanalizador automático de ácido L-málico	269
3.3.2.2.1.	Diseño del prototipo automático	269
3.3.2.2.1.1.	Diseño mecánico del instrumento	269
3.3.2.2.1.2.	Diseño electrónico del instrumento	271
3.3.2.2.1.3.	Diseño y desarrollo del "software" de control del instrumento	271
3.3.2.2.2.	Características operacionales del bioanalizador automático	278
3.3.2.2.2.1.	Curvas de calibrado y características analíticas	279
3.3.2.2.2.2.	Precisión instrumental y tiempo de respuesta	281
3.3.2.2.2.3.	Estabilidad	284
3.3.2.2.3.	Validación del prototipo automático: análisis de muestras de vino	285
3.4.	Conclusiones	288
4.	Capítulo 2.- Análisis de glucosa en frutas en estado natural mediante extracción con microdiálisis	291
4.1.	Introducción	293
4.1.1.	Aplicaciones de la microdiálisis	293
4.1.1.1.	Microdiálisis como herramienta para el análisis de glucosa en flujo	295
4.1.2.	Análisis de glucosa en frutas	299
4.2.	Parte experimental	305
4.2.1.	Instrumentación	305
4.2.1.1.	Aparatos	305
4.2.1.2.	Electrodos y células de trabajo	305
4.2.2.	Reactivos y muestras	306
4.2.3.	Procedimiento experimental	306
4.2.3.1.	Preparación de disoluciones	306
4.2.3.2.	Obtención de los amperogramas en disoluciones agitadas	307
4.2.3.3.	Medidas en flujo con detección amperométrica	308

4.2.3.4.	Determinación de glucosa en frutas	308
4.2.3.4.1.	Determinación de glucosa en fruta batida	308
4.2.3.4.2.	Determinación de glucosa en piezas de fruta	310
4.3.	Resultados y discusión	312
4.3.1.	Diseño de un sistema de flujo en continuo para el análisis de glucosa en fruta	312
4.3.1.1.	Selección de la sonda de microdiálisis	314
4.3.1.2.	Diseño del bioanalizador para el análisis de glucosa en fruta	315
4.3.1.2.1.	Optimización de las variables hidrodinámicas	319
4.3.2.	Estudios de estabilidad	320
4.3.2.1.	Estabilidad del biosensor de glucosa	321
4.3.2.2.	Estabilidad de la sonda de microdiálisis	322
4.3.3.	Curvas de calibrado y características analíticas	323
4.3.4.	Validación del bioanalizador en el análisis de glucosa en fruta batida	323
4.3.5.	Análisis de glucosa en piezas de fruta	333
4.3.5.1.	Análisis de glucosa en fruta batida: estimación del factor de corrección K	333
4.3.5.2.	Relación de equivalencia $g L^{-1}$ - % (m/m)	339
4.4.	Conclusiones	348
5.	Bibliografía	349
6.	Glosario de abreviaturas	371

Resumen

i. RESUMEN EN ESPAÑOL

En la industria agroalimentaria, la importancia de la automatización se ha incrementado drásticamente en los últimos años debido a la necesidad de monitorizar, con un bajo coste económico, y con el menor tiempo de demora y el mayor grado de fiabilidad posibles, determinados parámetros químicos que permitan no sólo el control de un proceso de elaboración o maduración sino también del producto final, con el fin de mantener los estándares de calidad que caracterizan a algunos productos agroalimentarios. Los métodos de análisis tradicionalmente empleados en la industria en ocasiones no facilitan llevar a cabo una monitorización continua al resultar costosos, requerir operarios cualificados y, en la mayor parte de los casos, pretratamiento de las muestras, haciendo aumentar los tiempos de análisis. Así, el desarrollo de sistemas de instrumentación innovadores, que permitan llevar a cabo el análisis de la composición y de las propiedades de productos frescos y elaborados, como son los analizadores de procesos, se ha convertido en un elemento propulsor para el desarrollo y establecimiento de estrategias de mantenimiento avanzadas. Estos sistemas de monitorización posibilitan un mejor control y anticipación en las actividades industriales, y la ingeniería de la automatización desempeña un papel principal en su desarrollo.

El progreso de la automatización, una de las áreas principales de la química analítica, es inconcebible sin los rápidos avances realizados en informática. Esta ciencia ha permitido la automatización de las diferentes etapas del proceso analítico, contribuyendo a evitar errores asociados con las operaciones manuales. La informática y la química analítica moderna están, por lo tanto, fuertemente interrelacionadas, siendo indispensable el trabajo en tándem de ambas disciplinas para el desarrollo de analizadores automáticos y automatizados.

Los biosensores representan herramientas analíticas muy versátiles con un enorme potencial de aplicación a la trazabilidad alimentaria, proporcionando selectividad y rapidez a los métodos de análisis. Por ello, esta tecnología es útil para el desarrollo de bioanalizadores de parámetros químicos en la industria agroalimentaria, donde es necesario asegurar la mayor cantidad de información en

el menor tiempo posible y, por tanto, la duración de un análisis y la exactitud de las medidas juegan un papel fundamental.

El empleo de métodos automáticos y automatizados va ligado al concepto de sustitución de una operación o medida estática, realizadas manualmente, por una operación o medida realizadas de una manera continua o secuencial. Esto ha propiciado que los laboratorios de analítica conciban al análisis en flujo como una oportunidad para innovar. Este tipo de análisis es un área muy importante de la química analítica moderna, siendo las técnicas en flujo la base para el desarrollo de instrumentos clasificados como analizadores en continuo en procesos de instrumentación y automatización del trabajo analítico.

Esta Tesis Doctoral, titulada "Bioanalizadores automatizados para la monitorización continua en procesos de control en la industria agroalimentaria", describe el desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos de análisis automatizados y no automatizados, basados en técnicas de análisis en flujo y detección con biosensores enzimáticos amperométricos para la determinación de analitos de interés en la industria agroalimentaria.

En la primera parte de la Tesis se ha llevado a cabo el diseño, desarrollo y optimización de bioanalizadores en continuo para la monitorización de parámetros químicos en cerveza y vino. En primer lugar, se ha llevado a cabo el desarrollo de bioanalizadores semiautomáticos, como son: un sistema de análisis de flujo en continuo para la monitorización de etanol en cervezas "0,0" y "Sin" sin tratamiento previo de las mismas, gracias a la implementación de un dispositivo desgasificador y, como dispositivo de muestreo, una unidad de difusión gaseosa; un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) para la monitorización de etanol en cervezas "0,0" y "Sin", en el que se ha implementado una unidad de difusión gaseosa para analizar las muestras sin aplicarlas una dilución previa; un sistema FIA para el análisis de ácido L-málico en vinos, desarrollando previamente un biosensor enzimático amperométrico para el análisis de este compuesto; y un sistema FIA basado en el empleo de biosensores enzimáticos amperométricos de ácido D-láctico y de ácido L-láctico para el análisis simultáneo de ambos isómeros en cervezas, desarrollando previamente el biosensor para el análisis del isómero D. Para cada bioanalizador semiautomático, se han optimizado las variables

experimentales relacionadas con el funcionamiento de los componentes y dispositivos que los conforman, de modo que se obtuviera la máxima selectividad, una sensibilidad adecuada a la aplicación objetivo, y un alto rendimiento de muestreo.

A continuación, se ha llevado a cabo la automatización de los bioanalizadores de etanol y de ácido málico, obteniendo un prototipo automatizado para la monitorización "on-line" y "off-line" de etanol en cervezas de baja graduación alcohólica y un prototipo automático para el análisis "off-line" de ácido L-málico en vinos. Para ello, ha sido necesario trabajar de manera coordinada con ingenieros informáticos y electrónicos. Así, se ha llevado a cabo el diseño mecánico y electrónico de los prototipos, sustituyendo componentes de los bioanalizadores semiautomáticos por aquellos que pudieran ser controlados electrónicamente, así como el diseño y desarrollo de los "softwares" para el control automatizado, a través de un sistema de realimentación, o automático de los mismos. En ambos casos, se han obtenido unos instrumentos de análisis capaces de trabajar de manera autónoma, que proporcionan una sensibilidad, precisión y rendimiento de muestreo adecuados para las aplicaciones perseguidas.

Por último, en la segunda parte de la Tesis, se ha llevado a cabo el diseño y optimización de un sistema de análisis de flujo en continuo basado en el empleo de una sonda de microdiálisis, como dispositivo de muestreo, y de un biosensor enzimático amperométrico de glucosa para el análisis directo de este azúcar en frutas en estado natural. Así, se ha desarrollado un método de análisis *in vivo* no destructivo, sencillo, rápido y de bajo coste, en el que el sistema bioanalizador semiautomático ofrece unas características operacionales adecuadas para el análisis de glucosa en una gran variedad de frutas gracias al amplio rango lineal de concentraciones que presenta. La sencillez del método desarrollado, así como del diseño del sistema de flujo empleado, hace del bioanalizador de glucosa un desarrollo fácil de adaptar a un sistema de análisis automatizado.

ii. SUMMARY

In the food industry, the importance of automation has increased dramatically in recent years due to the need to monitor, at low cost, and with minimal delay time and the greatest possible degree of reliability, certain chemical parameters that not only enable the control of a manufacturing or ripening process but also the final product in order to maintain quality standards that characterize some food products. Analytical methods traditionally used in the industry sometimes do not facilitate to perform continuous monitoring because they are expensive, require skilled operators and, in most cases, pretreatment of samples, making analysis time increase. Thus, the development of innovative instrumentation systems, which allow carrying out the analysis of the composition and properties of fresh and processed products, such as process analyzers, has become a driving element for the development and establishment of advanced maintenance strategies. These monitoring systems allow better control and anticipation in the industrial activities and the engineering of automatization plays a major role in their development.

The progress of automation, one of the main areas of analytical chemistry, is inconceivable without rapid progress in computing. This science has allowed the automation of the various stages of the analytical process, helping to avoid errors associated with manual operations. Computing and modern analytical chemistry are so strongly interrelated that working in tandem in both disciplines is indispensable for the development of automatic and automated analyzers.

Biosensors represent very versatile analytical tools with enormous potential for application in food traceability, providing selectivity and speed to analysis methods. Therefore, this technology is useful for the development of bioanalyzers for determining of chemical parameters in the food industry, where it is necessary to ensure the greatest amount of information in the shortest possible time and, therefore, the analysis time and measurement accuracy play a key role.

The use of automatic and automated methods is linked to the concept of replacing a static measurement or operation, manually performed, by an operation or measurement carried out in a continuous or sequential manner. This has led to

analytical laboratories to devise flow analysis as an opportunity to improve. This type of analysis is a very important area of modern analytical chemistry, with the base flow techniques for the development of instruments classified as continuous analyzers in process automation instrumentation and analytical work.

This Doctoral Thesis, entitled "Automated bioanalyzers for continuous monitoring in process control in the food industry," describes the development and testing of new methods of automated and non-automated analysis based on flow analysis techniques and detection with amperometric enzymatic biosensors for the determination of analytes of interest in the food industry.

In the first part of this Thesis the design, development and optimization of continuous bioanalyzers for monitoring of chemical parameters in beer and wine were carried out. First, the development of semiautomatic bioanalyzers was performed, including: a continuous flow analysis system for the ethanol monitoring in "0.0" and free-alcohol beers without treating them, thanks to the implementation of a deaerator device and, as a sampling device, a gas diffusion unit; a flow injection analysis (FIA) system for the ethanol monitoring in "0.0" and free-alcohol beers, in which a gas diffusion unit was implemented to analyze samples without applying any previous dilution; a FIA system for L-malic acid analysis in wine, by developing an amperometric enzymatic biosensor for the analysis of this compound; and a FIA system based on the use of D-lactic acid and L-lactic acid amperometric enzyme biosensors for the simultaneous analysis of both isomers in beers, by developing firstly the biosensor for the D-isomer analysis. Experimental variables related to the operation of all components and devices involved were optimized for each semiautomatic bioanalyzer in order to obtain the highest selectivity, an appropriate sensitivity to the target application, and a high sampling throughput.

Then, ethanol and malic acid bioanalyzers automation was carried out, obtaining an automated prototype for on-line and off-line ethanol monitoring in low-alcohol beers and an automatic prototype for off-line L-malic acid analysis in wine. To do this, it was necessary to work in close collaboration with electronic and computer engineers. Thus, the mechanical and electronic design of the prototypes was performed, replacing components of the semiautomatic bioanalyzers by those which could be electronically controlled, and the design and development of

softwares for their automated control, through a feedback system, or automatic control. In conclusion, analytical instruments that are capable of working autonomously were obtained, providing appropriate sensitivity, precision and sampling throughput for pursued applications.

Finally, in the second part of the Thesis, the design and optimization of a continuous flow analysis system based on the use of a microdialysis probe, as sampling device, and an amperometric enzyme biosensor was carried out to analyze glucose in unprocessed fruits. Thus, a non-destructive, simple, fast and inexpensive *in vivo* analysis method was developed, in which the semiautomatic bioanalyzer system offers adequate operational characteristics for the glucose analysis in a broad variety of fruits thanks to the wide concentration linear range that presented. The glucose bioanalyzer is a development easy to adapt to an automated analysis system thanks to the simplicity of the developed method and the flow system designed.

1. Objetivos y plan de trabajo

Esta Tesis Doctoral tiene como fin contribuir al desarrollo de la química analítica orientada a la observación de los procesos industriales de producción tanto para mejorar el nivel de conocimiento y la eficiencia de éstos, como para el controlar la calidad de un producto, sujeta a regulaciones legislativas. Con el objetivo de mantener los estándares de calidad que caracterizan a algunos productos agroalimentarios, las industrias se plantean la necesidad de monitorizar, con el menor tiempo de demora posible y el mayor grado de fiabilidad, determinados parámetros químicos que permitan no sólo el control de su proceso de elaboración o maduración sino también del producto final, de modo que éste tenga el perfil organoléptico esperado.

Así, el objetivo principal de esta Tesis es el desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos de análisis automatizados y no automatizados, basados en técnicas de análisis en flujo y detección con biosensores enzimáticos amperométricos. Es decir, se ha llevado a cabo el desarrollo de bioanalizadores en continuo para la determinación de analitos de interés en la industria agroalimentaria, que cumplan los requerimientos demandados en la industria con respecto a sensibilidad, exactitud, precisión, robustez, sencillez, costes de operación y tiempos de análisis.

Asimismo, el objetivo general de esta Tesis Doctoral se subdivide en varios objetivos específicos, implicando, cada aplicación objetivo, un plan de trabajo y el logro de objetivos técnicos concretos.

En el **primer capítulo** de la Tesis se han diseñado, desarrollado y optimizado un bioanalizador automatizado de etanol, un bioanalizador automático de ácido L-málico y un bioanalizador semiautomático de ácido láctico, partiendo de sistemas de flujo manuales o semiautomáticos, para su posterior automatización en el caso pertinente. Así, los objetivos específicos y sus planes de trabajo son los que a continuación se indican:

Desarrollo de bioanalizadores semiautomáticos:

- **Diseño, desarrollo y optimización de un sistema de flujo en continuo y de un sistema FIA manuales para la monitorización de etanol en cervezas de baja graduación alcohólica sin dilución previa de las mismas, y en el caso del sistema de**

flujo en continuo además sin previa desgasificación, basados en el empleo de biosensores enzimáticos amperométricos de alcohol.

Para la consecución de este objetivo se ha aplicado el siguiente plan de trabajo:

- Diseño, desarrollo y optimización de distintos componentes y dispositivos de los sistemas de flujo que permitieran el análisis directo de cerveza.
- Optimización de las condiciones de trabajo de los sistemas de análisis en flujo.
- Evaluación de la estabilidad de los componentes desechables y de las características analíticas de los bioanalizadores semiautomáticos.
- Aplicación de los bioanalizadores para el análisis de etanol en muestras de cerveza.

• **Diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual para la monitorización de ácido L-málico en vinos**, basado en el empleo de un nuevo biosensor enzimático amperométrico de ácido L-málico.

Para la consecución de este objetivo se ha aplicado el siguiente plan de trabajo:

- Desarrollo de un nuevo biosensor de ácido L-málico: llevando a cabo la optimización de la composición y de las condiciones de trabajo del mismo.
- Evaluación de la estabilidad y de las características del biosensor desarrollado trabajando en amperometría en disoluciones agitadas.
- Aplicación del biosensor de ácido L-málico para el análisis de este analito en vinos.
- Implementación del biosensor desarrollado como detector en un sistema de análisis por inyección en flujo y optimización de las condiciones de trabajo del mismo.
- Evaluación de la estabilidad y de las características analíticas del bioanalizador semiautomático.
- Aplicación del bioanalizador para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino.

- **Diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual para la monitorización simultánea de los isómeros del ácido láctico en cervezas**, basado en el empleo de biosensores enzimáticos amperométricos de ácido D-láctico y de ácido L-láctico.

Para la consecución de este objetivo se ha aplicado el siguiente plan de trabajo:

- Desarrollo de un nuevo biosensor de ácido D-láctico: llevando a cabo la optimización de la composición y de las condiciones de trabajo del mismo.
- Evaluación de la estabilidad y de las características del biosensor desarrollado trabajando en amperometría en disoluciones agitadas.
- Aplicación del biosensor de ácido D-láctico para el análisis de este analito en cervezas.
- Implementación del biosensor desarrollado, junto a un biosensor de ácido L-láctico comercial, como detector en un sistema de análisis por inyección en flujo y optimización de las condiciones de trabajo del mismo.
- Evaluación de la estabilidad y de las características analíticas del bioanalizador semiautomático.
- Aplicación del bioanalizador para el análisis simultáneo del ácido D-láctico y del ácido L-láctico en muestras de cerveza.

Automatización de los bioanalizadores semiautomáticos:

- **Desarrollo de un bioanalizador automatizado para la monitorización "on-line"** (sin tratamiento previo de las muestras) **y "off-line"** (sin dilución previa de las muestras) **del etanol en cervezas de baja graduación alcohólica.**

- **Desarrollo de un bioanalizador automático para la monitorización "off-line" del ácido L-málico en vino.**

El plan de trabajo propuesto para la automatización de los bioanalizadores de etanol y de ácido L-málico ha sido:

- Diseño mecánico de los prototipos.
- Diseño electrónico de los prototipos.
- Diseño y desarrollo de los "softwares" de control de los prototipos.
- Evaluación de las características operacionales de los bioanalizadores.

- Validación de los prototipos mediante el análisis de muestras reales.

En el **segundo capítulo** de esta Tesis se ha **diseñado y optimizado un sistema de flujo en continuo basado en el empleo de una sonda de microdiálisis**, como dispositivo de muestreo, **y de un biosensor enzimático amperométrico de glucosa para el análisis de este analito en fruta fresca.**

Así, para la consecución de este objetivo, se ha llevado a cabo el siguiente plan de trabajo:

- Selección de la sonda de microdiálisis.
- Optimización de las condiciones de trabajo del sistema de análisis en flujo continuo.
- Evaluación de la estabilidad de los componentes desechables y de las características analíticas del bioanalizador.
- Aplicación del bioanalizador para el análisis de glucosa en fruta batida.
- Aplicación del bioanalizador para el análisis de glucosa en piezas de fruta.

2. Introducción general

2.1. BIOSENSORES EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

Un biosensor, de acuerdo con la definición de la IUPAC, es un dispositivo capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa usando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) que está en contacto directo con el elemento de transducción [Thévenot, 2001] (Figura 1).

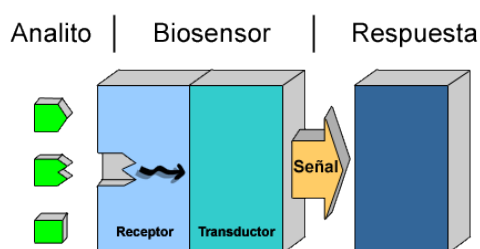


Figura 1. Esquema de un biosensor.

El principio de detección de un biosensor está basado en la interacción específica entre el analito de interés y el biocomponente de reconocimiento. Como resultado de esta interacción, se producen cambios en una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia electrónica, transferencia de calor, variación de las propiedades ópticas, etc...) que son detectados por un transductor [Velasco-García, 2003]. Este sistema de transducción transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica medible indicativa de la presencia del analito a estudiar o proporcional a la concentración de éste en la muestra [Serna, 2009].

Los biosensores representan, dentro de la química analítica, una herramienta versátil y alternativa a las técnicas clásicas gracias a las características que presentan y que resultan ventajosas en muchos campos de la analítica. La tecnología de los biosensores ha experimentado avances muy importantes en los últimos años con el objetivo de satisfacer las necesidades que han ido surgiendo en distintos ámbitos de la sociedad, como son biomedicina; industria alimentaria; medio ambiente; defensa; y otras industrias, que exigen disponer de dispositivos analíticos que sean fiables, exactos y, cada vez más demandado, que sean portátiles. Las ventajas

principales que presentan los biosensores son: alta selectividad y especificidad; bajos costes de preparación y almacenamiento; potencial para la miniaturización; facilidad de automatización y sencillez para su implementación en un dispositivo portátil [Mehrvan, 2004] [Monosik, 2012^C].

Los biosensores se pueden clasificar atendiendo a dos criterios principalmente: la naturaleza del proceso biológico que participa y el sistema de transducción. La elección del material biológico de reconocimiento y del transductor dependen de las propiedades de la muestra de interés y del tipo de magnitud física a medir [Mello, 2002].

Con respecto al tipo de biocomponente activo que interacciona con el analito, se pueden distinguir dos grandes grupos [Pingarrón y Sánchez Batanero, 1999]:

- *Biosensores catalíticos*: basados en una reacción catalizada por macromoléculas, las cuales pueden estar presentes en su ambiente biológico o pueden haber sido aisladas y modificadas. Las más utilizadas son enzimas, microorganismos (bacterias, hongos, células eucariotas, levaduras), orgánulos de células y tejidos de plantas y animales.
- *Biosensores de afinidad*: basados en la interacción de los analitos con macromoléculas o grupos de moléculas organizadas que han sido aisladas de su ambiente biológico. Entre ellos se encuentran los inmunosensores, genosensores y los basados en quimiorreceptores.

En la práctica, la elección del biocomponente a inmovilizar depende de las características de la especie objeto de estudio, y éste determinará el grado de selectividad o especificidad proporcionado por el biosensor [Melo Ferreira, 2010].

Los biosensores mejor conocidos y más aplicados son los que se basan en el uso de biocatalizadores. Estos biocatalizadores son elementos capaces de producir una reacción química sin consumo del biocatalizador, que puede ser regenerado y utilizarse de nuevo. Se pueden emplear para detectar la presencia de cualquiera de los sustratos implicados en la reacción, la monitorización de la desaparición de un co-sustrato o la aparición de un producto [Mehrvan, 2004].

Dentro de los denominados biosensores catalíticos, los más utilizados son los **biosensores enzimáticos** [Terry, 2005]. Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en los seres vivos. En estas reacciones, se produce la unión del sustrato en una región concreta de la enzima denominada centro activo, que comprende un sitio de unión y un sitio catalítico. La actividad enzimática está controlada normalmente por el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de cofactores [Cox, 2009]. Alguna o todas las especies implicadas en la reacción catalítica pueden ser detectadas por medios físico-químicos generando señales que, convenientemente tratadas, proporcionan la información requerida del analito en cuestión. En ocasiones se utilizan cascadas multienzimáticas, en las que la enzima que actúa como elemento de reconocimiento no lo hace directamente sobre el analito, sino sobre algún producto derivado del mismo [Serna, 2009]. La reacción catalítica enzimática se caracteriza por ser eficiente y extremadamente selectiva, por lo que se combinan dos factores de reconocimiento particular y de amplificación necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas de este tipo de sensores.

El buen funcionamiento de un biosensor depende, en gran medida, de la metodología empleada para inmovilizar el elemento de reconocimiento sobre el transductor. El objetivo de la inmovilización es favorecer un contacto íntimo entre el biorreceptor y el transductor de manera que se mantenga inalterable, en la medida de lo posible, la estabilidad y la actividad biológica de dicho sistema de reconocimiento [Mello, 2002]. De este modo, los tiempos de vida útil y almacenamiento del biosensor se verán prolongados [Prodromidis, 2002]. Los métodos de inmovilización utilizados se pueden diferenciar entre físicos y químicos:

a) *Métodos físicos*: no requieren la modificación química del componente biológico. Estos métodos son la adsorción y el atrapamiento. Asimismo, dentro del atrapamiento se pueden encontrar el atrapamiento polimérico, la inclusión en la matriz del transductor y el encapsulamiento en una membrana.

b) *Métodos químicos*: estos métodos están basados en la reacción entre grupos funcionales del elemento biológico no esenciales para su actividad catalítica y grupos reactivos de la superficie soporte. Estos métodos son la unión covalente y el entrecruzamiento.

La selección del método de inmovilización depende de la naturaleza del elemento biológico, el tipo de sistema transductor a utilizar, las propiedades físico-químicas del analito y las condiciones de trabajo del biosensor. Así, el grado de estabilidad obtenido en la inmovilización determina la sensibilidad y la fiabilidad de la señal del biosensor [Mehrvan, 2004].

Con respecto al empleo de membranas, esta metodología de inmovilización previene que compuestos interferentes electroquímicamente alcancen la superficie del electrodo. Además, puede ser útil para crear una barrera de difusión entre la enzima y el sustrato, evitando el ensuciamiento del sensor por parte de componentes de la matriz de la muestra y, de este modo, permitiendo obtener una respuesta lineal con la concentración. Asimismo, se evita la contaminación de la disolución de muestra por parte del biosensor. Por otro lado, el empleo de una matriz compósita, como es el grafito-Teflón, posibilita obtener una alta proximidad entre el sitio de detección y el biocatalítico; incorporar otros componentes, como el mediador; renovar fácilmente la superficie sensora; una fabricación fácil y no costosa del biosensor; y una alta estabilidad del elemento de reconocimiento [Serra, 2007] [Terry, 2005].

Por último, con respecto al sistema de transducción, en función del tipo de cambio físico-químico monitorizado se pueden encontrar biosensores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos y térmicos. El transductor más empleado en la fabricación de biosensores es el electroquímico, debido a la sencilla instrumentación que conlleva y a su alta aplicabilidad [Mao, 2008].

Un **biosensor electroquímico**, de acuerdo con la definición de la IUPAC, es un dispositivo integrado que es capaz de proporcionar de manera específica una respuesta analítica cuantitativa o semicuantitativa empleando un receptor bioquímico que se encuentra retenido y en contacto directo con el elemento de transducción. Los dispositivos electroquímicos son especialmente útiles en el desarrollo de biosensores, debido a que combinan la especificidad dada por los sistemas biológicos con las ventajas de los transductores electroquímicos. De modo que, este tipo de sensores, proporcionan una respuesta rápida, son económicos, presentan posibilidad de miniaturización y facilidad para la automatización, pueden

trabajar en medios turbios y poseen una sensibilidad adecuada para la medida de un analito en la matriz de una muestra [Mello, 2002].

En el contexto de los biosensores electroquímicos, los más empleados son los **biosensores amperométricos** [Terry, 2005], los cuales monitorizan las corrientes faradaicas que se producen en el intercambio de electrones entre el sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial apropiado constante. Estos dispositivos, dentro de la electrónica biomolecular, son los más numerosos y comercializados con éxito porque presentan características ventajosas como son sensibilidad, robustez, rapidez de respuesta, bajo coste y facilidad de implementación fuera del entorno del laboratorio [Dzyadevych, 2008]. Dentro de los biosensores amperométricos, los más empleados son los enzimáticos [Castillo, 2004], para los que la estabilidad a largo plazo depende del modo en que se da la transferencia electrónica entre la enzima redox y la superficie del electrodo. El empleo de agentes de transferencia de electrones (mediadores) eliminan la necesidad de oxígeno, reducen al mínimo los efectos de las interferencias, reducen el potencial de trabajo del electrodo y mejoran el rango de linealidad y sensibilidad [Prodromidis, 2002]. Los mediadores participan en las reacciones redox con componentes biológicos facilitando la rápida transferencia de electrones desde el centro redox de la enzima a la superficie del electrodo indicador [Chaubey, 2002]. Así, los mediadores se seleccionan de manera que su potencial redox es más bajo que el de las otras especies electroquímicamente activas en la muestra, que actuarían como interferencias. La selectividad de los dispositivos amperométricos se rige por el potencial redox de las especies electroactivas presentes [Mello, 2002], aunque también puede ser controlado mediante una modificación de la superficie del electrodo con bio(nano)materiales [Escarpa, 2012]. Por lo tanto, los biosensores amperométricos enzimáticos se pueden dividir principalmente en tres clases [Dzyadevych, 2008]:

- Biosensores amperométricos sin mediador, basados en la medida de la concentración de sustratos naturales y productos de reacción de la enzima.
- Biosensores amperométricos que utilizan mediadores como portadores de electrones del centro activo de la enzima al electrodo.

- Biosensores amperométricos basados en la transferencia electrónica directa entre la enzima y el electrodo.

Los tipos de enzima más frecuentemente empleados para el desarrollo de biosensores amperométricos son las oxidasas, deshidrogenasas y deshidrogenasas independientes del cofactor NAD^+ , debido a que los productos de estas reacciones enzimáticas son electroactivos.

En la industria alimentaria la calidad de un producto se evalúa periódicamente a través de controles químicos y microbiológicos. Disponer de un adecuado sistema de monitorización y de análisis de la composición y de las propiedades de productos frescos y elaborados es esencial para el control de la calidad y seguridad alimentarias, existiendo un interés creciente, tanto por parte de la industria como por los consumidores, en estos conceptos [Melo Ferreira, 2010]. En este sentido, cabe destacar la importancia de llevar a cabo análisis no sólo en los mecanismos de control del proceso productivo, sino también en el producto final, es decir, desde la producción primaria hasta la distribución final al consumidor, pasando por los procesos de transformación, tanto desde el punto de vista de la calidad como de la seguridad alimentaria. La duración de un análisis y la exactitud de las medidas juegan un papel fundamental en estos casos y, por ello, los biosensores suponen herramientas analíticas muy versátiles con un enorme potencial de aplicación a la trazabilidad alimentaria [Castillo, 2004] [Monosik, 2012^C] [Serra, 2007]. Los métodos de análisis tradicionalmente empleados en la industria (en los que se trabaja con cromatografía, electroforesis, o espectrometría) en ocasiones no facilitan llevar a cabo una monitorización continua al resultar costosos, requerir operarios cualificados y, en la mayor parte de los casos, pretratamiento de las muestras, haciendo aumentar los tiempos de análisis [Castillo, 2004]. Las aplicaciones de los biosensores a la industria agroalimentaria abarcan la práctica totalidad de la cadena alimentaria. La capacidad de procesamiento y tratamiento de la información permite su fácil incorporación a sistemas de control integrados, siendo el formato de sistemas biosensores integrados el más atractivo para el mercado [Velasco-García, 2003].

Las aplicaciones actuales de los biosensores en el ámbito agroalimentario se orientan hacia las siguientes áreas principales:

- *Seguridad alimentaria:* concepto que implica garantizar la producción y comercialización de alimentos que no supongan un riesgo potencial para la salud del consumidor. En esta área se lleva a cabo la monitorización de compuestos xenobióticos, biotoxinas y microorganismos patógenos [González, 2005].
- *Calidad alimentaria:* se puede entender como aquellos factores que diferencian los productos de acuerdo con sus características organolépticas (color, sabor, textura...), de composición (nutricional) o con sus propiedades funcionales. El estudio de la composición de los alimentos permite caracterizarlos y comprobar si contienen las cantidades adecuadas de los distintos componentes, y también conocer la frescura y la vida útil de algunos productos, como carnes, pescados, frutas y verduras [Serna, 2009].
- *Control de procesos industriales:* el objetivo de esta actividad es producir de manera eficiente y efectiva un producto deseado de una manera segura y rentable [Kumar, 2011]. Asimismo, conlleva el empleo de sistemas de monitorización continua que permitan detectar en tiempo real los posibles errores de la cadena de producción para subsanarlos de manera inmediata. Hasta el momento, dichos sistemas se han utilizado en el control de parámetros como el pH, la temperatura, la presión, etc. Gracias a las tecnologías de los biosensores ahora también pueden determinarse y cuantificarse "on-line" compuestos de gran importancia que participan en procesos fermentativos y de elaboración alimentaria [Melo Ferreira, 2010].

Dentro del campo de los biosensores, son los biosensores amperométricos enzimáticos los más empleados en el análisis en la industria alimentaria [Terry, 2005]. Considerando las múltiples aplicaciones que ofrecen estos dispositivos para la realización de análisis en este sector, a continuación se indican las características atractivas que presentan [González, 2005]:

- Alta sensibilidad para la detección de analitos de interés en la industria.
- Alta selectividad: el dispositivo interacciona exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares.
- Alta fiabilidad: los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra y no tengan problemas de ruidos y sean robustos.
- Posible reutilización para determinaciones consecutivas gracias a las superficies de interacción regenerables, como sucede por ejemplo con los biosensores que emplean matrices compósitas.
- Bajo coste de preparación: estos sistemas, de manera general, pueden fabricarse a escala industrial, lo cual contribuiría a un considerable abaratamiento de los costes de producción globales. A pesar de ello, la disponibilidad limitada de algunas enzimas y la existencia de fases críticas en su preparación (procesos de inmovilización) dificultan, en algunos casos, la fabricación de los biosensores en masa.
- Tiempo de análisis corto que posibilitaría una actuación rápida, por ejemplo, la retirada de materias primas o productos contaminados o deteriorados antes de su uso o venta, o la intervención para corregir algún parámetro en un proceso industrial. Muchos biosensores consumen pocos minutos en cuantificar el compuesto de interés y no precisan un periodo de espera largo hasta el siguiente análisis.
- Pretratamiento de la muestra innecesario, lo que supone un ahorro de tiempo, materiales y reactivos. En ocasiones, ofrecen una oportunidad de metodología no destructiva.
- Manejo sencillo: estas tecnologías no requieren personal cualificado.
- Versátiles en cuanto a su empleo, pudiendo trabajar tanto en sistemas en discontinuo como en sistemas de flujo.
- Capaces de realizar análisis en tiempo real; esta característica es especialmente interesante en el control de procesos, ya que permite

controlar los parámetros deseados de forma inmediata y automática, e incluso posibilitar el control "on-line" en procesos de fermentación.

- Portátiles, lo que hace posible realizar análisis *in situ*.
- Automatizables: permiten prescindir del control manual de estas unidades facilitando su integración dentro de los sistemas que monitorizan los procesos industriales.
- Miniaturizables: gracias a los desarrollos en microelectrónica y nanotecnología se han logrado reducir las dimensiones de estos dispositivos. Así, pueden ensamblarse varios de ellos en un mismo sistema de análisis que realiza varias tareas a la vez, y son aplicables a ensayos donde el tamaño físico del dispositivo, el volumen de la muestra o la localización de la medida son factores limitantes.
- Pocos requerimientos operativos y de almacenamiento que facilitan su empleo y no suponen un coste adicional, aunque puede haber dispositivos en los que los componentes biológicos pueden necesitar condiciones controladas (pH, temperatura) para su uso y conservación debido a su baja estabilidad.
- Con capacidad multianálisis: es posible llevar a cabo la determinación de diferentes analitos de forma simultánea mediante el empleo de biosensores multienzimáticos, o a través del empleo de varios biosensores acoplados en un mismo sistema de trabajo. Asimismo, también es posible el empleo de sistemas multisensores consistentes en el empleo de transductores electroquímicos de varios canales.

La combinación de varias de estas características puede situar a muchos biosensores en una posición ventajosa frente a las técnicas de análisis convencionales usadas en la industria, como son la cromatografía o la espectrometría. La única característica que podría considerarse aún una tarea pendiente para este tipo de tecnología y, de hecho, continua siendo un "handicap" de cara a una amplia comercialización, es que este tipo de dispositivos analíticos presentan un tiempo de vida útil no muy largo. Este tiempo debería ser suficiente

de manera que el dispositivo no obligue a su empleo tras un corto periodo desde su fabricación, ni a sustituciones frecuentes del mismo si ha sido integrado en la línea de producción de una industria. La estabilidad química, física y mecánica del biocomponente de reconocimiento (la enzima) es el elemento condicionante de su duración, y los componentes biológicos, por su propia naturaleza, cuentan con una vida media limitada [Serra, 2007]. Sin embargo, según la aplicación a la que se destinen, las prestaciones exigidas a los biosensores son distintas. Por tanto, su viabilidad como sistemas analíticos frente a los procedimientos habituales y sus posibilidades comerciales varían en cada situación.

2.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS EN FLUJO: HERRAMIENTA CLAVE PARA LA AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA

El incremento de la demanda de controles analíticos en áreas como la salud, el medio ambiente o la alimentación, junto con la necesidad de desarrollar metodologías que proporcionen una mejora de la calidad de las determinaciones analíticas, ha hecho surgir la necesidad de automatizar los procesos analíticos. Dependiendo del área de aplicación, existe un mayor interés en desarrollar tecnologías que posibiliten disminuir los tiempos de análisis, bajar el límite de detección, o determinar de manera simultánea varios analitos [Trojanowicz, 2013]. Además, la reducción de la participación humana en los procedimientos analíticos es uno de los principales objetivos de la química analítica, y el empleo de métodos automáticos y automatizados va ligado al concepto de sustitución de una operación o medida estática, realizadas manualmente, por una operación o medida realizadas de manera continua o secuencial [Cañizares, 2002]. Estos requerimientos han propiciado que los laboratorios de analítica conciban al análisis en flujo como una oportunidad para innovar [Prodromidis, 2004]. Asimismo, la búsqueda, tanto por parte de los laboratorios de investigación como industriales, de las ventajas económicas que reporta a medio y largo plazo la implementación de sistemas

automatizados, así como la posibilidad de disponer comercialmente del instrumental necesario para los desarrollos, han servido de motor para la mejora e innovación de las técnicas de análisis en flujo en química analítica [Manera, 2007].

El análisis en flujo, hoy día, es un área muy importante de la química analítica moderna, siendo las técnicas en flujo la base para el desarrollo de analizadores en continuo en procesos de instrumentación y automatización del trabajo analítico [Trojanowicz, 2013]. Los métodos de análisis en flujo, y en concreto las metodologías FIA, han permitido establecer procedimientos únicos y novedosos que, en muchos casos, no son factibles mediante las metodologías tradicionales en discontinuo [Hansen, 2007], y además se han introducido ampliamente como métodos estándares internacionales de análisis [Chalk, 2008]. Este tipo de análisis, asimismo, se puede considerar como la parte más importante dentro de la química de flujo, ya que la información analítica es obtenida por la medida en continuo de las propiedades físicas o químicas objeto de estudio [Horstkotte, 2008].

Las técnicas de análisis en flujo son metodologías útiles para la automatización y miniaturización de métodos analíticos bien establecidos, proporcionando ventajas tales como:

- Un incremento del rendimiento analítico: posibilitan llevar a cabo un mayor número de medidas en un menor tiempo al verse aumentada la velocidad del procedimiento de análisis. Esto conlleva un menor coste que las metodologías en discontinuo [Ródenas, 2006].
- Una alta versatilidad: los sistemas de flujo proporcionan flexibilidad para combinar diferentes elementos de detección biosensora con diferentes transductores (amperométricos, espectrofotométricos, potenciométricos, etc.), además de permitir el empleo de ambos componentes espacialmente separados o integrados en un dispositivo único. Además, pueden ser adaptados al rango de concentración del analito a monitorizar [Kumar, 2011].
- Una alta robustez: las técnicas en continuo facilitan el acoplamiento en línea de procesos de tratamiento de muestra (dilución, destilación, extracción, etc.), favoreciendo la obtención de un método que aporte precisión, exactitud y rapidez, objetivo en la automatización del proceso analítico [Cañizares, 2002].

- Nuevas mejoras analíticas basadas en modos de operación no estacionarios: las técnicas en flujo posibilitan llevar a cabo un control preciso de parámetros y procesos analíticos como son el tiempo de reacción, la mezcla rápida de reactivos, la manipulación sencilla de disoluciones que contienen gases o reacciones en multifase líquida [Trojanowicz, 2013].
- Una disminución del tiempo de exposición del analista a tratamientos de muestra químicos/físicos: las técnicas en flujo posibilitan reducir la interacción del operador con las muestras, evitando tener que realizar manipulaciones tediosas o incluso peligrosas de las mismas [Maya, 2010].
- Procedimientos analíticos más ecológicos: las técnicas en continuo permiten la reducción del consumo de reactivos, con el consiguiente beneficio medioambiental y económico [Armenta, 2008].

Este tipo de técnicas de análisis, de manera general, están constituidas por una serie de componentes como son bombas, válvulas, tubos, un controlador del detector y un procesador de datos, siendo el sistema más sencillo concebido el representado por el transporte de la muestra a una célula de flujo [Vojinovic', 2007].

Estas técnicas implican la inserción, de manera reproducible, de un volumen de muestra en una corriente de flujo propulsada por una bomba peristáltica. En función de cómo es medido ese volumen, se puede trabajar con una inyección basada en el volumen de muestra o con una inyección basada en el tiempo de introducción de la misma. En el primer caso, se lleva a cabo la introducción en el sistema de flujo de un volumen de muestra determinado por las dimensiones de un bucle de muestreo, y en el segundo caso se requiere el empleo de válvulas dispuestas en una configuración tal que permita introducir y dirigir la muestra por el sistema, y, posteriormente, introducir el portador para el arrastre de la muestra hasta el detector y la limpieza del sistema [Cerdá, 2008]. De este modo, trabajando con sistemas de flujo en continuo, es posible obtener señales analíticas con forma de pico o rectangulares, cuyas características de área, altura o anchura se pueden correlacionar con la concentración de un analito [Horstkotte, 2008]. La estrategia de inserción de la muestra en el sistema de flujo condiciona la sensibilidad, selectividad, exactitud, precisión, rendimiento, consumo de muestras y reactivos, volumen de desecho producido, grado de robustez, capacidad de monitorización, y

capacidad de automatización y/o miniaturización proporcionada por una técnica. Por lo tanto, el grado en que es adecuada una técnica de flujo para un determinado tipo de análisis/multianálisis depende de las características que ésta proporciona. Asimismo, estas técnicas de análisis posibilitan la obtención de variantes adecuadas para cada aplicación objetivo, a través de la introducción de modificaciones sobre sistemas ya establecidos [Cerdá, 2008].

Las diferentes metodologías para la propulsión e introducción de muestra, y los distintos esquemas de operación y características del flujo, han desembocado en la aparición de distintos sistemas de análisis en continuo. De manera general, éstos pueden clasificarse, según el proceso de muestreo, en continuos o discretos, y según las características del flujo, en segmentados o no segmentados [Ródenas, 2006]. De este modo, se pueden encontrar las siguientes técnicas de análisis en flujo respondiendo a los criterios indicados:

- **Análisis en flujo continuo (CFA):** estos sistemas se caracterizan por emplear válvulas de tres vías para dirigir y controlar el paso de disolución portadora y de muestra. En esta técnica, la muestra se introduce en el sistema de flujo de manera ininterrumpida con la ayuda de una bomba peristáltica [Vojinovic', 2007] y, en función del tiempo de inserción, se registra un tipo de señal analítica. Así, para tiempos de inserción largos, el sistema proporciona una señal analítica medida en estado estacionario al alcanzar el detector [Hansen, 2009]. Para tiempos cortos, la medida no se realiza en estado estacionario, siendo en estos casos necesario controlar y optimizar los tiempos de introducción de muestra en el sistema, además del caudal de flujo empleado [Vargas, 2013]. En este caso, se trabaja con un método cinético de tiempo fijo y, en consecuencia, el tiempo de operación ha de ser muy reproducible, ya que las medidas no se realizan en régimen de equilibrio. Asimismo, con este modo de introducir la muestra, la frecuencia de muestreo no tiene por qué ser baja. Esta técnica proporciona una baja dispersión de la muestra durante el camino analítico hasta el detector y, de manera general, se emplea para la monitorización de una única muestra a la vez. Resulta adecuada para la monitorización de procesos industriales que requieran un control continuo, en los que la muestra es abundante y no muy costosa [Cerdá, 2008] [Vojinovic', 2007].

Además, los sistemas de flujo que se basan en esta técnica, presentan una configuración simple con respecto al esquema de operación, facilitando trabajar con estos. Para su montaje se necesita una instrumentación sencilla y poco costosa de uso común en los laboratorios de química.

- **Análisis en flujo segmentado (SFA):** el sistema empleado comprende varios canales para la circulación de aire, disolución portadora, muestra y reactivos. Las muestras se introducen en el sistema de manera secuencial y son segmentadas por burbujas [Vojinovic', 2007]. La segmentación tiene la función de favorecer el mezclado entre las disoluciones de muestras y reactivos en el curso del flujo, gracias al flujo turbulento que se genera, y aislarlas de la disolución portadora para evitar una dispersión excesiva de la muestra en la corriente [Ródenas, 2006], el efecto memoria y la contaminación entre diferentes muestras [Cañizares, 2002]. Este tipo de sistemas permite que la zona de muestreo pueda mantenerse en el reactor por un largo intervalo de tiempo para garantizar que se alcance el estado de equilibrio de una reacción [Ródenas, 2006]. Las burbujas de aire son eliminadas antes de que alcancen el detector mediante un dispositivo adecuado para esta función [Cañizares, 2002]. Esta técnica se caracteriza por trabajar con señales analíticas cuadradas, ya que son medidas en el estado estacionario [Cerdá, 2008]. En función de la cantidad de burbujas que acompañe al bolo de muestra, se puede obtener un sistema de mono o multisegmentación. Esta metodología de análisis es útil para aquellas aplicaciones en las que se debe llevar a cabo una reacción en línea. La adquisición de instrumentación y tecnología adecuadas puede resultar complicado y su mantenimiento caro [Ródenas, 2006].

- **Análisis por inyección en flujo (FIA):** en esta técnica, las muestras se procesan individualmente, evitando problemas relativos a la contaminación entre las disoluciones de muestra, ya que se intercala un volumen discreto de la misma en la corriente de portador mediante una válvula de inyección. Con esta técnica, las medidas se realizan sin alcanzar el equilibrio químico (no se alcanza el estado estacionario durante la medida de la señal analítica) y la señal analítica tiene forma de pico [Trojanowicz, 2013]. De este modo, posibilitan obtener una frecuencia de muestreo mayor que con las anteriores técnicas en flujo descritas y reducir el

consumo de muestras y reactivos [Vojinovic', 2007]. En estos sistemas, la dispersión o dilución de la muestra se puede controlar, en función de las condiciones de trabajo hidrodinámicas, al establecerse un régimen de flujo laminar. Dichas condiciones hacen que se produzca una zona de muestra bien definida generando, durante el transporte de las disoluciones, un gradiente de concentración constante a lo largo de todo el bolo [Cañizares, 2002]. Estas condiciones de trabajo propician obtener una buena reproducibilidad de las medidas [Hansen, 2009]. Esta metodología ha servido de base para el desarrollo de otras técnicas en continuo, introduciendo mayor complicación tecnológica, como son el análisis por flujo multiconmutado (MCFIA) [Llorent-Martínez, 2013] o el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) [Pons, 2004]. Las ventajas más sobresalientes que presentan los sistemas FIA son su configuración extremadamente simple y versátil, fácil manipulación y bajo precio del dispositivo instrumental, además de que, con el empleo de una válvula de inyección, el muestreo se ve simplificado. Asimismo, la respuesta rápida y precisa proporcionada por el sistema FIA permite disponer de la información analítica en tiempo real [González, 2003], y posibilita realizar determinaciones multiparamétricas sin necesidad de acoplarlo a sistemas de separación (cromatografía o electroforesis), ya sea utilizando un único caudal de flujo a través de un multidetector o varios sistemas de detección colocados en serie, o incluso introduciendo bifurcaciones en el sistema [Cerdá, 2008] [Trojanowicz, 2013].

- **Análisis por inyección secuencial (SIA):** trabajando con esta técnica, que se puede considerar derivada del FIA, las muestras se introducen en el flujo portador de manera secuencial y, para ello, se requiere el empleo de una válvula de selección multipuerto o válvula multiposición de alta precisión [Pérez-Olmos, 2005]. Esta metodología resulta muy útil en aplicaciones en las que se debe llevar a cabo un análisis multianalito, ya que facilitan el acoplamiento de varios detectores a un mismo sistema [Trojanowicz, 2013], o llevar a cabo análisis complejos que requieren el empleo de varios reactivos [Vojinovic', 2007]. A partir de esta metodología se han desarrollado sistemas de mayor complejidad tecnológica como por ejemplo los "Lab-on-valve" (LOV) [Wang, 2003]. Esta técnica se caracteriza por ser robusta, relativamente sencilla, flexible y fácil de automatizar [Cerdá, 2008], aunque presenta

la dificultad de necesitar instrumentación y equipación de mayor coste y complejidad con respecto a otras técnicas en flujo [Vojinovic', 2007]. Aun así, su empleo y desarrollo en los laboratorios está muy extendido.

- **Sistemas de flujo multibomba (MPFS):** estos sistemas están definidos por el empleo de una serie de microbombas solenoides que actúan a la vez de sistema propulsor de líquidos y de válvula de conmutación, es decir, en vez de emplear bombas peristálticas como dispositivos propulsores de flujo, estas microbombas trabajan como unidades dispensadoras de líquidos. Estas bombas se caracterizan por dispensar microvolúmenes prefijados de líquido, viniendo ya calibradas de fábrica [Manera, 2007], y la hidrodinámica relacionada con su funcionamiento se define por establecerse un régimen turbulento, facilitando la mezcla de reactivos y muestras [Horstkotte, 2008]. Este tipo de sistemas suelen estar destinados a aplicaciones de microfluídica, en cuyo caso se requiere el control estricto de variables que puedan afectar al buen funcionamiento del sistema, como son las sobrepresiones y los volúmenes muertos [Lima, 2004]. Esta tecnología se ha empleado sobre todo para el desarrollo de dispositivos portátiles [Cerdá, 2008].

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han seleccionado las técnicas de análisis en flujo en continuo y FIA. Ambas se basan en una tecnología e instrumentación sencillas, de bajo coste, y fáciles de adquirir, y además presentan versatilidad y flexibilidad con respecto al desarrollo y diseño de diferentes esquemas de operación en función de la aplicación objetivo. Por lo tanto, son técnicas que permiten desarrollar sistemas de flujo que no presenten una alta dificultad para su mecanización y automatización. Además, se debe tener en cuenta que la precisión que se consigue trabajando con estas técnicas, y la robustez que proporcionan, es el resultado de la simplicidad del sistema diseñado. Los dispositivos y componentes que se utilizan para el manejo de las disoluciones, influyen considerablemente en la robustez, precisión, características y resistencia química del sistema analítico y la técnica aplicada.

2.2.1. Las técnicas de análisis en flujo en la monitorización y control de procesos

Los sistemas analíticos destinados a la monitorización de un proceso industrial deben diseñarse de manera que se puedan integrar y acoplar fácilmente con sistemas y dispositivos para operaciones en continuo de muestreo, y, además, puedan implementarse con otros sistemas de medida y control [Kumar, 2012]. Así, la monitorización de procesos requiere el empleo de sistemas de medida continuos, reproducibles y robustos que permitan minimizar posibles errores durante el procedimiento analítico, así como los tiempos de análisis, de modo que se pueda obtener de manera rápida y fiable información sobre un proceso y llevar a cabo mejoras del mismo. Las técnicas de análisis en flujo, aplicadas a la monitorización de procesos, resultan ser muy valiosas, no sólo porque simplifican las operaciones de un análisis, sino también porque aportan robustez al posibilitar que las medidas se puedan llevar a cabo en unas condiciones de independencia del analista [Lamberti, 2012]. Así, por ejemplo, dentro del campo de análisis de alimentos, existe la necesidad de disponer de métodos rápidos y no costosos, haciendo surgir la oportunidad de medir analitos mediante técnicas en continuo [Prodromidis, 2002]. En esta industria, donde el pretratamiento de la muestra suele ser laborioso y pueden producirse errores significativos en la cuantificación de los analitos, las determinaciones FIA se postulan como una alternativa idónea [Cañizares, 2002].

La posibilidad que ofrecen las técnicas FIA, y las técnicas de análisis en flujo en general, aplicadas a la monitorización de un proceso, es el control, desarrollo y optimización del mismo. Durante mucho tiempo, en la mayoría de los procesos industriales, se ha realizado un seguimiento "off-line" en el laboratorio, a partir de muestras extraídas del área de proceso. Sin embargo, para poder llevar a cabo una monitorización y control eficientes de un proceso se deben considerar parámetros cruciales como son el tiempo de demora para la obtención de información analítica del mismo, el grado de fiabilidad de dicha información y el número de medidas de muestras necesario para componerla [Hansen, 2009]. Los sistemas de inyección en flujo están adaptados a los análisis para el control de procesos gracias a su capacidad para proporcionar tiempos de respuesta cortos, y ser comparativamente fáciles de automatizar y miniaturizar [Kumar, 2012] y, por ello, la técnica FIA es la

más empleada para la monitorización "on-line" de procesos. Además, las técnicas en flujo facilitan un entorno de análisis caracterizado por una exacta repetitividad para el proceso analítico (condiciones favorables para operaciones como puede ser la mezcla reproducible de reactivos) al tratarse de sistemas cerrados en los que no se da la fuga de fluidos. Con respecto al detector, este tipo de sistemas posibilitan que éste pueda ser protegido de sufrir fenómenos de ensuciamiento por compuestos interferentes ya que, en función de la metodología de trabajo, el tiempo de contacto del sensor con la muestra es limitado [Terry, 2005].

Sin embargo, su aplicación en el sector de la producción industrial todavía no es amplia debido a la falta de sistemas de detección en continuo que permitan llevar a cabo la supervisión y control de procesos, y que tengan además capacidad de corrección [Kumar, 2011]. Así, durante el control automatizado de un proceso analítico, es necesario que estos sistemas puedan llevar a cabo recalibraciones o chequeos de la curva de calibrado a los intervalos de tiempo requeridos [Hansen, 2009].

2.2.2. Biosensores amperométricos como detectores en los sistemas de análisis en flujo

Los biosensores electroquímicos son una herramienta interesante de la química analítica al ofrecer la posibilidad de combinar la capacidad analítica de las técnicas electroquímicas con la especificidad de los procesos de reconocimiento biológico. Dentro de éstos, los biosensores amperométricos se han utilizado cada vez más para las monitorizaciones "on-line" [Lamberti, 2012].

Normalmente, un sistema de inyección en flujo con detección amperométrica se diseña en base a una configuración sencilla de una sola línea, cuyos componentes son una bomba peristáltica, una válvula de inyección y el sensor amperométrico. Una de las partes más importantes de este tipo de sistemas es la célula electroquímica de flujo, que es el lugar donde se ubican los electrodos. Existen varias configuraciones comerciales de células de flujo, tales como "wall-jet", "thin-layer" y "flow-through", aunque el coste de desarrollo de un sistema de

análisis en flujo se puede reducir mediante el uso de un diseño "homemade" [Chailapakul, 2006]. Con respecto a la detección, cuando la muestra alcanza la célula de flujo, tiene lugar una reacción electroquímica dentro de dicho dispositivo en el que el analito (especie electroactiva) se somete al proceso electrodo y la corriente resultante se detecta electrónicamente [Kumar, 2011]. En el caso de trabajar con un sistema FIA, ni el equilibrio físico (homogeneización de la porción de fluido) ni el químico (equilibrio de la reacción) se alcanzan en el momento de la detección [Cañizares, 2002], configurándose, por tanto, como un método cinético de tiempo fijo en el que el tiempo de operación es muy reproducible y las medidas se realizan con una precisión y rapidez altas [González, 2003]. La respuesta amperométrica, trabajando con un sistema en continuo, es estable y suficientemente rápida como para mostrar cambios en la intensidad de corriente ocurridos como resultado de la presencia de analito en la disolución portadora, proporcionando señales bien definidas que pueden distinguirse de la corriente de fondo. Además, en función de la metodología de inserción de la muestra en el sistema, se puede tener una alta frecuencia de muestreo, ya que las respuestas se pueden obtener en menos tiempo que en disoluciones agitadas, al no ser necesario medir la señal en estado estacionario.

Cuando se emplea un biosensor amperométrico como detector de un sistema de análisis en flujo, se requiere evaluar el efecto de las condiciones de trabajo (como son el caudal, el volumen de muestra insertado, etc.) sobre el funcionamiento del mismo. Las condiciones hidrodinámicas afectan al registro de la medida y, por lo tanto, determinan la sensibilidad, el límite de detección y el tiempo de resolución de las señales proporcionado por el sistema. Por ello, es importante disponer de aparatos e instrumentación que permitan, de manera flexible y no costosa, realizar las mejoras y modificaciones necesarias para el funcionamiento óptimo de estos dispositivos de detección [Lamberti, 2012].

Una de las ventajas que ofrece a los sensores amperométricos trabajar con un este tipo de sistemas, en concreto FIA, es la reducción del tiempo de contacto de la muestra con el detector. Esto es especialmente ventajoso para la aplicación con biosensores, ya que la reacción analítica a menudo reduce el tiempo de vida de los mismos. Aun así, uno de los requisitos para que un sensor enzimático pueda

utilizarse en un sistema en continuo es que el sistema biosensor presente la estabilidad adecuada para soportar las características del flujo, influyendo en esto la metodología de fabricación del mismo (por ejemplo, la membrana empleada para el confinamiento de las enzimas debe ser resistente) [Cañizares, 2002]. Asimismo, la operación de un biosensor en un sistema FIA también proporciona una monitorización constante de la estabilidad del sensor en sí. Mientras la señal registrada es una medida de la concentración de analito analizada, el registro de la línea base da cuenta de manera directa de la estabilidad del sensor [Hansen, 2009].

El análisis en flujo ha servido para reintroducir los biosensores en la monitorización de procesos [Vojinović, 2007]. El uso de los biosensores en la industria para el control de procesos de fermentación es todavía limitado por, entre otros motivos, la evidente falta de capacidad de estos dispositivos para operar de manera continua en unas condiciones de trabajo variables, requiriendo unas condiciones óptimas y estables. A esto, se le debe sumar la falta de sistemas de monitorización fiables con capacidad para la detección y corrección de errores en un proceso [Ferreira, 2003]. Aun así, los sistemas de análisis en flujo automatizados con biosensores enzimáticos integrados pueden llegar a ser herramientas importantes para la monitorización de bioprocesos, ya que se pueden adecuar a los requerimientos de un análisis "on-line" [Kumar, 2011]. En este caso, sería necesario disponer de un "hardware" estable, sensible y robusto con características apropiadas para el análisis y evaluación de datos [Kumar, 2012].

2.2.3. El muestreo en los sistemas de flujo

La tendencia de las metodologías de análisis en flujo es, entre otras, disminuir los pasos de manipulación y pretratamiento de muestras, de modo que se posibilite llevar a cabo más determinaciones de una misma muestra en un tiempo menor de análisis (lo que conlleva una disminución significativa de reactivos y, por lo tanto, de desechos), aumentar la precisión de los resultados obtenidos, y disminuir los errores en un análisis, claves para mejorar el control de calidad de las mediciones analíticas [Cañizares, 2002]. La complejidad de las matrices de las muestras reales en muchas aplicaciones (ya sean medioambientales, biológicas,

industriales o biotecnológicas) pueden hacer que los ensayos para la monitorización o el control de calidad de un proceso resulten complicados, incluso trabajando con instrumentación analítica moderna [Miró, 2008]. El propósito del muestreo es proporcionar una muestra representativa para el análisis. En el caso de la monitorización de un proceso, esta etapa analítica debe realizarse de manera que el sistema a estudiar no se vea perturbado por ninguna operación, es decir, no se contamine ni microbiológica ni químicamente, ni varíe significativamente ninguno de los parámetros de medida [Vojinovic', 2007].

Uno de los principales atributos que proporcionan las técnicas de análisis en flujo, además de posibilitar la detección del analito de interés de manera continua en una corriente, es poder llevar a cabo las operaciones de muestreo en flujo. Es decir, la característica más atractiva del concepto de análisis en un sistema en continuo es la posibilidad de un muestreo "on-line" (mediante un compartimento periférico) o "in-line" (en el mismo flujo del sistema), ya que, en la mayoría de los procedimientos analíticos, el muestreo es la etapa más complicada y que más tiempo de análisis consume [Trojanowicz, 2013]. Así, este tipo de sistemas permiten optimizar la manipulación de una muestra y ultimar la detección del analito de interés, posibilitando llevar a cabo en flujo operaciones de transporte, dilución (para minimizar el efecto matriz o adecuar la concentración a un nivel que esté dentro del rango dinámico que ofrece el detector), derivatización (para adecuar la forma química a detectar), extracción/filtración/precipitación (para aislar al analito de otros constituyentes de la muestra que pudieran ser interferentes y/o preconcentrar), separación de fases gas-líquido, separación mediante el empleo de membranas, calentamiento o enfriamiento, y digestión [Hansen, 2009] [Vojinovic', 2007].

El muestreo basado en procesos de membrana

Con respecto a los métodos que utilizan membranas integradas en un sistema de flujo, permiten realizar en continuo procedimientos de muestreo y de "clean-up" debido a que actúan como una barrera física de permeabilidad selectiva. De acuerdo con la IUPAC, una membrana es "una estructura que tiene unas dimensiones laterales mucho mayores que su espesor y, a través de ésta, puede

darse la transferencia de masa por la participación de varios tipos de fuerzas" Las unidades de membrana, adaptadas a los sistemas de flujo, se pueden clasificar en función de las características de la membrana, la naturaleza física del fluido de alimentación (o dador) y el receptor, o según la configuración y posición de la membrana en el dispositivo de flujo. Sin embargo, el enfoque más utilizado es el que se basa en la manera en que la muestra entra en contacto con la membrana. Un muestreo dinámico en flujo implica la exposición de la muestra a la membrana a través de una corriente continua proporcionada por una bomba externa [Miró, 2004]. Así, con un sistema de membrana se pueden llevar a cabo operaciones de filtración, ósmosis, pervaporación, extracción, diálisis y difusión gaseosa, englobándose en los denominados procesos de membrana [Miró, 2008].

Dentro de éstos, la **diálisis** en flujo es un proceso que emplea una membrana semipermeable para separar especies químicas entre dos disoluciones. Esta operación se utiliza habitualmente para aumentar la selectividad del dispositivo analítico al permitir aislar el analito de potenciales interferentes presentes en la muestra. Además, la baja eficiencia con que se da este proceso, se puede utilizar para diluir el analito en muestras altamente concentradas [Cerdá, 2008]. En función de la aplicación, la unidad de diálisis se instala en un determinado punto del sistema de flujo y se suele presentar como célula o sonda. En el caso específico de las sondas, el muestreo se realiza por inmersión directa de la sonda en el medio a analizar. El diseño más habitual para las unidades de diálisis es el tipo "sandwich" (Figura 2)[Miró, 2004], que consiste en una célula formada por dos bloques que integran cada uno de ellos un canal semitubular, de modo que cuando ambos bloques se juntan forman un canal perfectamente tubular. La membrana, que puede ser de varios tipos (neutra o de intercambio iónico), se intercala entre los dos bloques dificultando el paso de algunos compuestos desde un lado de la membrana (canal dador) al otro lado (canal aceptor). Una vez el analito ha pasado a través de la membrana y ha sido recogido por la disolución aceptora, es transportado a través del sistema de análisis en flujo [Cerdá, 2008]. La eficiencia con que se da el proceso de diálisis está relacionada con las características del analito y de la membrana hidrofílica (una especie podrá o no atravesar la membrana en función de su tamaño molecular y del tamaño de poro de la membrana), además

de las dimensiones geométricas de esta última, y con el caudal de flujo y la composición química de las corrientes dadora y aceptora [Miró, 2008].

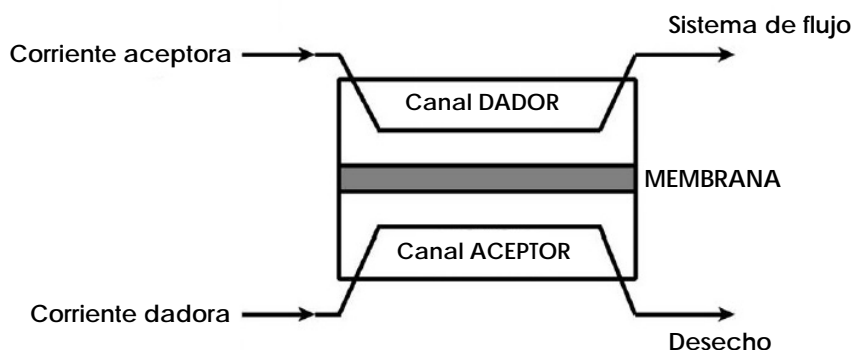


Figura 2. Esquema del diseño tipo "sandwich" de una unidad de muestreo basada en diálisis [van Staden, 2002].

La **microdiálisis** es una aplicación dentro de la diálisis utilizada tradicionalmente para trabajar con muestras biológicas (tejidos) en estudios de neuroquímica, farmacocinética, y control de procesos químicos extracelulares al haberse acoplado con éxito a sistemas de flujo para experimentos *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Sin embargo, recientemente se han empezado a utilizar las sondas de microdiálisis también como micromuestreadores de sistemas automáticos en otro tipo de matrices (alimentos, aguas residuales o efluentes industriales) [Miró, 2004]. La dinámica del muestreo mediante microdiálisis, esquematizada en la **Figura 3**, se basa en la difusión pasiva de los analitos a través de una membrana de permeabilidad selectiva en la que la fuerza motriz para el aislamiento de las especies objetivo es el gradiente de concentración a través de la barrera semipermeable. Es decir, la recuperación del analito de la matriz de la muestra se trata de un proceso controlado por el transporte de masa [Mentana, 2013]. Así, la microdiálisis se puede simplemente definir como un proceso de discriminación en función del tamaño molecular, ya que la separación de los compuestos se realiza de acuerdo a sus dimensiones moleculares. El dializado, o portador enriquecido con el analito, se puede transportar a través de un sistema de análisis en flujo

directamente hasta un detector, o recogerse en un vial para su posterior análisis [Miró, 2005].

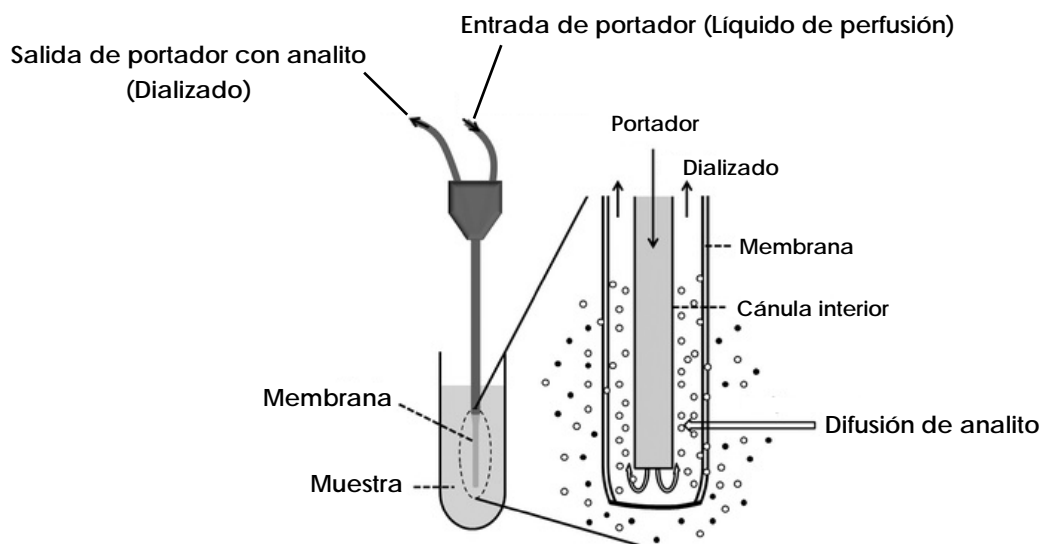


Figura 3. Esquema de muestreo con una sonda de microdiálisis [Cabaleiro, 2013].

Esta técnica de muestreo, acoplada a un sistema de detección biosensora, resulta ventajosa, ya que favorece preservar el (bio)sensor de un contacto directo con la muestra y, por lo tanto, de un pronto deterioro del mismo. Además, permite llevar a cabo la monitorización de un analito de una manera no invasiva para la muestra al posibilitar la función de extracción [Lamberti, 2012]. La sonda de microdiálisis se puede introducir directamente en un reactor o implementarse en un sistema "on-line" externo, y así disminuir el ensuciamiento y deterioro de la membrana. Al trabajar con sondas de diálisis se debe tener en cuenta que normalmente se obtienen recuperaciones por debajo del 15 %, dependiendo de las condiciones experimentales (caudal del flujo de perfusión, temperatura, características de la membrana y propiedades físico-químicas de la muestra y del analito [Chaurasia, 2007]). Por ello, se han diseñado satisfactoriamente sondas para llevar a cabo diluciones "in-line" [Hansen, 2009].

Con respecto a los procesos de membrana, en el caso de trabajar con analitos de una naturaleza volátil, lo correcto es hablar de un proceso de **difusión gaseosa**. Este término se introdujo en el análisis en flujo para describir un método

en el que las especies gaseosas, endógenas o generadas en una corriente donante, pasan a través de una membrana hidrófoba microporosa a una disolución receptora, siendo la dinámica de muestreo similar al proceso de diálisis mostrado anteriormente en la Figura 2. Dado que un número relativamente bajo de compuestos son suficientemente volátiles a temperatura ambiente, la difusión gaseosa se puede asociar con un alto grado de mejora de la selectividad. Por lo tanto, la alta selectividad intrínseca de los analizadores en flujo que tienen integrado una unidad de difusión gaseosa permite el empleo de detectores o procedimientos analíticos no selectivos. Al igual que sucede con el proceso de diálisis, la recuperación del analito desde la corriente dadora depende de las características y diseño de la unidad muestreadora basada en difusión gaseosa, y de las condiciones hidrofluídicas [Miró, 2008].

3. Capítulo 1

BIOANALIZADORES AMPEROMÉTRICOS EN
CONTINUO PARA LA MONITORIZACIÓN DE
PARÁMETROS QUÍMICOS EN LAS
INDUSTRIAS DE LA CERVEZA Y EL VINO

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. La automatización en la química analítica

Fundamentalmente, existen dos tipos de equipos en automatización: dispositivos automáticos y dispositivos automatizados [Baiulescu, 2000]. La IUPAC define la automatización como “el uso combinado de dispositivos instrumentales y mecánicos para sustituir, mejorar, ampliar o suplementar el esfuerzo y la inteligencia humana en la ejecución de un proceso dado, en el que al menos una de las operaciones principales es controlada, sin intervención humana, mediante un sistema de realimentación o “feedback””. Así, un sistema automatizado es aquel que es capaz de tomar decisiones. Del mismo modo, la IUPAC define automático como “tener auto-actuación o ser un dispositivo que realiza los actos necesarios en determinados puntos de una operación, sin intervención humana regular”. Es decir, los dispositivos automáticos realizan operaciones específicas en un punto dado de un análisis, frecuentemente en la etapa de medida [Cahn, 2013].

El objetivo de la automatización es, además de la minimización de la intervención del operador, el diseño de equipos robustos y autónomos para la obtención de información analítica sobre un determinado analito, de forma continua y totalmente automatizada, y con largos períodos de régimen operacional independiente [Ródenas, 2006].

La automatización en el laboratorio favorece el aumento significativo del rendimiento experimental y, simultáneamente, posibilita al químico tener más tiempo para planificar, analizar y aplicar el conocimiento. Por lo tanto, la automatización permite aumentar la productividad y capacidad de un laboratorio, ya que posibilita aumentar la cantidad de trabajo a realizar en un día [Pollard, 2001].

Asimismo, en la industria, la importancia de la automatización se ha incrementado drásticamente en los últimos años, sobre todo para el control y monitorización de procesos de fermentación [Liu, 2001]. El desarrollo de sistemas de instrumentación innovadores que controlen procesos complejos, garantizando la fiabilidad y seguridad de los mismos, se ha convertido en un elemento propulsor para el desarrollo y establecimiento de estrategias de mantenimiento avanzadas,

que permitan un mejor control y anticipación en las actividades industriales. Así, las incesantes presiones económicas en la industria química y bioindustrias dejan sin otra alternativa la mejora de la productividad, y para ello deben adoptar un enfoque holístico de la calidad, el costo y el consumo de tiempo, en los que la ingeniería de la automatización desempeña un papel principal [Jämsä-Jounela, 2007].

Unos posibles "handicaps" de la automatización son los siguientes [Pollard, 2001]:

- Coste: un modo de trabajo paralelo que no requiere atención conlleva equipos costosos.
- Complejidad: los sistemas automatizados son todos diferentes y, en ocasiones, son complicados de configurar y manipular.
- Falta de flexibilidad: los sistemas automatizados controlan sólo un pequeño subconjunto de actividades dentro de lo que es un proceso general. No existen sistemas de automatización con propósito general.
- Falta de versatilidad: adquirir un equipo automatizado normalmente conlleva comprar instrumentación específica. Rara vez se pueden utilizar equipos de laboratorios ya existentes.
- Inercia: la rápida adaptación a las nuevas tecnologías, prácticas y habilidades requiere un considerable esfuerzo e iniciativa por parte de los químicos.

Además, con la tendencia existente en la industria de procesos a desarrollar e implementar nuevas tecnologías de automatización y adquisición de información necesaria para seguir siendo competitiva, se ha llegado a una situación en la que el volumen de datos de medición a tratar es masivo. Al mismo tiempo, la tecnología ha evolucionado de tal manera que el número de operadores necesarios en las plantas ha disminuido. Esto ha hecho que el trabajo del operador adquiera mayor exigencia y responsabilidad; en situaciones críticas, las decisiones se deben tomar rápidamente y, por tanto, es necesario que toda la información relevante sea fácil y rápida de adquirir. Así, en el trabajo del operador de una industria, junto con el desarrollo de la automatización, han aparecido nuevos retos, como son la gestión y

la toma de decisiones dentro de un amplio rango de posibles situaciones problemáticas durante el proceso de producción [Jämsä-Jounela, 2007].

Los principales parámetros del proceso analítico, y que deben asegurarse en cualquier etapa del mismo, son rapidez, reproducibilidad y fiabilidad. En la consecución de la automatización de un método analítico, estos parámetros van a estar relacionados entre sí [Baiulescu, 2000].

El tiempo empleado en la ejecución de un método analítico debe ser el menor posible, ya que influye sobre el coste de un análisis. Una disminución en el tiempo requerido para un análisis se traduce en un incremento de la fiabilidad de un proceso analítico, y el empleo de la informática para el procesamiento de datos disminuye el tiempo necesario para el tratamiento de las señales analíticas.

La reproducibilidad está definida por la desviación estándar, de modo que un bajo valor de desviación estándar asegura la mejor reproducibilidad. El grado de reproducibilidad de la información analítica aumenta si se eliminan los errores procedentes del analista. Así, por ejemplo, la metodología empleada en el proceso de muestreo afecta directamente a la reproducibilidad de la información analítica, buscándose que la toma de muestra se dé de la manera más homogénea posible. La reproducibilidad también depende de la sensibilidad del método de análisis, el cual debe proporcionar señales exactas y reproducibles para asegurar un bajo valor de desviación estándar; por lo tanto, la resolución proporcionada por los equipos también influye en la reproducibilidad. Por último, la obtención de información analítica de manera reproducible proporciona una mejora de este parámetro. De este modo, el empleo de un "software" adecuado para el instrumento analítico de trabajo posibilita un procesamiento reproducible y objetivo de los datos.

El grado de flexibilidad debe ser un atributo del método y del instrumento analítico, pero también del operador. La flexibilidad puede ser expresada a través de la habilidad del operador para adaptar el método de análisis a la muestra, tomando en cuenta para ello sus características y las de los compuestos que deben ser determinados. El operador debe poder adaptar el método, en función del instrumento analítico, considerando los parámetros operacionales del método y los parámetros funcionales del instrumento analítico. Así, la flexibilidad, junto con la

reproducibilidad y la rapidez, aseguran la fiabilidad del método analítico. Un proceso analítico fiable permite su automatización, incrementando de esta manera la calidad y objetividad de la información analítica proporcionada [Baiulescu, 2000].

El analista debe considerar, con respecto a las operaciones implicadas en un proceso, para qué operaciones y en qué extensión la automatización es requerida y útil, y en caso de automatizar, en qué punto debe intervenir la toma de decisión humana en el método automatizado. Asimismo, de cara al tratamiento de los resultados obtenidos en un método automatizado, y así poder optimizar el mismo, el analista, en función de su experiencia particular y conocimiento, tiene que discernir y evaluar: si las variaciones encontradas en los diferentes valores determinados están dentro de los límites normales; si están en concordancia con la producción deseada; si, en el caso de que deba estar soportado por una toma de decisión, deben estar sujetos a un control exacto dentro de unos límites de calidad; si, por iniciativa propia, y con el objetivo de ahorrar tiempo en el proceso de producción, debe llevar a cabo inmediatamente un nuevo muestreo directo o un control paralelo al recibir unos determinados valores medidos; o si debe ordenar una recalibración o medir muestras de referencia para chequear el equipo.

El desarrollo de aplicaciones de alta tecnología ha aumentado, en un alto grado, la introducción de nuevos modelos de cooperación, como es la creación de redes entre empresas comerciales, universidades e institutos de investigación. Además, un enfoque interdisciplinario entre diferentes materias de desarrollo requiere tener experiencia en distintas áreas como son la física, la química, los biomateriales, la electrónica, las comunicaciones, la programación y la automatización [Jämsä-Jounela, 2007].

La implementación de un sistema de análisis en flujo automático o automatizado requiere el funcionamiento de manera coordinada de todos sus componentes y actividades [Ferreira, 2003], necesarios para la introducción de muestras y reactivos, así como para el tratamiento de datos. El control de todo esto se posibilita mediante el empleo de ordenadores y microprocesadores. Gracias a esto, los métodos analíticos han ganado en automatización, flexibilidad, precisión, rapidez y selectividad. Sin embargo, por otro lado, el desarrollo de estas tecnologías se ha visto ralentizado por la necesidad de aplicar conocimientos de electrónica e

informática. El principal reto para el químico analítico, en el desarrollo de sistemas de flujo automatizados, es disponer de una adecuada colaboración con expertos en los campos de la electrónica y la informática, que permita el desarrollo de manera conjunta de una instrumentación basada en el empleo de "software" [Cerdá, 2008]. Así, el desarrollo de un dispositivo automatizado para el control de un proceso debe ser llevado a cabo por un equipo humano heterogéneo. El papel de dicho equipo es mejorar la calidad y fiabilidad del dispositivo automatizado e, indirectamente, del producto obtenido a través del proceso de desarrollo tecnológico [Baiulescu, 2000]. El papel de cada componente del equipo también está definido; no obstante, es necesario establecer un flujo de información que trabaje en todas direcciones y establecer una estrategia adecuada entre el químico analítico y los ingenieros, con el fin de engranar los avances en estas disciplinas. Asimismo, el intercambio de ideas interdisciplinario es a menudo necesario para la optimización del cronograma de un desarrollo de estas características [Workman, 2001].

La informática y la química analítica moderna están, por lo tanto, fuertemente interrelacionadas. El desarrollo de la automatización, una de las áreas principales de la química analítica, es inconcebible sin los rápidos avances realizados en informática. Esta ciencia ha permitido la automatización de las diferentes etapas del proceso analítico, eliminando así la necesidad de la participación humana en el mismo, y, por lo tanto, evitando errores asociados con las operaciones manuales. Los programas informáticos se desarrollan en base a la ingeniería de "software", que comprende una serie de etapas: especificación de los requerimientos; diseño del sistema; codificación; implementación; y puesta a prueba. La etapa que condiciona la calidad del "software" desarrollado y, por lo tanto, del resto de las etapas es la de diseño. El hecho de que los problemas analíticos y su resolución sean aspectos en continua evolución, hace que el desarrollo de un "software" con aplicación para la automatización en química analítica tenga una serie de dificultades. La actualización de los recursos computacionales puede ser costosa y conllevar un largo tiempo, siendo frecuentemente necesario optimizar tanto el "software" como el "hardware" de un equipo. La dinámica de la información analítica demanda sistemas que requieran nula o mínima reprogramación cuando las condiciones cambian (clase de muestra,

parámetros analíticos a monitorizar, o recursos informáticos). Por ello, los esfuerzos llevados a cabo en esta disciplina están orientados al desarrollo de programas que posean, en un alto grado, las siguientes características [Urbano, 2006]:

- Escalabilidad (propiedad referente a la capacidad para aumentar la funcionalidad de un programa con mínimos esfuerzos).
- Independencia del "hardware" usado y la información requerida.
- Reusabilidad.

Con respecto al proceso de adquisición del conocimiento necesario para llevar a cabo un desarrollo de tal envergadura, el ingeniero informático requiere, por lo tanto, de la participación del químico analítico. Esta figura es necesaria tanto para la definición del problema analítico (el para qué y el cómo), como para la posterior evaluación y validación de la aplicabilidad del "software" desarrollado, trabajando en las tareas de prueba, optimización y localización, y definición de errores. Una vez finalizado el desarrollo, tras su entrega e instalación, sólo será necesario realizar algunos cambios en el programa, como consecuencia de un funcionamiento no satisfactorio o debido a alguna actualización requerida [Peris, 2002]. Como se puede observar a continuación en la **Tabla 1**, se ha automatizado con éxito cualquier etapa del proceso analítico, proporcionando, de este modo, una gran cantidad de métodos de análisis automáticos y automatizados. En dicha tabla, se muestran ejemplos de operaciones analíticas automatizadas recogidos de la bibliografía y de páginas web comerciales.

Tabla 1. Ejemplos de operaciones automatizadas del proceso analítico.

Etapa	Operación	Ejemplo	Referencia
Muestreo y tratamiento de muestra	Toma de muestra	Muestreo pasivo	Pat. ES2351313 A1
		Muestreo pasivo	[Doskey, 2001]
	Preparación de la muestra	Trituración	[Takagi, 2010]
	Tratamiento con reactivos	Reacción de derivatización	[Aoyama, 2004]
		Digestión Kjeldahl	[p. web 1]
		Homogeneización	[p. web 2]
	Separación y tratamiento con disolvente	Extracción Soxhlet	[p. web 3]
		Filtración y dilución	[Liu, 2001]
	Tratamiento con disolvente	Dilución	[p. web 4]
Separación	Extracción	[Hylton, 2007]	
Inserción de la muestra	Inyección	[Liu, 2001]	
	Dispensado	[p. web 5]	
Análisis	Calibración	Adiciones estándar	[Santos, 2009]
		Calibración cero	[p. web 6]
	Calibración externa	[p. web 7]	
Calibración y medida	Analizador	[p. web 8]	
Adquisición y tratamiento de datos	Registro	Toma de datos	[Chisolm, 2010]
	Registro y tratamiento de datos	Toma de decisiones	[I, 2002]

3.1.2. Analizadores de procesos

La Química Analítica de Procesos es una herramienta para la optimización de un proceso en su conjunto con el objetivo de reducir costes, aumentar la calidad de un producto, hacer los procesos más seguros y contribuir a la mejora de la sostenibilidad [Kueppers, 2003]. Desde el inicio de la Química Analítica de Procesos, se ha llevado a cabo la caracterización físico-química del estado de las operaciones de proceso químicas unitarias, de manera indirecta, a través de medidas analíticas [Chew, 2010].

Cada vez es más importante el desarrollo de sistemas de medida que correlacionen con, o predigan, las propiedades del producto final. Este enfoque, llamado "análisis inferencial", se ha convertido en una estrategia clave de monitorización de procesos y ha servido como motor de desarrollo de la ciencia de la medición para caracterizar las propiedades de un producto, más allá de las tecnologías basadas en la química analítica tradicional de laboratorio. Para el análisis y control de los procesos de fabricación se requiere el uso combinado e integrado de las técnicas de la química analítica, aplicada al proceso industrial, con herramientas de la ingeniería, aplicada a los sistemas de proceso [Workman, 2005].

Hoy día, muchas de las medidas analíticas realizadas para la monitorización de un proceso se llevan a cabo en un laboratorio externo al área de proceso industrial, y hay una clara necesidad de minimizar o eliminar los tiempos de demora entre el muestreo y el análisis. Sin embargo, existe una reticencia general en la industria a adaptar técnicas nuevas para el desarrollo y mejora de la producción. Así, de manera global, es la Tecnología Analítica de Procesos el área de desarrollo que contempla, además de la mejora en los procesos de producción, la valoración de los riesgos de implementar nuevas tecnologías, así como el manejo que se realiza de los conocimientos. Estos conceptos convergen en las actividades de diseño, monitorización, control y predicción para la puesta a punto de un proceso industrial [Kumar, 2011].

Entre los objetivos de la Química Analítica de Procesos se encuentran [Horstkotte, 2008]:

- La mejora de la eficiencia de fabricación y la sostenibilidad del proceso.
- La prueba y el aseguramiento de la calidad del producto, y las condiciones óptimas de identificación de los puntos finales de un proceso.
- El cumplimiento de las regulaciones restrictivas y de la documentación obligada.
- La garantía de la seguridad y la prevención de riesgos.
- La minimización de los productos intermedios, costes, residuos, impacto ambiental, y del gasto de materias primas y energía.
- La obtención de información del proceso de manera constante, así como de los problemas surgidos durante el mismo, para posibilitar su monitorización, optimización y control.
- La acción correctiva de manera rápida y automatizada, basada en los resultados obtenidos durante el análisis.
- Una mejor comprensión de los procesos, por ejemplo, para el desarrollo de modelos de predicción matemáticos.
- Una alta integración de la química analítica en los procesos industriales a través de la automatización y de la miniaturización.

Los anteriores objetivos, y beneficios resultantes, explican el creciente número de aplicaciones de sistemas analizadores de procesos.

Los **analizadores de procesos** son instrumentos automáticos diseñados para realizar medidas, continuas o periódicas, de uno o más parámetros físicos o químicos en los procesos industriales, permitiendo llevar a cabo correcciones en las condiciones de operación, basándose, para ello, en los resultados de las medidas realizadas. Generalmente, este tipo de sistemas suelen estar constituidos por un sistema de muestreo automático, un dispositivo de pre-acondicionamiento de

muestra, un sistema de transporte de muestras, y el instrumento de medida [Valcárcel, 2000].

Los analizadores de procesos pueden realizar muchas funciones diferentes en un entorno de procesamiento químico, pudiendo trabajar como sistemas de seguridad, sistemas de optimización y sistemas de calidad. Como sistemas de seguridad, los analizadores se utilizan como monitores de área y, como analizadores críticos, conllevan instalaciones de ingeniería para el control de los procesos. Trabajando como sistemas de optimización, éstos se incorporan en las plantas de producción de manera que los procesos se lleven a cabo bajo los límites de control más estrictos, reduciendo el coste total de producción del producto [Workman, 2005].

Un analizador para la monitorización de procesos industriales debe tener las siguientes características ideales:

- Emplear métodos químicos sencillos.
- Llevar a cabo el análisis (incluyendo el muestreo y preparación de la muestra) en continuo.
- Producir resultados lo suficientemente precisos y exactos como para controlar la línea del proceso de elaboración.
- Producir resultados rápidos que permitan la corrección de las condiciones operacionales de la línea de proceso de elaboración en caso necesario.
- Ser posible su mantenimiento sin interrumpir la línea de proceso de elaboración.
- Ser capaz de autocalibrarse.
- Ser su implementación económicamente ventajosa para la empresa.
- Ser simple y robusto.
- Ser su manejo sencillo.
- Ser capaz de trabajar 24 horas/día y 7 días/semana.

- Poder trabajar en ambientes agresivos (soportar líneas con productos químicos).
- Ser capaz de adaptarse a las características y propiedades del producto.
- Permitir que el analista se encuentre en un lugar distante de la zona donde se encuentra el analizador.

Los analizadores se pueden clasificar atendiendo a varios criterios. En la **Figura 4** se recogen diez criterios diferentes, entre los que se encuentran los propuestos por Valcárcel & Cárdenas [Valcárcel, 2000].



Figura 4. Esquema de clasificación de los analizadores de procesos.

Así, con respecto al *grado de automatización*, se pueden clasificar en semiautomáticos, automáticos y, en grado máximo, automatizados. Los semiautomáticos hacen referencia a aquellos analizadores que requieren de la participación humana en alguna de las etapas del proceso.

El criterio de *transporte de muestra y reactivos* hace referencia al modo en que éstos son introducidos en el analizador. Así, en un analizador discontinuo se tienen distintos pasos entre el instante en que la muestra es introducida en un vial, para su tratamiento, y se realiza el transporte mecánico de la muestra al detector. Un analizador robotizado consta de aparatos y dispositivos, como por ejemplo un brazo articulado, para suplir en grado máximo la participación del operador. Por último, el analizador continuo se basa en una técnica de análisis en flujo para la introducción de la muestra, teniendo, dentro de éstos, tantos subtipos como sistemas de flujo hay.

Según su *flexibilidad*, se pueden tener analizadores específicos (diseñados para llevar a cabo una determinada función, siendo prácticamente imposible introducir ninguna modificación en el mismo) o generales (diseñados sin un propósito definido, adaptándose a las distintas problemáticas que se planteen).

Atendiendo al tipo de *parámetro*, los analizadores pueden monitorizar un parámetro físico (temperatura, caudal, turbidez, conductividad, etc.) o químico (pH, concentración de un compuesto). Asimismo, el detector que constituye el analizador y la *técnica de análisis* en la que se basa también definen el tipo. De este modo, pueden encontrarse **bioanalizadores**, en el caso de que empleen un biosensor como dispositivo de detección, y, en función de la técnica, analizadores ópticos (espectrométricos, fotométricos, fluorimétricos, refractométricos, quimioluminiscentes, etc.), electroquímicos (conductimétricos, amperométricos, potenciométricos, etc.), e incluso cromatográficos si emplean la cromatografía como técnica de separación.

Otros criterios que pueden ser utilizados son: en función de la naturaleza del *estado de la muestra*, de gases, de líquidos o de sólidos; en función de la *frecuencia de muestreo*, puntuales (medida única), periódicos (medidas con una frecuencia determinada) o continuos (monitorización permanente); y, por último, en función de su *origen*, comerciales (adquiridos) o no comerciales (fabricados en el laboratorio).

Por último, considerando el modo de trabajar con un analizador para la monitorización de un proceso, se pueden tener diferentes procedimientos analíticos

según la *localización* o punto de detección, con respecto a un reactor o una línea de producción, y el modo de medición. Asimismo, el tiempo transcurrido hasta la obtención de la información analítica se verá condicionado por el modo de análisis. Los cuatro modos posibles son: "in-line", "on-line", "at-line" y "off-line" (Figura 5).

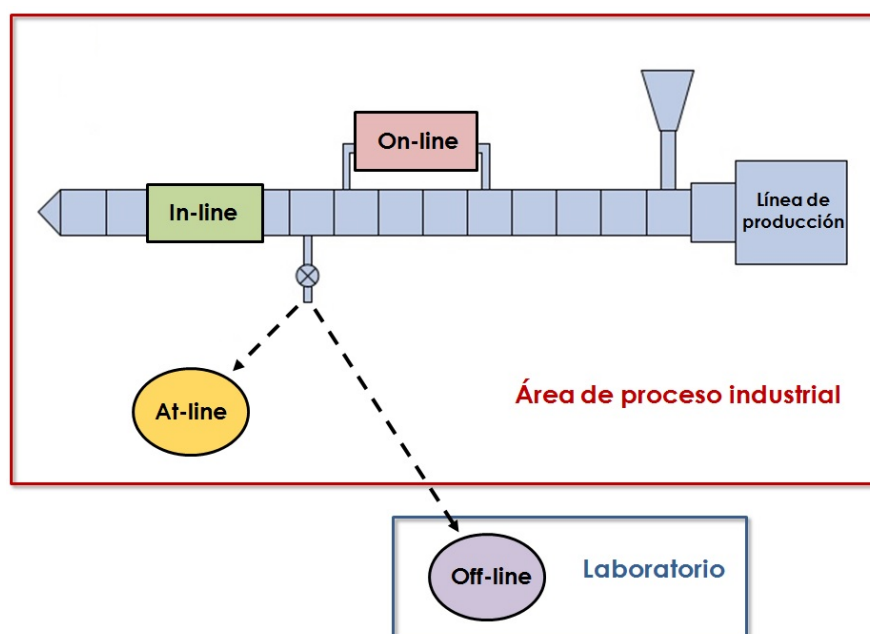


Figura 5. Representación de los tipos de analizadores en función de la localización en un proceso industrial.

La monitorización "in-line" es el modo que proporciona datos de manera continua con el menor tiempo de demora, ya que el detector se encuentra en contacto directo con la muestra, dentro del reactor o línea de producción.

El término "on-line" se refiere a las medidas realizadas fuera de la fase de reacción o del caudal de producción, mediante un compartimento periférico (un bucle de recirculación (baipás)) [Vojinovic', 2006] o mediante un sistema de transporte de muestra que la extrae automáticamente del proceso y la lleva al detector, como puede ser el caso de una sonda de microdiálisis [Hansen, 2009]. Al igual que en el modo "in-line", se obtienen datos de manera continua. Sin embargo, el tiempo que transcurre para el registro de la medida va a depender de la distancia existente entre el punto de muestreo y el detector. No obstante, generalmente, el

diseño de estos sistemas se lleva a cabo de manera que los posibles tiempos muertos no sean notables [Horstkotte, 2008].

De este modo, se considera que los datos proporcionados desde sistemas analizadores tanto "in-line" como "on-line", con respecto al transcurso de un proceso, son obtenidos en tiempo real ("real-time"), siendo ésta su principal ventaja frente a otras metodologías para el control de procesos. Un análisis "in-line" u "on-line" permite obtener directamente información en tiempo real, facilitando una estimación muy exacta del estado en que se encuentra un proceso [Kumar, 2011]. Esto es esencial para la rápida detección de cualquier problema y, de esta manera, poder llevar a cabo una acción inmediata para su resolución mientras el proceso está en marcha. Los métodos de monitorización "real-time" aplicados rutinariamente en producción industrial son relativamente escasos, debido a las dificultades derivadas de la compleja composición y características de las muestras. Además, es importante tener en cuenta que el método de monitorización debe permitir preservar las condiciones en que se da el proceso, algo fundamental en aquellos procesos en los que mantener la esterilidad del sistema es un factor crítico [Vojinovic', 2006].

El término "**at-line**" se refiere a las medidas realizadas en una ubicación próxima al punto de muestreo, normalmente dentro del área de procesamiento o planta de producción. En este caso, la muestra se extrae del reactor o línea de producción y el análisis se realiza a posteriori. En función de las características de las muestras, puede ser necesario un pre-acondicionamiento de las mismas, antes de llevar a cabo el análisis [Vojinovic', 2006]. Para este tipo de monitorización es común utilizar los términos "near real-time" (casi en tiempo real) o "close-time" (tiempo cercano) con respecto a la adquisición de los datos [van Staden, 2002].

Por último, el término "**off-line**" hace referencia a las medidas realizadas trabajando en una ubicación totalmente ajena al área de procesamiento, como por ejemplo en un laboratorio de análisis que esté alejado de la zona de producción. En este tipo de monitorización, generalmente, se requiere el transporte, pre-acondicionamiento, y, a menudo, almacenamiento de las muestras antes del análisis [Vojinovic', 2006]. El principal inconveniente que presenta esta metodología es el tiempo de demora que se produce entre las etapas de muestreo y de análisis. Por

ello, normalmente se emplea para el desarrollo y optimización de métodos de análisis aplicados al control de procesos [Kumar, 2011].

En las metodologías "at-line" y "off-line", según la naturaleza de las muestras y del compuesto a monitorizar, el posible cambio de la composición de la muestra antes de que se lleve a cabo el análisis puede llegar a ser un aspecto problemático. Por ello, es más común su aplicación para muestras líquidas [Terry, 2005].

Por lo tanto, también es posible hacer una distinción entre metodologías de análisis en función de si se lleva a cabo o no una etapa de muestreo antes del mismo. De este modo, se puede decir que la monitorización "in-line" consiste en un análisis *in situ*, ya que el detector se introduce directamente dentro del reactor o de la línea de producción, mientras que las metodologías "on-line", "at-line" y "off-line", en las que existe una etapa de muestreo, se consideran análisis *ex situ* [Dzyadevych, 2008].

En ocasiones, uno de los condicionantes que determina la elección de un tipo de monitorización u otro es el tipo de dispositivo detector con el que se trabaja, ya que éste debe presentar un funcionamiento óptimo en las condiciones de trabajo. En este sentido, la metodología *in situ* es la que presenta una mayor problemática, debido a que el sensor entra en contacto directo con la muestra en las condiciones de operación del reactor o línea de producción. La capacidad de un sensor para mantenerse calibrado, sin ensuciarse, o su estabilidad a largo plazo, esenciales para la monitorización del transcurso completo de un proceso, son propiedades difíciles de reunir en un sensor para su aplicación *in situ*. Otro requerimiento importante está relacionado con el rango de concentración que admite el sensor, de manera que éste debe ser más amplio que el rango de concentración en que se puede encontrar el analito durante el proceso. Además, el sensor debe ser específico para con el analito y no susceptible a compuestos interferentes presentes en la muestra [Vojinovic', 2007].

En la industria, sólo se ha podido realizar con éxito la monitorización *in situ* del pH, mediante el uso de un electrodo, y de la temperatura, mediante un termómetro [Hansen, 2009]. Por todo ello, las metodologías *ex situ* son más utilizadas, permitiendo llevar a cabo un pre-acondicionamiento de la muestra

adecuado al sensor utilizado [Vojinovic', 2007]. Además, estas últimas proporcionan las condiciones de trabajo más favorables para la aplicación, en concreto, de los biosensores [Dzyadevych, 2008]. Hasta la fecha, el desarrollo de biosensores para análisis *in situ* no se ha llevado a cabo con éxito, principalmente debido a la alta probabilidad con que se puede causar la inactivación del biomaterial que lo constituye. No obstante, las técnicas en flujo representan una oportunidad para desarrollar metodologías que propongan una situación de compromiso entre el análisis "in-line" y el análisis "off-line" empleando los biosensores [Terry, 2005].

3.1.2.1. Tecnología base del (bio)analizador

Un analizador se basa en una configuración instrumental, dirigida a proporcionar tanto una señal como directamente el valor del parámetro objeto de estudio, trabajando en un régimen automático o automatizado.

El empleo de la palabra *automático* o *automatizado* implica control por ordenador de alguna de las etapas del proceso analítico (también el tratamiento de la información analítica en el caso de un analizador automatizado). El requerimiento de herramientas informáticas, en ocasiones, es lo que se ha considerado precisamente como el factor limitante a un mayor desarrollo de este tipo de sistemas analíticos [Horstkotte, 2008], siendo la razón fundamental de la existencia de un número considerablemente bajo de publicaciones relacionadas con estas aplicaciones [Cerdá, 2005].

El control por ordenador del analizador requiere de dos partes: el "software" que, además de llevar a cabo el procesamiento de datos para proporcionar información, gobierna el "hardware", que constituye la segunda parte del instrumento. A su vez, se puede considerar que el "hardware" se subdivide en dos partes: el ordenador, que es la máquina electrónica que recibe y procesa los datos, y el equipo o "hardware" analítico, en el que van integrados el sistema de administración de reactivos y muestras (en el que estarían incluidos, según el diseño y funcionamiento del analizador, elementos como el sistema automático de muestreo y el sistema de flujo), la instrumentación electrónica de control y el instrumento de detección. Por lo tanto, un analizador consiste en la combinación, al

más alto nivel, de aparatos (bombas peristálticas, electroválvulas, etc.) e instrumentos (detector) para la implementación de un método analítico [Urbano, 2006].

Con respecto al desarrollo del "software", se debe tener en cuenta que se requiere un sistema que, además de realizar la función básica de recoger datos del exterior y proporcionar una salida de datos, debe cumplir una serie de funciones secundarias, como son la visualización y el registro de datos, y debe proporcionar algún medio de configurar, modificar y controlar el comportamiento global del sistema.

Por lo tanto, el sistema de control deberá permitir este tipo de actividades [Pollard, 2001]:

- La **configuración** desde el ordenador de los **parámetros de ajuste y control**, para la **administración de muestras y reactivos**, así como de **arranque y parada del sistema**. Normalmente, el sistema debe ser configurable desde dentro de sí mismo y, una vez configurado para un trabajo concreto, esta configuración debe ser almacenable para su reutilización futura. En este sentido, es interesante además que el "software" posibilite que el analista pueda crear sus propios métodos de análisis, sin que sea necesario poseer previamente conocimientos avanzados de informática. Para definir inicialmente el sistema de control es necesario tener bien establecido qué dispositivo está conectado a qué conexión física, es decir, las conexiones entre componentes del "hardware". Así, un "software" que permita la combinación de diferentes instrumentos y aparatos, o distintas configuraciones de unos mismos dispositivos, aportará flexibilidad y versatilidad al desarrollo informático.
- La **visualización gráfica de los datos**, normalmente a través de una representación de la variación de una propiedad X en función del tiempo, además de como números en una tabla de entrada de datos. Todo proporcionado en tiempo real. Asimismo, puede ser útil que, mientras un proceso está en marcha, el operador tenga acceso a ciertos aspectos de la configuración, a través de una interfaz de usuario.

- El manejo de un **histórico de datos**, de manera que se facilite llevar a cabo un análisis de tendencias de comportamiento del proceso a monitorizar con todos los datos registrados, y no sólo los datos capturados recientemente. Un módulo para el almacenamiento permanente de datos de interés es obligatorio para un manejo y análisis de la información eficientes. Además, con respecto al registro de datos, también se tiene que posibilitar el control de parámetros que definan qué, dónde y con qué frecuencia se han de registrar los datos, pudiendo esto condicionar el uso que se hará de los mismos. La información del histórico de datos puede ser una herramienta para apoyar decisiones con respecto a un proceso.
- El establecimiento de unas **condiciones de alarma**, o de respuesta específica por parte del sistema, definidas perfectamente a través de los parámetros de configuración del sistema. Esto es especialmente importante en aquellas aplicaciones en las que se requiere una monitorización condicionada a alarmas o acciones correctoras, o si el sistema está en marcha de una manera desatendida por parte del operador. Además, la programación de una evaluación automática de los datos es lo que permite llevar a cabo operaciones de retroalimentación de la información, necesario en sistemas automatizados. Es decir, se debe programar la toma de decisiones con respecto a la necesidad real de modificar parámetros del procedimiento analítico sin intervención del analista.
- Una **supervisión de los posibles fallos del sistema y asegurar su recuperación**, de manera que la aplicación informática desarrollada muestre un comportamiento seguro.

3.1.2.2. Bioanalizadores automáticos y automatizados para la monitorización de procesos en la industria

El control de procesos es una de las tareas más importantes que desempeñan químicos analíticos, ingenieros y físicos en la industria química. Así, la monitorización de procesos se puede considerar como la aplicación de la química analítica para obtener información sobre el estado de los mismos, como pueden ser

la composición de una fase de reacción, los datos de concentración de los componentes, o la alteración de estos parámetros [Horstkotte, 2008].

Se puede definir un proceso como la suma de pasos que aseguran la obtención de un producto, de manera que, para obtener un producto final con una calidad determinada, se deben controlar los productos intermedios regularmente. Por ello, es necesario asegurar la mayor cantidad de información en el menor tiempo posible, y los bioanalizadores, trabajando de manera automática o automatizada, son herramientas útiles para el control de un proceso [Baiulescu, 2000].

La monitorización y el control de un proceso son necesarios para la consecución de una producción económicamente factible, y con una calidad del producto final adecuada. Una monitorización efectiva permite desarrollar, optimizar y mantener las operaciones que conforman el mismo con el mínimo esfuerzo. Debido a la naturaleza, al tipo y al volumen de producción de los productos fabricados en este tipo de actividades, existe un fuerte aliciente económico para monitorizarlas, y así aumentar el rendimiento y productividad de las mismas. Asimismo, la necesidad de monitorizar la calidad es mayor en aplicaciones biotecnológicas que conllevan etapas de procesado en corriente y, dentro de éstas, son los procesos de fermentación los que se consideran más complicados de monitorizar, debido a la naturaleza compleja del sistema biológico y su interacción con los medios físico y químico presentes [Kumar, 2011].

Un requisito para llevar a cabo con éxito el control de un bioproceso es el empleo de una metodología de monitorización adecuada, y ésta debe ser desarrollada de acuerdo con sus demandas específicas [Vojinović, 2006]. Así, para el seguimiento de los procesos de fermentación, involucrados en la producción de alimentos y bebidas, es decisivo monitorizar algunos parámetros químicos que varían con el curso del tiempo, y así cumplir con las regulaciones del control de calidad. En este tipo de plantas, es fundamental detectar desviaciones en la composición del medio de proceso causadas por una contaminación microbiológica, o por un mal funcionamiento del sistema, que pongan en riesgo la viabilidad de la producción [Peris, 2002]. En el caso de comprobar la calidad de un producto de fermentación al final de su procesado, aumenta significativamente la

probabilidad de obtener un producto fallido que tenga que ser reprocesado y vendido a un precio más bajo, o que tenga que ser destruido, con la consiguiente pérdida económica. Con la creciente presión para reducir los costes en la industria, ha aumentado el desarrollo y el uso de herramientas analíticas en la industria que permitan llevar a cabo un control preciso y continuo de los procesos, y así resulten más eficaces y fiables. Además de las medidas analíticas, un control con un sistema de realimentación y carácter anticipativo forman parte de un control avanzado de procesos. Por ello, el diseño y desarrollo de "hardware" y "software" de análisis, ambos integrados en los analizadores, está dirigido a su implementación en los procesos de producción [Kueppers, 2003].

La tecnología asociada a los analizadores de procesos posibilita una monitorización en continuo que, en combinación con la automatización, facilita introducir acciones correctoras e idear estrategias de control apropiadas. Un requerimiento esencial para que un analizador pueda proporcionar señales de alarma de un modo rápido, al darse desviaciones en el proceso, es que la técnica de detección en que se base su desarrollo sea rápida. Así, se facilitará tanto el control como el entendimiento del proceso [Olsson, 2010]. En el grado máximo de automatización se obtiene una monitorización totalmente integrada, en la que el propio sistema participa en la toma de decisiones con respecto a las acciones a ejecutar durante un proceso. En el caso de una monitorización "off-line", las modificaciones de una operación se llevan a cabo de manera retrospectiva [Kumar, 2011].

Como ventajas de implementar este tipo de tecnología para el control de un proceso se pueden considerar [Kueppers, 2003]:

- La posibilidad para el operador de estar constantemente informado sobre el estado de un proceso.
- La obtención de una respuesta rápida en caso de detectar cambios en la composición y problemas.
- La obtención de información sobre el estado de la calidad de un producto en un punto dado del proceso.

- El aumento de la seguridad de los procesos, siendo especialmente relevante en los casos en los que el reactor contiene compuestos peligrosos.
- La prevención sistemática y la reducción de los errores no sistemáticos del método analítico aplicado.
- La obtención de productos con una calidad más uniforme.

Asimismo, los aspectos económicos más importantes asociados al empleo de analizadores para la monitorización de procesos son:

- El tiempo transcurrido entre la detección de un problema y la finalización de un proceso (en continuo) se reduce, con el consecuente ahorro en el consumo de materia prima y energía.
- La preparación de la muestra está automatizado, lo que conlleva una reducción de costes de personal.
- La tasa y el rendimiento de producción se incrementan.
- La generación de subproductos no deseados se reduce al mínimo.

No obstante, los posibles problemas, que actúan de obstáculo para una plena implementación de estos analizadores, son:

- Las reticencias de la industria a introducir nuevas técnicas y metodologías analíticas.
- La falta de comunicación entre los investigadores que trabajan en el desarrollo de nueva instrumentación analítica y los analistas e ingenieros que trabajan en la industria.
- La instrumentación necesaria para extraer muestras de la línea de producción y transferirlas al analizador en ocasiones es más costosa que el propio analizador.
- Un error de funcionamiento por parte del analizador puede conducir a importantes pérdidas económicas.

3.1.3. Análisis de etanol en cervezas de bajo contenido alcohólico

El etanol, también conocido como alcohol etílico, es un compuesto químico que, a temperatura y presión ambiente, es un líquido incoloro y volátil, y está presente en diversas bebidas fermentadas. Dicho compuesto, desde la antigüedad, se obtiene por fermentación anaerobia de una disolución que contenga azúcares con levadura y posterior destilación.

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más antiguas conocidas y de las más populares en todo el mundo. Se trata de una bebida elaborada obtenida por fermentación de cebada germinada (malta) en agua en presencia de lúpulo y levadura [Sohrabvandi, 2011], en la que el etanol, junto con el agua y los hidratos de carbono, es uno de sus principales componentes. Existe un gran interés en el estudio de la composición química de la cerveza, ya que esta información es valiosa para la evaluación de la calidad de la misma y el desarrollo de nuevos productos [Tonelli, 2009]. El contenido de etanol es el parámetro más importante para la caracterización de la cerveza, siendo una característica organoléptica que condiciona tanto su clasificación (en términos de impuestos) como su sabor. La concentración de etanol en este tipo de bebida oscila desde un valor por debajo de 0,05 % (v/v), en las cervezas sin alcohol, hasta un máximo de aproximadamente 12,5 % (v/v), en aquellas cervezas consideradas de alto contenido alcohólico [Tonelli, 2009]. La cerveza sin alcohol es una bebida fermentada de origen agrario, elaborada con los mismos ingredientes naturales de la cerveza tradicional (agua, cebada malteada y lúpulo), a la que se le ha eliminado el etanol (mediante procesos térmicos o de membrana) o se ha restringido su formación (mediante el control del proceso de fermentación) [Brányik, 2012]. Puede formar parte de una dieta equilibrada ya que es una bebida altamente hidratante (el 95 % de su contenido es agua), con un contenido calórico muy bajo (17 kcal/100 mL) y que aporta gran cantidad de vitaminas (especialmente el complejo B), fibra, minerales (silicio, calcio, potasio, magnesio) y antioxidantes naturales [Sohrabvandi, 2011].

Según la reglamentación sanitaria española, la cerveza sin alcohol es aquella cuyo contenido alcohólico es menor al 1 % en volumen [Martínez, 2001]. Dentro de

las cervezas sin alcohol se puede establecer una diferenciación entre cerveza "Sin", con pequeños niveles de etanol (por debajo del 1,0 % (v/v)); y cerveza sin alcohol tipo "0,0", que apenas presenta trazas de etanol (por debajo del 0,04 % (v/v)). El mercado de este tipo de cervezas ha experimentado un especial auge debido a que existe una gran cantidad de consumidores de esta bebida que quieren poder seguir consumiéndola, salvando así los inconvenientes médicos y/o legales, e incluso religiosos, que supone el consumo de alcohol [Catarino, 2011]. Aunque las ventas de cervezas con bajo contenido alcohólico en principio no cumplían las expectativas de los mercados, ocupando una pequeña parte de la producción cervecera durante mucho tiempo, hoy día se trata de un segmento del mercado mundial de la cerveza en rápido crecimiento. En los últimos años, el promedio de ventas de estos productos en Europa ha aumentado por encima del 50 %, siendo España el mayor productor y consumidor de cervezas con bajo contenido de alcohol de la Unión Europea. Durante el 2014, el consumo de este tipo de cervezas en España casi duplica al dato de Francia, segundo país de la Unión Europea que más cerveza sin alcohol consume, con un 6,6 % del total [p. web 9]. Así, dentro de la Unión Europea, las razones más importantes probablemente para el aumento del nivel de ventas de cervezas sin alcohol sean las intervenciones legislativas, que restringen el consumo de alcohol, y la creciente concienciación por parte de los consumidores sobre los beneficios de un consumo moderado de cerveza [Brányik, 2012].

El control a escala industrial de los procesos de fermentación o de elaboración de productos en la industria cervecera está basado principalmente en la monitorización de etanol. Para estudiar y validar eficientemente estos procesos de fermentación y elaboración, es necesario conocer cuándo y dónde se producen cambios en los mismos para proceder a su corrección. Debido a la pequeña cantidad de etanol que contiene la cerveza sin alcohol, el control analítico de estas operaciones no resulta sencillo, y aún más si lo que se pretende es realizar el control en la misma línea de proceso. Por ello, es importante disponer de una instrumentación analítica eficiente que permita llevar a cabo la determinación precisa y rápida de etanol en la cerveza, posibilitando así regular y controlar el proceso de elaboración de las cervezas con bajo contenido alcohólico. Existe una creciente demanda de métodos de bajo coste, rápidos y fiables que permitan un seguimiento continuo del nivel de etanol en la industria cervecera [Tonelli, 2009]. En

este contexto, los métodos automáticos que realizan medidas "on-line" cumplen estos requisitos y son ideales para la monitorización de estos procesos de fermentación en tiempo real.

Los métodos oficiales de análisis para determinar el contenido de alcohol, aprobados por las autoridades e impuestos en la mayoría de los países, se basan en medidas físicas (por lo general, la densidad o el índice de refracción) llevadas a cabo después de una destilación previa de la muestra, para separar el alcohol. Tradicionalmente, la determinación de etanol en cerveza se ha llevado a cabo por picnometría, un método laborioso que se basa en la destilación de la cerveza y medida de la densidad del destilado con un picnómetro o un densímetro [Martínez, 2001]. Otra técnica es la refractometría, basada en el empleo de curvas de calibrado obtenidas a partir de lecturas realizadas en disoluciones con diferentes porcentajes de etanol, frente al agua destilada [Gales, 1990]. Estos métodos resultan laboriosos, ya que generalmente requieren mucho tiempo y algún tipo de preparación de la muestra, además de personal de laboratorio cualificado. Asimismo, estos métodos físicos trabajan en la macroescala, tratando grandes volúmenes de muestra y altos grados alcohólicos [Tonelli, 2009]. Alternativamente, el contenido de etanol se puede determinar mediante métodos químicos clásicos, tales como las valoraciones redox, o métodos espectrofotométricos. Estos últimos son más sensibles (permiten cuantificar un menor contenido de alcohol en las bebidas, por debajo del 1 % (v/v)) y requieren una menor cantidad de muestra (por ejemplo, 1 mL). Sin embargo, los métodos químicos tampoco son selectivos y, por lo tanto, también requieren una previa destilación de la muestra, aumentando el tiempo de análisis. Además, están sujetos a la recuperación cuantitativa del destilado [Tonelli, 2009].

Con el tiempo, se han desarrollado métodos instrumentales que posibilitan una determinación directa de etanol basados en el empleo de cromatografía de gases. Estos métodos se consideran que tienen la precisión adecuada para llevar a cabo el análisis de etanol en bebidas alcohólicas. Sin embargo, la instrumentación es todavía relativamente cara, requiere operadores cualificados y, con frecuencia, el pretratamiento de la muestra en el laboratorio [Sohrabvandi, 2011]. En la actualidad, la monitorización de etanol en la industria cervecera, principalmente en el caso de las cervezas tipo "0,0", se realiza "off-line" mediante los métodos tradicionales de

análisis (refractometría, densimetría, o titulación redox) que trabajan con la muestra destilada, así como los basados en cromatografía de gases. Esto es debido a que, para los límites de detección y el nivel de precisión requeridos en esta aplicación, no existen en el mercado sistemas sensores que puedan trabajar en la línea de proceso que cumplan estos requerimientos. Así, los métodos "off-line" empleados rutinariamente son procedimientos que suponen un consumo de tiempo y trabajo elevados, además de ser lentos y difíciles de automatizar, impidiendo la rápida resolución de los problemas que pueden surgir. Por lo tanto, para sustituir estos métodos, se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos que impliquen una instrumentación de bajo coste, que no requieran un complejo pretratamiento de la muestra y que permitan la monitorización de etanol en tiempo real a los niveles y condiciones dados en los procesos industriales implicados en la elaboración de este tipo de cervezas [Tonelli, 2009].

3.1.3.1. Antecedentes bibliográficos

Con el objetivo de sustituir los procedimientos complejos y laboriosos que conllevan los métodos tradicionales para el análisis del contenido alcohólico en cerveza, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos que proporcionen análisis más rápidos y presenten además la posibilidad de ser automatizados.

Las técnicas espectroscópicas ofrecen interesantes posibilidades para la determinación directa de etanol en cervezas, y para la caracterización de este tipo de bebidas en general. Dentro de éstas, el mayor desarrollo de métodos se ha dirigido hacia las espectrometrías de infrarrojo (IR) ([Lachenmeier, 2007], [Llario, 2006], [Polsin, 2011]) e infrarrojo cercano (NIR) ([Engelhard, 2004], [Grassi, 2014], [Mignani, 2013]). Asimismo, las técnicas cromatográficas, especialmente la cromatografía de gases, debido a la naturaleza volátil del etanol, han abarcado gran parte del desarrollo analítico para la determinación de este compuesto en cervezas, estableciéndose como uno de los métodos "off-line" más empleados en la industria cervecera ([Pinho, 2006], [Ragazzo-Sanchez, 2008], [Vautz, 2006], [Zapata, 2012]). En el caso de los métodos desarrollados a partir de estas técnicas, los mayores inconvenientes que presentan son el precio y complejidad de la instrumentación

que implican, y el requerimiento de llevar a cabo un tratamiento de muestra pre-análisis, además de operarios cualificados.

Las técnicas electroquímicas se presentan como una tecnología de análisis particularmente adecuada para este tipo de determinaciones debido a que proporcionan sencillez al método. Se han encontrado desarrollos recientes tanto de sensores electroquímicos ([Jia, 2013], [Shan, 2010], [Zhu, 2014]), como de dispositivos de detección basados en las llamadas "lenguas electrónicas" ([Kutyla-Oleisiuk, 2012], [Lvova, 2006], [Polshin, 2010]). Dentro de los sensores electroquímicos, destacan los biosensores enzimáticos amperométricos, ya que, además de ser fácil operar con estos, presentan tiempos de respuesta cortos, alta sensibilidad y alto grado de selectividad. Así, se encuentran desarrollos de biosensores de etanol basados en el empleo de alcohol deshidrogenasa ([Lee, 2009], [Li, 2013], [Manso, 2008]), biosensores basados en el empleo de alcohol oxidasa ([Das, 2013], [Kekec, 2014], [Kirgöz, 2006]), biosensores bienzimáticos de alcohol deshidrogenasa-peroxidasa ([Monosik, 2013], [Pisoschi, 2012]) o de alcohol oxidasa-peroxidasa ([Chinnadayyala, 2014], [Guzmán-Vázquez de Prada, 2003]), para la determinación de etanol en cervezas en discontinuo.

Sin embargo, se ha dedicado un gran esfuerzo en introducir la automatización en la determinación de etanol en cerveza y para ello se han llevado a cabo desarrollos basados en las técnicas de análisis en flujo. Este tipo de sistemas son susceptibles de ser automatizados y, por tanto, de ser implementados como sistemas analizadores "on-line", posibilitando llevar a cabo una monitorización del nivel de alcohol de manera continua y en tiempo real. En la **Tabla 2** se recogen métodos de análisis en flujo de etanol en cervezas, automáticos y no automáticos, encontrados en la bibliografía. Cabe destacar el hecho de que no se ha encontrado en la bibliografía ningún desarrollo automatizado, es decir, basado en un sistema de "feedback", para este tipo de dispositivos de análisis. Así, se encuentra que las espectroscopías de infrarrojo ([Gallignani, 2005], [Lachenmeier, 2010]), infrarrojo medio o cercano ([Iñón, 2005], [Iñón, 2006]), visible ([Blum, 2001], [Choengchan, 2006], [Pérez-Ruiz, 2005], [Pinyou, 2011]), e incluso la espectroscopía de resonancia magnética nuclear [Lachenmeier, 2005] y la espectrometría de masas [Tarkiainen,

2005], como técnicas de detección en sistemas de flujo, proporcionan interesantes posibilidades en automatización.

Los dispositivos biosensores basados tanto en la detección óptica [Vidigal, 2008] como electroquímica ([Lapa, 2003], [Mohns, 1995], [Valach, 2009]) también han sido utilizados con éxito en sistemas de análisis en flujo, proporcionando una mayor selectividad y generalmente, comparando con la detección basada en técnicas espectroscópicas, una mayor sensibilidad, un factor importante para la aplicación específica de las cervezas con bajo contenido alcohólico. Asimismo, como se puede observar en la Tabla 2, los dispositivos basados en difusión gaseosa han sido empleados con éxito como estrategia de dilución de las muestras de cerveza ([Blum, 2001], [Choengchan, 2006], [Mohns, 1995], [Pinyou, 2011]).

Tabla 2. Métodos de análisis en flujo para la determinación de etanol en cerveza.

Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, % (v/v)	LD, % (v/v)	RSD, %	Muestras/h	Referencia
CFA	No	Espectroscopía de reflectancia VIS (sensor óptico)	GD	Neutralización con disolución básica	Hasta 20	0,1	5	Máx. 30	[Blum, 2001]
FIA	No	Espectrofotometría VIS	GD con membrana	Ninguno	1,0 - 30	0,68	0,55	18	[Choengchan, 2006]
			GD sin membrana	Ninguno	0,5 - 30	0,27	0,50	16	
CFA	No	Potenciometría (lengua electrónica)	Ninguna	-	-	-	2	720	[Ciosek, 2006]
CFA	Sí	GC - FID	Filtración, dilución con disolución de reactivos	Ninguno	-	-	4	-	[Diamantis, 2006]
FIA	No	Espectrometría FTIR	Extracción líquido-líquido	Ninguno	Hasta 15	0,03	1,3	25	[Galignani, 2005]
CFA	No	Espectroscopía NIR	Ninguna	Agitación, filtración	-	-	-	-	[Iñón, 2005]

Tabla 2. Continuación.

Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, % (v/v)	LD, % (v/v)	RSD, %	Muestras/h	Referencia
CFA	No	Espectroscopía MIR y NIR	Ninguna	Agitación, filtración	-	-	-	-	[Iñón, 2006]
FIA	Sí	Espectroscopía NMR	Ninguna	Filtración, ultrasonidos, dilución 9:10	-	-	-	5	[Lachenmeier, 2005]
CFA	Sí	Espectrometría FTIR	Ninguna	Filtración, ultrasonidos	Hasta 45	0,1	0,4 - 47	-	[Lachenmeier, 2010]
SIA	Sí	Amperometría (enzima AOD inmovilizada)	Filtración, diálisis	Ninguno	0,02 – 3,79	-	2,2	50	[Lapa, 2003]
CFA	No	Amperometría (enzima AOD inmovilizada)	Desgasificación, GD	Ninguno	Hasta 0,6 (membrana 550 μm) Hasta 7,0 (membrana 500 μm)	1×10^{-4} (membrana 1500 μm)	2	30	[Mohns, 1995]
FIA	No	Espectrofotometría VIS	Reacción fotoquímica	-	3×10^{-5} - 6×10^{-3}	1×10^{-5}	1,5	60	[Pérez-Ruiz, 2005]

Tabla 2. Continuación.

Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, % (v/v)	LD, % (v/v)	RSD, %	Muestras/h	Referencia
FIA	No	Colorimetría (sensor óptico)	GD	Dilución 1:20	0,1 - 10	0,03	0,3 – 1,2	20	[Pinyou, 2011]
FIA	Sí	Espectrometría de masas	Filtración	–	–	6×10^{-4}	1,8 – 9,8	60	[Tarkiainen, 2005]
FIA	No	Amperometría (biosensor microbiano <i>Gluconobacter oxydans</i>)	Ninguna	Centrifugación, dilución hasta 6×10^{-3} % (v/v)	6×10^{-5} - 9×10^{-3}	2×10^{-5}	–	20	[Valach, 2009]
SIA-LOV	No	Espectrofotometría UV (enzima ADH inmovilizada)	Ninguna	Dilución 1:400	Hasta 0,04	0,003	1	27	[Vidigal, 2008]

Abreviaturas: ADH: alcohol deshidrogenasa. AOD: alcohol oxidasa. CFA: análisis en flujo continuo. FIA: análisis por inyección en flujo. FID: detector de ionización de llama. FTIR: infrarrojo con transformada de Fourier. GC: cromatografía de gases. GD: difusión gaseosa. IL: intervalo lineal. IR: infrarrojo. LD: límite de detección. LOV: "lab-on-valve". MIR: infrarrojo medio. NIR: infrarrojo cercano. NMR: resonancia magnética nuclear. RSD: desviación estándar relativa. SIA: análisis por inyección secuencial. UV: ultravioleta. VIS: visible.

3.1.4. Análisis de ácido láctico en cervezas

El ácido láctico (nombre de la IUPAC: ácido 2-hidroxipropanoico), o en su forma ionizada lactato, es un metabolito que puede encontrarse en casi todos los organismos vivos y, de forma natural o artificial, en muchos alimentos. Es un ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el grupo adyacente al grupo carbonilo, lo que lo convierte en un ácido hidroxílico. Posee un carbono asimétrico en posición "α", por lo que tiene dos isómeros ópticos: el dextrógiro, ácido D(+)-láctico, y el levógiro, ácido L(-)-láctico, de mayor importancia biológica (**Figura 6**). En los humanos y otros animales sólo está presente el isómero L- como intermedio normal en el metabolismo de los mamíferos, mientras que determinadas cepas bacterianas pueden producir tanto el isómero D- como el L- [**Ghaffar, 2014**]. La detección de lactato ha sido muy importante en diferentes ámbitos como son la medicina deportiva, el diagnóstico clínico y en la industria alimentaria [**Yang, 2008**].

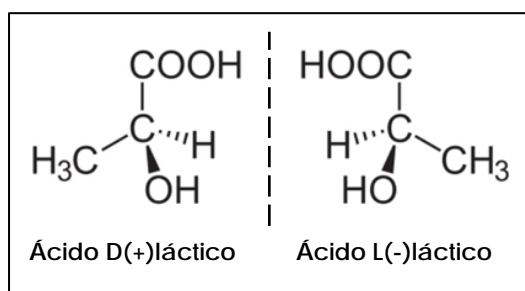


Figura 6. Isómeros ópticos del ácido láctico.

En el sector alimentario, el ácido láctico se encuentra en bebidas y alimentos como cerveza, vino, productos lácteos, vegetales, carnes y pescados, siendo indicador de procesos de fermentación relacionados con la frescura, estabilidad y calidad de procesado y almacenamiento de este tipo de productos [**Kriz, 2002**]. Asimismo, el lactato (en la forma de lactato de sodio) tiene aplicación como conservante de alimentos, y en la industria del vino es un parámetro importante a monitorizar en el transcurso de la fermentación maloláctica [**Rassaei, 2014**]. En el caso de la cerveza, el ácido láctico es un componente muy importante debido a su

contribución a la calidad, teniendo su presencia relación con el sabor característico de este tipo de bebidas fermentadas.

La cerveza es una bebida fermentada que consta de más de 2000 componentes presentes en un rango muy amplio de concentraciones, a partir de los niveles de ppt o menos hasta varios porcentajes. Además de agua y etanol, los carbohidratos son los componentes principales junto con proteínas, aminoácidos, sales, ácidos orgánicos y componentes de lúpulo. Los ácidos orgánicos incluyen oxo-ácidos no volátiles, ácidos volátiles, ácidos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta, y sus rangos de cantidad total se encuentran entre 220 y 700 mg L⁻¹. Los ácidos no volátiles, tales como el ácido láctico, son esencialmente todos los intermedios metabólicos o productos extraídos de la levadura de cerveza a partir del metabolismo de la maltosa. Por otro lado, los aminoácidos libres presentes en el mosto son metabolizados por la levadura durante la fermentación y están implicados en las vías biosintéticas que conducen a la formación de componentes de sabor importante, tales como los ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres, y compuestos de azufre [Bokulich, 2013]. El perfil de aminoácidos y ácidos orgánicos en la cerveza es un reflejo de la composición original del mosto al combinarse con el metabolismo de la levadura. La cerveza generalmente presenta un nivel de ácido láctico por encima de 200 mg L⁻¹ [Lachenmeier, 2005].

En la producción de la cerveza, como para cualquier alimento fermentado, la actividad microbiana está involucrada en cada paso de su producción, condicionando muchas de las características sensoriales que contribuyen a la calidad final. Mientras que la fermentación de los extractos de cereales por *Saccharomyces* es el proceso microbiano más importante involucrado en la industria cervecera, existe una amplia gama de microorganismos que pueden afectar al proceso completo de fabricación y, por lo tanto, a la calidad del producto [Bokulich, 2013].

Durante la fermentación se generan ácidos producidos por el metabolismo de la levadura, y es necesario controlar y mantener la producción de oxo-ácidos a un mínimo con el fin de obtener la acidez y el pH deseados en el producto final [Bokulich, 2013]. Por lo tanto, es importante asegurar durante el proceso de producción que los ácidos no se generan en cantidades que puedan ser negativas

para las características organolépticas de la cerveza. Las bacterias ácido-lácticas, bacterias de ácido acético, así como las levaduras silvestres pueden deteriorar el cuerpo de la cerveza debido a la aparición de viscosidad, además de tener efectos perjudiciales sobre el sabor o el aroma de la misma [Sohrabvandi, 2010]. Así, el uso de cepas de levadura adecuadas, además del control de los niveles de nitrógeno y el contenido de tiamina, serían algunos de los factores que podrían ser modificados para llegar a un producto con las características deseadas [Viljoen, 2006]. No obstante, aunque la mayor parte de los ácidos orgánicos se originan en el metabolismo de la levadura durante la fermentación, los ácidos presentes en la cerveza final son, en gran parte también, los que formaban parte de la composición inicial de las materias primas de elaboración, de las cuales la malta sería el principal contribuyente. En ocasiones se puede emplear una malta ácida [Lowe, 2004], y en este caso el pH y acidez finales de la malta estarían relacionados en gran medida con la composición de ácidos orgánicos [Viljoen, 2006]. El contenido de ácidos depende de la variedad de cebada de malta y de las condiciones de malteo, incluyendo remojo, germinación y secado al horno [Bokulich, 2013], aunque no existe una razón clara para explicar este fenómeno.

Los ácidos orgánicos de la malta y la cerveza, y el ácido láctico en particular, son importantes por diferentes aspectos:

- Contribuyen a los cambios en el pH, la acidez y a la capacidad tampón [Lowe, 2004].
- Proporcionan su propio olor característico, aroma y sabor [Abbas, 2006]. A pesar de que su concentración en la cerveza está normalmente muy por debajo de su umbral sensorial, éstos pueden influir en el sabor de la cerveza indirectamente, a través de interacciones sinérgicas con los otros ácidos orgánicos y/o de otros constituyentes activos del sabor, así como mediante la combinación con ciertos alcoholes para formar ésteres.
- Pueden ser indicadores útiles a monitorizar durante el proceso de fermentación y la elaboración de la cerveza. Así, es clara la utilidad del ácido láctico como huella dactilar de la cerveza pudiendo proporcionar información importante sobre la calidad del producto y de su historia [Viljoen, 2006].

Se puede describir y resumir el comportamiento de los diferentes ácidos orgánicos durante el malteado y proceso de elaboración de la cerveza como a continuación se indica:

Durante el proceso de malteado el contenido de ácido láctico, por ejemplo, parece aumentar rápidamente durante el remojo, disminuye lentamente durante la germinación, y continúa con otro aumento durante el proceso de secado al horno. No obstante, también existen datos de que durante la germinación las concentraciones de ácido láctico aumentan, y que esta producción es probablemente debida a acciones microbianas durante el proceso de germinación [Viljoen, 2006].

Durante el proceso de elaboración de la cerveza la concentración de ácidos orgánicos parece aumentar durante la etapa de fermentación. Después de la siembra con el cultivo de levadura seleccionado, el crecimiento de las células de ésta produce un notable aumento de los ácidos orgánicos. Así, los niveles de ácido D-láctico y de ácido L-láctico aumentan durante la fermentación primaria, alcanzando un máximo al cuarto o quinto día, y también aumentan durante la mitad de la guarda. Sin embargo, las bacterias también pueden producir algunos ácidos orgánicos (acético y láctico) como productos de metabolismo principales de la fermentación de los carbohidratos, y sus concentraciones aumentan rápidamente en la cerveza contaminada. Es decir, el motivo más frecuente del deterioro de la cerveza es por contaminación con bacterias que producen D- y L-lactato. Sólo una estrecha gama de microorganismos puede crecer en la cerveza, y las bacterias lácticas son los principales microorganismos que pueden deteriorar el perfil cualitativo de la cerveza [Sohrabvandi, 2011].

Las bacterias lácticas constituyen un grupo diverso de microorganismos Gram-positivos que existen dentro de las plantas, la carne y los productos lácteos, y pueden producir ácido láctico como producto de la glucólisis anaeróbica con un rendimiento y productividad altos. Las condiciones óptimas de crecimiento de estas bacterias varían dependiendo de los productores, ya que pueden crecer en el intervalo de pH de 3,5-10,0 y de temperatura de 5-45°C [Abdel-Rahman, 2013]. Dentro de este grupo de bacterias, comúnmente conocido como bacterias del ácido láctico (LAB) [Bokulich, 2013], destacan la *S. salivarius subsp.*, dentro del

género *Streptococcus*, y del género *Lactobacillus* destaca la *L. delbrueckii subsp.*, aunque *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei* y *L. acetotolerans* se han identificado como las bacterias contaminantes más comunes, siendo *L. brevis* la especie más frecuentemente aislada. Las LAB forman una mezcla de D- y L-lactato con significativa contribución de D-lactato al total. En el mosto y la cerveza la transformación de glúcidos en ácido láctico, después de la contaminación por las bacterias lácticas, puede dar lugar a una acidificación excesiva del producto y un posterior cambio en el sabor (Figura 7) [Viljoen, 2006]. De hecho, un aumento de la concentración de D-lactato por encima de 1 mmol L^{-1} ($0,09 \text{ g L}^{-1}$) en la cerveza provoca la generación irreversible de un desagradable gusto amargo; el resultado es una cerveza imbebible debido a la producción adicional de ácido láctico y diacetilo y a la turbidez generada. Es decir, este fenómeno podría impedir la venta de la cerveza con las consiguientes pérdidas económicas. Por lo tanto, una monitorización de los contenidos individuales de D(+) y L(-) lactato y el descubrimiento oportuno de la presencia no deseada de las bacterias lácticas sería muy útil para el cervecero.

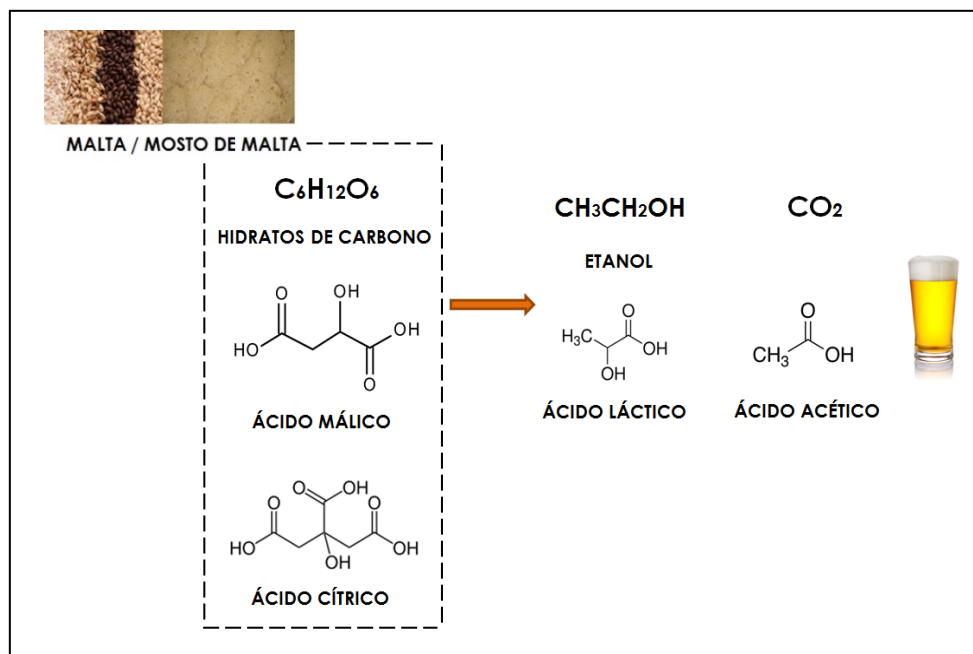


Figura 7. Productos de fermentación generados en la fabricación de la cerveza.

La formación de ácido láctico en la cerveza microbiológicamente contaminada está acompañada por una disminución en la concentración de ácido málico o cítrico (Figura 7)(dependiendo de la especie de microorganismo responsable) [Viljoen, 2006]. La relación entre la población microbiana y el contenido de ácido láctico en la cerveza, y su influencia en la presencia y severidad de los defectos de calidad (mal sabor y turbidez biológica), varía en función de las características inherentes al estilo de cerveza o de la marca individual y la capacidad de los microorganismos para crecer en la cerveza. Aquellos que poseen una amplia gama de capacidades bioquímicas tienen una mayor propensión a causar el deterioro.

Así pues, el seguimiento de los ácidos orgánicos y, en particular, de los niveles de ácido láctico en malta, mosto de malta y cerveza puede ayudar a asegurar un proceso de producción de calidad uniforme. Para ello, la industria cervecera necesita poder abordar los siguientes retos:

- Controlar que la concentración en cerveza de los isómeros D- y L- del ácido láctico estén dentro de un rango, en proporción con el pH requerido.
- Investigar los factores que influyen en la concentración y proporción de ambos enantiómeros en la cerveza.

Actualmente, la monitorización del ácido láctico en la cerveza se realiza "off-line" mediante métodos cromatográficos, electroforéticos o espectroscópicos, o utilizando ensayos enzimáticos (para el análisis diferenciado de D- y L-láctico) como métodos de referencia. Sin embargo, la mayoría de ellos necesitan un tratamiento previo de las muestras a ser analizadas, son laboriosos, de elevado coste, y, en la mayoría de los casos, no pueden distinguir entre los isómeros de lactato.

La industria cervecera necesita disponer de una metodología fiable para la determinación de los dos isómeros del ácido láctico durante el procesamiento de la cerveza, ya sea trabajando "off-line", "at-line" u "on-line", siendo el último modo de análisis el que posibilitaría conocer en tiempo real si existe contaminación por microorganismos en el proceso de elaboración de la cerveza, y las técnicas en flujo proporcionan una metodología idónea para llevarlo a cabo.

3.1.4.1. Antecedentes bibliográficos

Con el fin de obtener métodos de análisis que hagan factible la monitorización de la producción de cerveza y la pronta detección de una posible contaminación no controlada de microorganismos en la línea de producción, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos, sirviéndose para ello de técnicas de análisis no tradicionales.

La mayor parte de los desarrollos basados en técnicas espectroscópicas, llevados a cabo para la determinación de ácido láctico en la industria de las bebidas fermentadas, se han orientado mayormente hacia la monitorización de la fermentación maloláctica en la producción de vinos, siendo la espectroscopía infrarroja la más empleada para las determinaciones en discontinuo ([Moreira, 2005], [Regmi, 2012]). Los métodos espectroscópicos generalmente se han empleado para la determinación del ácido láctico total, además de otros ácidos orgánicos, presente en el vino. Los mayores inconvenientes que presentan, como se ha comentado anteriormente, son el coste y complejidad de la instrumentación que implican, requiriendo analistas cualificados, además del tiempo de análisis que consumen.

Los biosensores representan una tecnología de análisis ideal para la determinación estereoespecífica de los enantiómeros del ácido láctico, gracias al alto grado de selectividad inherente al fenómeno de biorreconocimiento por un sistema biológico. Dentro de éstos, los biosensores enzimáticos amperométricos han sido ampliamente estudiados debido a las buenas prestaciones que ofrecen con respecto a los tiempos cortos de análisis, alta sensibilidad y selectividad, además de la simplicidad de los métodos. Así, en la **Tabla 3** se muestran algunos de los biosensores enzimáticos amperométricos desarrollados en los últimos años para la determinación del ácido D-láctico, trabajando en disoluciones agitadas. Como se puede ver en dicha tabla, la enzima más utilizada para la fabricación de los biosensores es la DLDH (D-lactato deshidrogenasa), inmovilizada junto con un mediador redox ([Arvinte, 2008^B], [Avramescu, 2001], [Avramescu, 2002^A], [Avramescu, 2002^B], [Darie, 2007]) o también junto con la diaforasa formando un sistema bienzimático ([Gros, 2000], [Gros, 2004], [Gué, 2002], [Tap, 2000]). Otra enzima es la DLCR (D-lactato citocromo C oxidorreductasa) ([Pohanka, 2008],

[Smutok, 2014]), aunque ésta se ha empleado en menor extensión que la DLDH para el desarrollo de biosensores de ácido D-láctico. Asimismo, se ha encontrado que la mayor parte de estos biosensores han sido aplicados para el análisis de ácido D-láctico en vinos ([Avramescu, 2001], [Avramescu, 2002^A], [Avramescu, 2002^B], [Darie, 2007]).

Con respecto a la determinación del ácido L-láctico mediante amperometría en disoluciones agitadas con biosensores enzimáticos, se han llevado a cabo desarrollos monoenzimáticos basados en el empleo de la enzima LOD (lactato oxidasa) ([Goriushkina, 2009], [Paz, 2010], [Paz, 2011], [Shkotova, 2008]) y la enzima LDH (lactato deshidrogenasa) ([Agüí, 2009], [Pérez, 2012^A], [Rahman, 2009]) para su aplicación en vino y cerveza. La enzima LOD también ha sido inmovilizada junto con otras enzimas para constituir un sistema bienzimático, como es la HRP (peroxidasa) ([Gamella, 2010^A], [Monosik, 2012^A], [Pérez, 2012^B]), o la LDH [Chaubey, 2000], obteniendo una amplificación de la señal. Asimismo, también se ha llevado a cabo el desarrollo de un sistema multienzimático basado en el empleo de LOD/HRP/DLDH que permite la detección de los dos isómeros del ácido láctico [Mazzei, 2007].

Con respecto a los métodos en continuo, como son los basados en el empleo de técnicas cromatográficas y electroforéticas, éstos se han utilizado para la determinación tanto del ácido láctico total contenido en una muestra como para la determinación diferenciada de los dos enantiómeros de este ácido. Así, en el caso de la cromatografía, se ha utilizado la técnica HPLC para el análisis del ácido láctico, junto con otros ácidos orgánicos, sobre todo para el seguimiento de la fermentación maloláctica en muestras de vino ([Pereira, 2010], [Pérez-Ruiz, 2004], [Quirós, 2009], [Zotou, 2004]). Sin embargo, aunque en menor medida, esta técnica también se ha utilizado para la detección diferenciada de los ácidos D- y L-láctico en vino y en cerveza, posibilitado por la previa separación de ambas especies ([Buglass, 2001], [Buglass, 2003]). Del mismo modo, se ha trabajado con la electroforesis para la determinación del ácido láctico total, sobre todo para la monitorización de la fermentación maloláctica en muestras de vino ([Castiñeira, 2012], [Esteves, 2004], [Mato, 2006], [Rovio, 2011]), en cuanto a bebidas fermentadas se refiere. Este tipo de técnicas también permiten la determinación por separado de

los dos isómeros del ácido láctico: [Saavedra, 2002] y [Tan, 2005] lo llevaron a cabo en fluidos biológicos y [Kodama, 2000] en cervezas.

Como puede observarse, los métodos cromatográficos y electroforéticos se han utilizado de manera más amplia para la determinación multiparamétrica en las muestras de bebidas fermentadas, posibilitando la obtención de una mayor cantidad de información en un único análisis. No obstante, este tipo de métodos está caracterizado por ser laboriosos, requerir pretratamiento de muestra, ofrecer frecuencias de muestreo bajas, además de estar limitado su uso al análisis "off-line". Por ello, los métodos basados en las técnicas de análisis en flujo se postulan como alternativas que proporcionan características interesantes. Estos sistemas de análisis, como se ha comentado extensamente, ofrecen la posibilidad de llevar a cabo de manera rápida, precisa y eficiente, una monitorización "on-line", obteniendo en tiempo real la variación del nivel de ácido láctico durante el proceso de elaboración de la bebida fermentada en la planta de producción, así como en el producto final. En la **Tabla 4** se muestran métodos de análisis en flujo de ácido láctico, automáticos y no automáticos, en cerveza, vino y muestras fermentadas, recogidos de la bibliografía. Así, para la medida del ácido láctico total se han empleado sistemas de inyección en flujo con detección espectroscópica ([Dias, 2010], [Kritsunankul, 2009], [Lachenmeier, 2005]) y electroquímica [Kotani, 2004]. Sin embargo, para la determinación específica de un isómero de ácido láctico, es la detección biosensora la empleada de manera más amplia con los sistemas FIA. Para la detección en flujo del ácido L-láctico se ha utilizado tanto la enzima LOD ([Esti, 2004], [Kumar, 2001], [Lowinson, 2008], [Sanini, 2015], [Tumang, 2001]) como LLDH [Mataix, 2001]. También se ha llevado a cabo satisfactoriamente la determinación simultánea del ácido D-láctico y del ácido L-láctico operando con sistemas de detección múltiples, ya sea mediante el empleo de dos biosensores que trabajan de manera individual [Girotti, 2000], o de un biosensor dual [Nanjo, 2006], en ambos casos basándose la fabricación de los biosensores en el empleo de enzimas selectivas de cada analito. Por lo tanto, la tecnología de los biosensores es la más apropiada para llevar a cabo la monitorización del ácido láctico en flujo, pudiendo discriminar entre ambos isómeros sin dificultades, y, por lo tanto, obteniendo métodos de análisis que permiten conocer en tiempo real la relación entre D-láctico y L-láctico.

Tabla 3. Biosensores enzimáticos amperométricos para la determinación de ácido D-láctico trabajando en discontinuo.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
DLDH	SPE modificado con SWNTs	MB	Atrapamiento en una matriz de sol-gel; adsorción	-0,05 (vs. Ag/AgCl)	-	(9,008 – 2340)x10 ⁻³	1,4x10 ⁻³	2,04x10 ³	[Arvinte, 2008 ^B]
DLDH	SPE de grafito modificado con MB	MB-RS	Co-inmovilización junto a NAD ⁺ en polietilenimina y Nafión	-0,05 (vs. Ag/AgCl)	Vino	(9,0 – 90)x10 ⁻³	4,5x10 ⁻³	2,30x10 ³	[Avramescu, 2001]
DLDH	SPE de grafito modificado con MB	MB-RS	Atrapamiento en matriz de PVA-SbQ, polietilenimina y Nafión	-0,15 (vs. Ag/AgCl)	Vino	(4,5 – 90)x10 ⁻³	2,7x10 ⁻³	3,11x10 ³	[Avramescu, 2002 ^A]
			Co-inmovilización junto al NAD ⁺ por adsorción			(6,8 – 90)x10 ⁻³	4,5x10 ⁻³	6,54x10 ³	

Tabla 3. Continuación.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
DLDH	SPE de grafito modificado con MB	MB	Atrapamiento en matriz de PVA-SbQ	0,0 (vs. Ag/AgCl)	Vino	(4,5 – 90)x10 ⁻³	2,7x10 ⁻³	–	[Avramescu, 2002 ^B]
		MB-RS	Co-inmovilización junto al NAD ⁺ por adsorción			(6,8 – 90)x10 ⁻³	4,5x10 ⁻³	–	
DLDH	–	Hexacianoferrato	–	–	Vino	(1,80 – 495)x10 ⁻³	9,0x10 ⁻⁵	7,23x10 ³	[Darie, 2007]
DLDH/DP	Electrodo de disco de platino	Hexacianoferrato	Película de polipirrol y mediador obtenida por electropolimerización; enzimas en disolución	+0,1 (vs. SCE)	–	(9,008 – 1802)x10 ⁻⁴	9,0x10 ⁻⁴	–	[Gros, 2000]
						(9,01 – 721)x10 ⁻⁴	2,2x10 ⁻⁴	–	

Tabla 3. Continuación.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
DLDH/DP	Electrodo de disco de platino	Hexacianoferrato	Película de polipirrol y mediador obtenida por electropolimerización; enzimas en disolución	+0,1 (vs. Pt)	-	(9,01 – 901)x10 ⁻⁴	4,5x10 ⁻⁴	-	[Gros, 2004]
			Película de polipirrol y mediador obtenida por electropolimerización; co-inmovilización de enzimas y NAD-dextrano mediante membrana semipermeable			(4,50 – 180)x10 ⁻³	9,0x10 ⁻⁴	-	
DLDH/DP	Electrodo de disco de oro	Hexacianoferrato	Co-inmovilización mediante atrapamiento con membrana	+0,2 (vs. Au)	-	(4,504 – 1351)x10 ⁻⁴	4,5x10 ⁻⁴	-	[Gué, 2002]
LOD/HRP/DLDH	Electrodo de Clark	-	Membrana de Nylon funcionalizada con grupos carbonilos	-0,65 (vs. Ag/AgCl)	Vino	(5,00 – 300)x10 ⁻³	2,5x10 ⁻³	1,20x10 ²	[Mazzei, 2007]
DLCR	Pasta de carbono	PMS-RS	Atrapamiento en pasta de carbono con GA	0,0 (vs. Ag/AgCl)	Cerveza	(1,351 – 9008)x10 ⁻³	-	2,12x10 ¹	[Pohanka, 2008]

Tabla 3. Continuación.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
DLCR	Electrodo de grafito	Citocromo C	Inmovilización sobre una capa de polímero electrodepositado modificado con complejo de osmio	+0,25 (vs. Ag/AgCl)	-	-	5,0x10 ⁻³	-	[Smutok, 2014]
						-	2,8x10 ⁻⁴	-	
DLDH/DP	Electrodo de oro	Hexacianoferrato	Co-inmovilización mediante atrapamiento con membrana de diálisis	+0,2 (vs. Au)	-	(1,8 – 99)x10 ⁻³	-	-	[Tap, 2000]
						(4,504 – 1351)x10 ⁻⁴	9,0x10 ⁻⁴	-	

Abreviaturas: DLCR: D-lactato citocromo C oxidorreductasa. DLDH: D-lactato deshidrogenasa. DP: diaforasa. GA: glutaraldehído. HRP: peroxidasa de rábano. IL: intervalo lineal. LD: límite de detección. LOD: lactato oxidasa. MB: azul de Méldola. NAD⁺/NADH: forma oxidada y reducida del cofactor dinucleótido de adenina y nicotinamida. PMS: metasulfato de fenazina. PVA-SbQ: polivinilalcohol fotoentrecruzable que contiene grupos stilbazolium. RS: sal de Reinecke. SCE: electrodo de calomelanos saturado. SPE: electrodo impreso. SWNTs: nanotubos de carbono de pared simple.

Tabla 4. Métodos de análisis en flujo para la determinación de ácido láctico en cerveza, vino y muestras fermentadas.

Análito	Muestra	Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	RSD, %	Muestras/h	Referencia
Láctico total	Mosto fermentado	SIA	No	Espectrofotometría VIS	Reacción con reactivos, GD	Homogeneización, centrifugación, filtración, dilución 1:2 y ultrasonidos	(2,0 – 10)x10 ⁻²	1,6x10 ⁻⁴	1,5	22	[Dias, 2010]
L-láctico	Vino	FIA	Sí	Amperometría (enzima LOD inmovilizada)	Ninguna	Dilución 1:200	(4,5 – 90)x10 ⁻³	1,8x10 ⁻⁴	3,5	20	[Esti, 2004]
D- y L-láctico	Cerveza	FIA	No	Luminiscencia (biosensor enzimático de DLDH y LLDH)	-	Ajuste del pH, dilución 1:2	(9,01 – 901)x10 ⁻³	-	D: 6,7 L: 4,6	20	[Girotti, 2000]
Láctico total	Vino	FIA	No	Voltamperometría	Desgasificación, separación (HPLC)	Vino: Dilución 1:50, Fermentado: Dilución 1:20	(7,206 – 2702)x10 ⁻⁴	-	< 2,5	-	[Kotani, 2004]

Tabla 4. Continuación.

Analito	Muestra	Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	RSD, %	Muestras/h	Referencia
Láctico total	Vino	FIA	No	Espectrofotometría UV (sistema HPLC-detector UV)	Diálisis	Ninguno	(2,5 – 75)x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻¹	0,1 - 5,4	7,5	[Kritsunankul, 2009]
L-láctico	Caldo de fermentación	FIA	Sí	Amperometría (biosensor enzimático de LOD)	Diálisis	-	1 - 60	-	-	20	[Kumar, 2001]
Láctico total	Cerveza	FIA	Sí	Espectroscopía NMR	Ninguna	Filtración, ultrasonidos, dilución 9:10	-	-	-	5	[Lachenmeier, 2005]
L-láctico	Cerveza	FIA	No	Amperometría (biosensor enzimático de LOD)	-	-	(3,60 – 252)x10 ⁻⁴	1,8x10 ⁻⁵	2,2	200	[Lowinson, 2008]

Tabla 4. Continuación.

Analito	Muestra	Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	RSD, %	Muestras/h	Referencia
D- y L-láctico	Cerveza, vino, sake	FIA	Sí	Amperometría (biosensor dual enzimático de DLDH/DP y LLDH/DP)	Microdiálisis (sonda)	Cerveza: Dilución 1:10. Vino: Dilución 1:25. Sake: Dilución 1:10	(1,8 – 90)x10 ⁻³	–	2,5	–	[Nanjo, 2006]
L-láctico	Vino	FIA	No	a)Espectrofotometría UV (Enzima LLDH inmovilizada)	Diálisis	Dilución 1:2 en el caso de vinos dulces	0,1 – 1,0	0,05	2 - 6	15	[Mataix, 2001]
L-láctico	Vino	FIA	No	b)Fluorimetría			0,05 – 1,50	0,01	2 - 6		
L-láctico	Vino	FIA	No	Amperometría (biosensor enzimático de LOD)	Ninguna	Dilución y filtrado	(4,50 – 901)x10 ⁻⁴	4,5x10 ⁻⁴	–	20 - 40	[Saninni, 2015]
L-láctico	Material de ensilado	M-SFA	Sí	Espectrofotometría VIS (enzimas LOD, POD)	Reacción con reactivo	Disolución, filtración y dilución 1:10	(1,0 – 10)x10 ⁻²	2,0x10 ⁻³	2	16	[Tumang, 2001]

Abreviaturas: DLDH: D-lactato deshidrogenasa. DP: diaforasa. FIA: análisis por inyección en flujo. GD: difusión gaseosa. HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia. IL: intervalo lineal. LD: límite de detección. LLDH: L-lactato deshidrogenasa. LOD: lactato oxidasa. NMR: resonancia magnética nuclear. M-SFA: análisis en flujo segmentado con multiconmutación. POD: enzima peroxidasa. RSD: desviación estándar relativa. SIA: análisis por inyección secuencial. UV: ultravioleta. VIS: visible.

3.1.5. Análisis de ácido málico en vinos

El ácido málico (nombre de la IUPAC: ácido 2-hidroxiutanodioico) es uno de los ácidos más abundantes en la naturaleza. Se encuentra en algunas frutas y verduras con sabor ácido como el membrillo, las uvas, las manzanas y las cerezas no maduras. La molécula del ácido málico contiene un carbono asimétrico, por lo que posee dos isómeros ópticos: el ácido D-málico y el ácido L-málico. En la naturaleza, casi todo el ácido málico se produce en la forma racémica L (**Figura 8**) (con excepción de algunos microorganismos que producen ácido D-málico). En las uvas maduras, el ácido L-málico se encuentra en una concentración promediada entre 2 y 6,5 g L⁻¹ [Volschenk, 2006], siendo, junto con el ácido tartárico, uno de los ácidos presentes en mayor proporción en el jugo de uva [Mato, 2005].

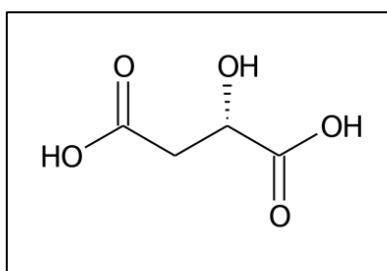


Figura 8. Fórmula del ácido L-málico.

Comercialmente, el ácido málico se produce como una mezcla racémica D/L mediante la hidratación catalítica del anhídrido maleico, y puede reemplazar al ácido cítrico en alimentos como acidulante y potenciador del sabor. Así, en alimentación, se emplea como aditivo acidulante (E 296) [p. web 10] en bebidas gaseosas y refrescos con la finalidad de equilibrar la dulzura producida por la adición de azúcares. La situación legal de la adición de ácido D/L-málico varía en los diferentes países [Megazyme, 2004].

El vino es una bebida obtenida de la uva mediante la fermentación alcohólica de su mosto o zumo. La fermentación se produce por la adición metabólica de levaduras que transforman los azúcares del fruto en etanol y gas en forma de dióxido de carbono. El vino consta de dos componentes primarios, que

son el agua y el etanol. No obstante, el sabor característico de esta bebida depende de 20 o más compuestos adicionales y, asimismo, las sutiles diferencias que distinguen a una variedad de vino de otra dependen de un número aún mayor de compuestos [Jackson, 2008]. Sin embargo, el sabor y las sensaciones primarios de un vino en la boca se deben principalmente a unos pocos compuestos que, individualmente, están presentes en concentraciones superiores a $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Éstos incluyen al agua, alcohol (etanol), ácidos fijos (tartárico y málico principalmente, o láctico), azúcares (glucosa y fructosa), y glicerol (Figura 9) [Jackson, 2008].

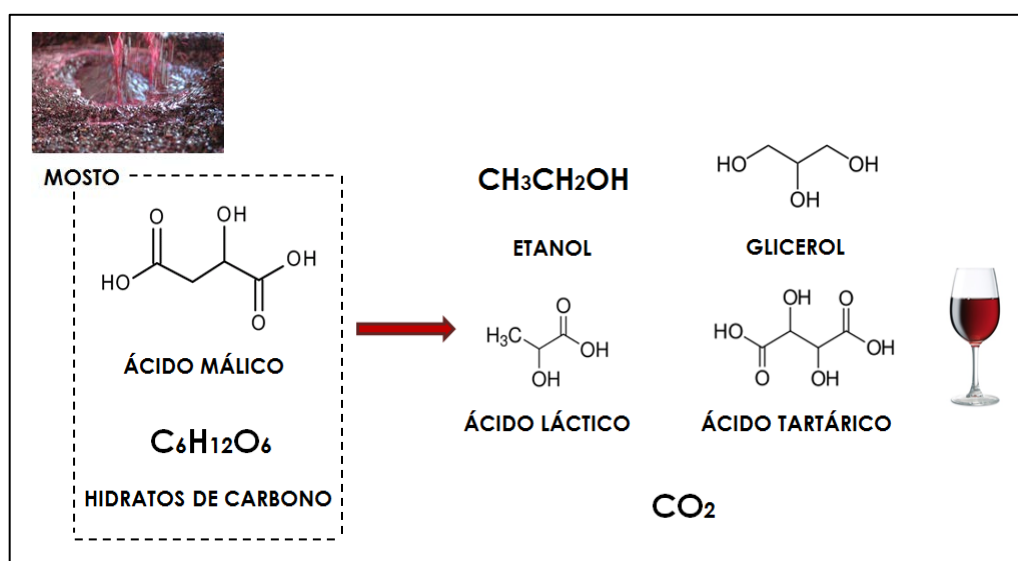


Figura 9. Productos de fermentación generados en la elaboración del vino.

Como grupo, los ácidos son casi tan importantes en lo referente a las características de los vinos como los alcoholes. Los ácidos no sólo generan un sabor refrescante (o ácido, si hay un exceso), sino también condicionan la percepción del sabor y otras sensaciones en la boca, y además tienen un papel fundamental en el mantenimiento de un pH bajo, crucial para la estabilidad de los vinos [Jackson, 2008].

El parámetro de acidez en el vino se divide principalmente en dos categorías: volátiles y fijos. La acidez volátil se refiere a los ácidos que se pueden eliminar fácilmente por destilación, mientras que la acidez fija incluye aquellos que son poco volátiles. Esta última procede de los ácidos orgánicos extraídos de la uva en el

mosto durante la recolección y la trituración, y son el tartárico, málico, y cítrico los ácidos predominantes. Además, tras los procesos posteriores de fermentación, producidos por el metabolismo combinado de levaduras y bacterias, se generan más especies que contribuyen a la acidez del vino [Volschenk, 2006]. Cuantitativamente, sin embargo, los ácidos que controlan el pH del vino son los que representan la acidez fija, y en las uvas, el ácido L-málico, junto con el L-tartárico, a menudo constituye más del 90 % de este tipo de acidez. La acidez total es la combinación de ambas categorías, y se puede expresar en términos de ácido tartárico, málico, cítrico, láctico, sulfúrico, o equivalentes de ácido acético, aunque son el tartárico y el málico los compuestos que dominan la composición ácida de los vinos [Jackson, 2008].

La composición química de la uva cosechada condiciona en gran medida la composición del mosto en el inicio de la vinificación y, en última instancia, la calidad final del vino embotellado. Además de la importancia de los compuestos implicados en el sabor, la presencia o ausencia de ácidos orgánicos en el vino juega un papel fundamental en la producción de vinos de calidad. La acidez en el vino, directa o indirectamente, afecta a las diferentes etapas del proceso de elaboración del vino y, por tanto, determina la calidad del vino en términos del carácter organoléptico y estético percibidos. Asimismo, también influye en el potencial de envejecimiento o la vida útil del vino, ya que determina la estabilidad física, bioquímica y microbiana del mismo [Volschenk, 2006].

El ácido málico, individualmente, puede llegar a constituir la mitad de la acidez total de las uvas y el vino. Su concentración en la fruta tiende a disminuir a medida que maduran las uvas, especialmente durante los períodos de mayor temperatura al final de temporada, y esto puede derivar en la producción de un vino con sabor insípido, y susceptible al deterioro microbiano. Por el contrario, en un ambiente fresco, el nivel de ácido málico puede permanecer alto y proporcionar al vino resultante un sabor amargo. Así, el nivel de ácido málico es un parámetro muy importante para los enólogos, utilizado como indicador de la fecha en que ha de llevarse a cabo la cosecha [Jackson, 2008].

El ajuste de la acidez en el mosto o en el vino es complejo, teniéndose que tener en cuenta una serie de factores para seleccionar el método correcto y el

momento para rectificar dicha acidez. La eliminación del exceso de acidez del vino mediante métodos físico-químicos normalmente conlleva procedimientos que consumen mucho tiempo y, además, se suele asociar con una reducción de la calidad del mismo [Pretorius, 2000].

Los enólogos emplean rutinariamente la fermentación maloláctica bacteriana para desacidificar el vino [Volschenk, 2006]. La fermentación maloláctica, también llamada segunda fermentación o fermentación lenta, consiste en la conversión bacteriana del ácido L-málico del vino en dióxido de carbono (CO_2) y ácido L-láctico. Así, 1 g de ácido L-málico se convierte en 0,67 g de ácido L-láctico y 0,33 g de CO_2 (Figura 9). Este proceso de desacidificación biológica tiene poco efecto sobre la acidez total del vino, pero sí aumenta la diversidad de su composición química [Jackson, 2008]. La acidez en el vino, y más específicamente el pH, juega un papel importante en la conservación de su aroma y sabor, ya que influye en la velocidad de oxidación en dicho producto [Volschenk, 2006]. En este proceso se van a producir un conjunto de modificaciones que van a estabilizar el vino, sobre todo en lo que respecta a microorganismos, impidiendo que otras bacterias ataquen de forma competitiva al ácido L-málico para dar lugar a la formación ácido acético. Esta fermentación biológica, dependiendo del tipo de vino, debe ser evitada, controlada o incluso acelerada para aumentar la velocidad de transformación [Bucur, 2006]. Los vinos en los que se ha producido la fermentación maloláctica requieren menos cantidades de SO_2 , antioxidante añadido al vino, para mantener su estabilidad. Es decir, mientras que en éstos sólo se requieren concentraciones de 100-200 ppm de SO_2 , en los vinos en los que no se produce la fermentación maloláctica es necesario filtrar y adicionar SO_2 hasta alcanzar al menos una concentración de 150 ppm [p. web 11].

Aunque la fermentación maloláctica se considera el método más natural para el ajuste de la acidez del vino, existe una serie de problemas asociados con este proceso biológico. Cuando se produce después del embotellado, y durante el almacenamiento del vino, puede conducir a su deterioro, sobre todo en vinos con valores de pH superiores a 3,5. En las bodegas, en los vinos con baja acidez la fermentación maloláctica tiende a ocurrir espontáneamente y su aparición es impredecible e irregular, pudiendo tener lugar inmediatamente después de la

fermentación alcohólica, o sólo semanas o meses más tarde, o sólo después del embotellado, si el vino no se ha estabilizado correctamente, dando lugar a un producto de características impredecibles. El control de este proceso es crucial durante la elaboración del vino, ya que su desarrollo al final de la fermentación alcohólica es beneficioso, pero durante la etapa de maduración puede ir en detrimento de la calidad final del mismo. Así, es la monitorización de la concentración fluctuante de ácido L-málico lo que normalmente plantea problemas a los enólogos [Volschenk, 2006].

Disponer de una metodología que posibilite una detección temprana de cualquier anomalía en un proceso industrial es fundamental para garantizar la seguridad del mismo y mantener la calidad del producto. Por lo tanto, los enólogos necesitan herramientas que faciliten la monitorización continua y, de este modo, obtener una mejor reproducibilidad de producción [Urbia, 2012].

El método de referencia OIV ("Office International de la Vigne et du Vin") para la determinación de ácido L-málico en los vinos se basa en la oxidación de esta especie a oxalacetato en una reacción catalizada por la enzima L-malato deshidrogenasa y utilizando (NAD) (dinucleótido de nicotinamida-adenosina) como coenzima. La concentración de la forma reducida de la coenzima (NADH) formada se monitoriza fotométricamente a 340 nm. Cuando la muestra contiene más de 350 mg L⁻¹ de ácido málico se requiere una dilución previa [Luque de Castro, 2005].

La mayoría de los métodos analíticos para la monitorización de la composición del vino, reconocidos por la comunidad internacional como métodos oficiales de análisis, son métodos manuales caracterizados por una robustez y precisión altas, a pesar de que los métodos más recientes pueden estar basados en técnicas instrumentales modernas automatizadas. Sin embargo, los métodos manuales implican mucho tiempo, son tediosos y requieren un alto nivel de participación por parte del operador. Así, nuevos métodos más rápidos, que pueden proporcionar una adecuada sensibilidad, selectividad y precisión, pueden ayudar a salvar el problema relacionado con el gran número de muestras que se tienen que analizar con el fin de garantizar un adecuado seguimiento de la fermentación del vino [Luque de Castro, 2005].

3.1.5.1. Antecedentes bibliográficos

Como se ha comentado, aunque los métodos tradicionales de análisis de ácido málico son útiles, la mayoría resultan costosos, son tediosos, consumen mucho tiempo o no están disponibles fácilmente. Por ello, tienen un valor limitado dentro de las bodegas comerciales [Jackson, 2008]. Esto ha conducido al desarrollo de nuevas metodologías que posibiliten la monitorización de la fermentación maloláctica en un tiempo de estudio asumible en la bodega, es decir, en tiempo real.

Con respecto a las técnicas espectroscópicas, para el desarrollo de métodos para el análisis de ácido málico en vinos en discontinuo, la espectroscopía de infrarrojo ([Moreira, 2005], [Patz, 2004], [Queji, 2010], [Regmi, 2012]) ha sido la más utilizada para llevar a cabo el seguimiento de la fermentación maloláctica, ya que han permitido medir, además del ácido málico, otros ácidos orgánicos y parámetros químicos en el vino [Cozzolino, 2009]. Sin embargo, estos métodos resultan lentos y tediosos.

Como ya se ha comentado anteriormente de manera extensa, los biosensores representan una alternativa interesante a los métodos convencionales de análisis, ya que son rápidos y permiten realizar medidas directas [Nikolaus, 2008], y, en el caso concreto de los electroquímicos, el manejo es muy sencillo. En la **Tabla 5** se recogen algunos de los biosensores enzimáticos amperométricos desarrollados en los últimos años para la determinación del ácido málico, trabajando en disoluciones agitadas. En la mayoría de los desarrollos, se ha empleado la malato deshidrogenasa para la determinación del ácido málico, ya sea inmovilizada de manera individual ([Arvinte, 2008^A], [Manzoli, 2004], [Ruhai, 2012]), o junto con un mediador redox ([Alvareda-Sirvent, 2002], [Arvinte, 2009], [Gurban, 2006], [Maines, 2000]), así como trabajando en un sistema bienzimático con la diaforasa ([Gamella, 2010^A], [Monosik, 2012^B]), con la peroxidasa [Mazzei, 2007], con la piruvato oxidasa [Gooding, 2000], o con la NADH-oxidasa [Gurban, 2006].

No obstante, los métodos continuos resultan ventajosos frente a las metodologías en discontinuo. Los métodos basados en técnicas cromatográficas, sobre todo HPLC ([Eyéghé-Bickong, 2012], [Kelebec, 2009], [Pereira, 2010], [Quirós,

2009]), y electroforéticas ([Bianchi, 2005], [Mato, 2007], [Peres, 2009], [Rovio, 2011]) permiten obtener una mayor cantidad de información en cada análisis, ya que se puede llevar a cabo la determinación de varios parámetros en una muestra de vino. Sin embargo, la clara desventaja que presentan son el coste de la instrumentación y del mantenimiento, y el rendimiento de muestreo relativamente bajo que proporcionan [Luque de Castro, 2005]. Así, para la determinación de un único parámetro, el ácido málico en este caso, los métodos en discontinuo son exactos y precisos, pero proporcionan una baja frecuencia de muestreo por lo que su uso es limitado. Los métodos en continuo que ofrecen características más ventajosas son los basados en las técnicas de análisis en flujo, ya que su implementación no resulta costosa y proporcionan una frecuencia de muestreo alta. Asimismo, una forma de reducir aún más el coste, además del tiempo de análisis, es llevar a cabo la automatización de este tipo de métodos [Mato, 2005], y la instrumentación y diseño sencillos que conllevan estos desarrollos posibilitan que el dispositivo de análisis se pueda localizar en la misma planta industrial para controlar el proceso de la fermentación maloláctica [Luque de Castro, 2005]. En la **Tabla 6** se muestran métodos de análisis en flujo de ácido L-málico en vinos, automáticos y no automáticos, recogidos de la bibliografía. Como se puede observar en dicha tabla, se han encontrado desarrollos que se basan en técnicas espectroscópicas y electroquímicas, y, en ambos casos, emplean técnicas de inyección en flujo. Así, tanto en el caso de las espectroscópicas ([Kiba, 1995], [Mataix, 2001], [Segundo, 2003]) como de las electroquímicas [Esti, 2004], son los métodos enzimáticos los que proporcionan una mayor sensibilidad al método. Además, la principal ventaja que ofrece un método enzimático es su alta estereoespecificidad, posibilitando la determinación de los isómeros D- y L- de un mismo ácido orgánico [Mato, 2005].

Tabla 5. Biosensores enzimáticos amperométricos para la determinación de ácido L-málico trabajando en discontinuo.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V vs. Ag/AgCl	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
MDH	SPE de grafito	MB	Atrapamiento en una matriz sol-gel	-0,125	Vino	0 - 2	-	-	[Alvareda-Sirvent, 2002]
ME	SPE de carbono y rodio	Carbono rodiado	Adsorción	+0,30	Manzana, tomate y patata	(3,8 – 94)x10 ⁻³	3,8x10 ⁻⁴	6,89x10 ³	[Arif, 2002]
MDH	GCE modificado con CNTs	-	Adsorción; entrecruzamiento; atrapamiento con membrana de Nafión	+0,30	-	(1,3 – 8,0)x10 ⁻²	6,7x10 ⁻³	1,74x10 ³	[Arvinte, 2008 ^A]
MDH	GCE modificado con SWNTs	MB	Adsorción; atrapamiento con Nafión; atrapamiento en sol-gel	-0,05	-	(4,56 – 181)x10 ⁻³	4,0x10 ⁻⁴	6,47x10 ³	[Arvinte, 2009]
MQO	SPE de grafito	DPIP	Atrapamiento en PVA-SbQ	+0,05	Vino	(6,70 – 335)x10 ⁻⁴	6,7x10 ⁻⁴	6,36x10 ³	[Bucur, 2006]
		PMS		-0,01		(6,70 – 201)x10 ⁻⁴	6,7x10 ⁻⁴	1,30x10 ⁴	

Tabla 5. Continuación.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V vs. Ag/AgCl	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
MDH/DP	Disco de oro	TTF	Co-inmovilización de las enzimas y el mediador sobre un electrodo de disco de oro modificado con SAM de MPA, mediante una membrana de diálisis	+0,10	Vino	(6,97 – 268)×10 ⁻⁵	7,0×10 ⁻⁵	1,18×10 ⁴	[Gamella, 2010 ^A]
MDH/PyOx en disolución	Electrodo de platino	-	Atrapamiento en matriz de politiramina mediante electropolimerización; unión covalente con el polímero por inmersión en disoluciones de EDC y NHS	+0,65	-	(6,7 – 34)×10 ⁻²	1,3×10 ⁻³	2,03×10 ³	[Gooding, 2000]
MDH/NADHox	SPE de grafito modificado con el correspondiente mediador	PB	Atrapamiento en PVA-AWP	-0,10	Vino	(3,0 – 33)×10 ⁻³	6,0×10 ⁻⁴	2,71×10 ⁴	[Gurban, 2006]
MDH		MB		-0,15		(3,2 – 53)×10 ⁻³	3,2×10 ⁻⁴	5,26×10 ³	

Tabla 5. Continuación.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V vs. Ag/AgCl	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
ME	SPE de carbono	MB	Entrecruzamiento en membrana de polietilenimina-GA	+0,20	Vino	(1,34 – 134)x10 ⁻³	1,3x10 ⁻³	–	[Lupu, 2004]
MDH	SPE de platino	Hexacianoferrato	Atrapamiento en membrana de celulosa	+0,05	–	0,7 – 2,7	6,7x10 ⁻⁴	–	[Maines, 2000]
MDH	Electrodo de grafito	–	Inmovilización covalente en aminopropil-CPG con GA	+0,30	Zumo de fruta	(6,70 – 134)x10 ⁻⁴	6,7x10 ⁻⁴	1,01x10 ⁴	[Manzoli, 2004]
MDH/HRP	Electrodo de Clark	–	Membrana de Nylon funcionalizada con grupos carbonilos	-0,65	Vino	(9,00 – 270)x10 ⁻³	5,0x10 ⁻³	1,00x10 ²	[Mazzei, 2007]
MQO	SPE de carbono modificado con AuNPs	TTF	Entrecruzamiento con GA sobre el electrodo con BSA depositado	+0,10	Vino	(1,5 – 15)x10 ⁻⁵	1,5x10 ⁻⁵	5,15x10 ⁴	[Molinero-Abad, 2014]

Tabla 5. Continuación.

Enzimas	Electrodo	Mediador redox	Inmovilización	E, V vs. Ag/AgCl	Muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	Sensibilidad, nA g ⁻¹ L	Referencia
	SPE de oro					(1,3 – 70)x10 ⁻³	7,2x10 ⁻⁴	4,10x10 ³	
MDH/DP	SPE de oro modificado con MWCNTs	Ferrocianida	Atrapamiento entre dos capas de quitosano	+0,30	Vino	(1,3 – 82)x10 ⁻³	2,1x10 ⁻⁴	8,73x10 ³	[Monosik, 2012 ^B]
						(1,3 – 82)x10 ⁻³	2,4x10 ⁻⁴	9,10x10 ³	
MDH dependiente de NADP ⁺	SPE de carbono modificado con MWCNTs	-	Entrecruzamiento con EDC	-0,15	-	0 – 1,6x10 ⁻²	8,0x10 ⁻³	-	[Ruhail, 2012]

Abreviaturas: AuNPs: nanopartículas de oro. BSA: albúmina sérica bovina. CNTs: nanotubos de carbono. CPG: vidrio de poro controlado. DP: diaforasa. DPIP: 2,6-diclorofenol indofenol. EDC: hidrocloreuro de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. GA: glutaraldehído. GCE: electrodo de carbono vitrificado. HRP: peroxidasa de rábano. IL: intervalo lineal. LD: límite de detección. MB: azul de Méldola. MDH: malato deshidrogenasa. ME: enzima málica. MPA: ácido 3-mercaptopropanoico. MQO: malatoquinona oxidorreductasa. MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple. NAD⁺/NADH: forma oxidada y reducida del cofactor dinucleótido de adenina y nicotinamida. NADHox: oxidasa de la forma reducida del cofactor NAD⁺. NADP⁺: dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato. NHS: N-hidroxisuccinimida. PB: azul de Prusia. PMS: metasulfato de fenazina. PVA-AWP: polivinilalcohol fotopolimerizable soluble en agua. PVA-SbQ: polivinilalcohol fotoentrecruzable que contiene grupos stilbazolium. PyOx: piruvato oxidasa. SPE: electrodo impreso. RSD: desviación estándar relativa. SAM: monocapa autoensamblada. SWNTs: nanotubos de carbono de pared simple. TTF: tetratrafalvaleno.

Tabla 6. Métodos de análisis en flujo para la determinación de ácido L-málico en vino.

Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	RSD, %	Muestras/h	Referencia
FIA	Sí	Amperometría (enzima ME inmovilizada)	Dilución en bucle de mezcla con disolución de reactivo	Dilución 1:100	(1,3 – 54)x10 ⁻³	4,0x10 ⁻⁴	3,3	17	[Esti, 2004]
FIA	No	Quimioluminiscencia (enzimas MDH y NADHox co-inmovilizadas)	Dilución en bucle de mezcla	Filtrado y dilución 1:200	(4,023 – 3350)x10 ⁻⁵	1,1x10 ⁻⁵	0,54	30	[Kiba, 1995]
FIA	No	Voltamperometría	Desgasificación, separación (HPLC)	Vino: Dilución 1:50 Fermentado: Dilución 1:20 y filtrado	(1,07 – 402)x10 ⁻³	–	< 2,5	–	[Kotani, 2004]
FIA	No	Espectrofotometría (sistema HPLC-detector UV)	Diálisis, separación	Ninguno	(2,5 – 75)x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻¹	0,1 - 5,4	7,5	[Kritsanankul, 2009]
FIA	No	Espectrofotometría UV	Diálisis	Ninguno	0,4 – 3,0	9,0x10 ⁻²	3,1 – 4,3	20	[Lima, 1998]

Tabla 6. Continuación.

Técnica de flujo	Automático	Detección	Operación en flujo	Pretratamiento de muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	RSD, %	Muestras/h	Referencia
		a)Espectrofotometría UV			(5,00 – 100)x10 ⁻²	3,0x10 ⁻²	2 - 6		
FIA	No	(Enzima MDH inmovilizada)	Díálisis	Dilución 1:2 en el caso de vinos dulces				15	[Mataix, 2001]
		b)Fluorimetría			(2,00 – 150)x10 ⁻²	1,5x10 ⁻²	2 - 6		
FIA	No	Potenciometría (lengua electrónica)	Ninguna	–	(6,70 – 13400)x10 ⁻³	4,0x10 ⁻³	0,6	30	[Moreno i Codinachs, 2008]
SIA	Sí	Espectrometría FTIR	Dilución en cámara de mezcla	Ninguno	0 – 1,75	–	< 8	–	[Schindler, 1998]
SIA	No	Espectrofotometría UV (enzima MDH inmovilizada)	Ninguna	Dilución 1:25 y 1:50	(1,0 – 15)x10 ⁻²	9,0x10 ⁻³	1,3 – 14	22	[Segundo, 2003]
FIA	No	Amperometría (sensor microbiano)	Ninguna	Dilución 1:10	Hasta 0,67	–	–	15	[Ukeda, 1995]

Abreviaturas: FIA: análisis por inyección en flujo. FTIR: infrarrojo con transformada de Fourier. HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia. IL: intervalo lineal.

LD: límite de detección. MDH: malato deshidrogenasa. ME: enzima mállica. NAD⁺/NADH: forma oxidada y reducida del cofactor dinucleótido de adenina y nicotinamida. NADHox: oxidasa de la forma reducida del cofactor NAD⁺. RSD: desviación estándar relativa. SIA: análisis por inyección secuencial. UV: ultravioleta.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Instrumentación

3.2.1.1. Aparatos

Para llevar a cabo los diferentes experimentos y la fabricación de los bioanalizadores semiautomáticos y automatizados se han empleado:

- Detectores amperométricos mono y bicanal InBea Biosensores S.L.
- Bomba peristáltica Spetec Perimax.
- Bomba peristáltica Gilson Minipuls-2.
- Bombas peristálticas modelo WPM Welco.
- Válvulas de tres vías con llave Omnifit.
- Válvula manual de inyección de seis vías para análisis por inyección en flujo Omnifit.
- Electroválvulas de tres vías modelo X124LFB Sensortech.
- Fuente de alimentación de 24 V VEP24US24 XP Power.
- Sistema electrónico de control.
- Agitador magnético Velp Scientifica Microstirrer.
- Baño de ultrasonidos Branson 1510.
- pH-metro de precisión Crison Basic 20+ calibrado de la forma habitual con disoluciones reguladoras de pH 7,00, 4,00 y 9,21 a $(25 \pm 0,5)$ °C.
- Equipo Sputtering Emitech K550X.
- Espectrofotómetro de absorción UV visible Varian Cary-3 Bio y cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico.
- Prensa para pastillas Carver, Inc. IN, USA modelo 3851-0.

3.2.1.2. Electrodo, células de trabajo y dispositivos

Electrodos:

Las medidas electroquímicas se han llevado a cabo utilizando los siguientes electrodos:

- Electrodo de trabajo:
 - Electrodo de acero inoxidable con capa delgada de oro: acero inoxidable embutido en un cuerpo de material aislante (PVC) sobre el que se deposita una capa de oro mediante la técnica de "sputtering". Sustrato electródico empleado para la preparación de los biosensores de ácido L-málico y ácido D-láctico.
 - Electrodo compuesto de grafito-Teflón: pastilla modificada de grafito-Teflón embutida en un cuerpo de material aislante (Teflón) y en contacto con un tornillo de acero inoxidable. Sustrato electródico empleado para la preparación de un biosensor de alcohol desarrollado por el Grupo de Investigación.
- Biosensor de alcohol fabricado por InBea Biosensores S.L.
- Biosensor de ácido L-láctico fabricado por InBea Biosensores S.L.
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl/KCl (3 mol L⁻¹) BAS MF-2052.
- Electrodo auxiliar o contraelectrodo: electrodo de punta de Pt.

Células de trabajo:

- Las medidas electroquímicas en discontinuo se han llevado a cabo en células de vidrio Pobel de 5 mL y 10 mL y en células de plástico de 20 mL.
- Para las medidas en flujo se han utilizado células de metacrilato "wall-jet", de formato sencillo y doble para uno o dos electrodos de trabajo, de gran volumen diseñadas por el Grupo de Investigación.

- En la equipación de los prototipos automatizados se han utilizado células de metacrilato cilíndricas de pequeño volumen diseñadas por el Grupo de Investigación.

Dispositivos:

Los dispositivos empleados han sido diseñados por el Grupo de Investigación:

- Unidades muestreadoras de metacrilato simples de 10 y de 2 mm de diámetro de superficie de contacto.
- Unidades muestreadoras de metacrilato dobles de 20 y de 14 mm de diámetro de superficie de contacto.
- Desburbujeador de metacrilato.
- Placa de metacrilato con el circuito de flujo integrado.

3.2.2. Reactivos y muestras

Para la fabricación de los biosensores se ha empleado peroxidasa (HRP, Type II from *Horseradish* EC 1.11.1.7, Sigma 156 U mg⁻¹ sólido), alcohol oxidasa (AOD from *Pichia pastoris* EC 1.1.3.13, Sigma 1,32 U μL⁻¹), D-lactato deshidrogenasa (DLDH from *Lactobacillus leichmanii* EC 1.1.1.28, Sigma 148,92 U mg⁻¹ sólido), malato deshidrogenasa (MDH from *Thermus flavus* EC 1.1.1.37, Sigma 100 U mg⁻¹ sólido), diaforasa (DP from *Clostridium kluveri* EC 1.8.1.4, Sigma 8,0 U mg⁻¹ sólido), grafito Ultra carbon (Ultra "F" purity Grado 2-200, Harrison MI USA), Teflón (politetrafluoroetileno, Aldrich). Como mediadores redox se han utilizado ferroceno (Fc, Fluka) y tetratiafulvaleno (TTF, Aldrich).

Los sustratos utilizados han sido etanol absoluto (Scharlau), sal disódica del ácido L(-)málico (C₄H₄Na₂O₅, Sigma), sal sódica del ácido D(+)láctico (C₃H₅NaO₃, Aldrich) y sal de litio del ácido L(-)láctico (C₃H₅LiO₃, Sigma).

En los estudios de interferencias se ha utilizado D(+)glucosa anhidra (Panreac), D(-)fructosa (Sigma), L(+)arabinosa (Sigma), D(+)galactosa (Sigma), glicerol (Panreac), ácido cítrico (Merk), gluconato sódico (Sigma), ácido tartárico (Merk), ácido acético (Scharlau), ácido L-ascórbico (Fluka), D(-)glutamina (Sigma-Aldrich), D(+)maltosa (Sigma-Aldrich) y ácido succínico (Sigma-Aldrich).

Otros reactivos empleados: polvo de diamante de 3 μm (BAS), acetona (Panreac), acetato de etilo (Scharlau), fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4 , Panreac), fosfato monosódico anhidro (NaH_2PO_4 , Panreac), β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+ , Gerbu), membrana de diálisis (Snake Skin[®] Pleated Dialysis Tubing, Thermo Scientific 10.000 MWCO), membranas PTFE-Filter de diálisis de 0,45 y de 0,20 μm de tamaño de poro (Sartorius) y kit enzimático comercial 11 112 821 035 (R-Biopharm[®]) para la determinación de los isómeros D- y L- del ácido láctico.

Todos los reactivos empleados utilizados han sido de calidad para el análisis.

Muestras analizadas: en las determinaciones de etanol se han utilizado cervezas "0,0" y "Sin" comerciales y muestras ciegas facilitadas por una empresa cervecera. En las determinaciones de ácido L-málico se han empleado materiales de referencia certificados del Centre Œnologique de Bourgogne (Lote 2009) (Referencia 1: vino tinto que contiene ácido L-málico en una concentración de $(1,5 \pm 0,2) \text{ g L}^{-1}$. Referencia 2: vino blanco que contiene ácido L-málico en una concentración de $(1,02 \pm 0,07) \text{ g L}^{-1}$. Referencia 3: vino blanco que contiene ácido L-málico en una concentración de $(0,96 \pm 0,04) \text{ g L}^{-1}$. Referencia 4: vino rosado que contiene ácido L-málico en una concentración de $(5,6 \pm 0,6) \text{ g L}^{-1}$). En las determinaciones de ácido láctico se han analizado cervezas comerciales.

3.2.3. Procedimiento experimental

3.2.3.1. Preparación de disoluciones

Para preparar las disoluciones que se describen a continuación, se ha utilizado agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q:

Disoluciones de sustratos:

- *Medidas en amperometría en disoluciones agitadas:*

- **Disolución patrón de etanol 0,6 % (v/v):** se prepara diluyendo un volumen exacto de 30 μL de etanol absoluto enrasando hasta 5 mL con disolución reguladora de fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4.
- **Disolución patrón de ácido L-málico 8 g L^{-1} :** se disuelven 0,0542 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 8,0. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 8,0.
- **Disolución patrón de ácido D-láctico 9 g L^{-1} :** se disuelven 0,0560 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4.
- **Disolución patrón de ácido L-láctico 9 g L^{-1} :** se disuelven 0,0494 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4.

- *Medidas con los bioanalizadores semiautomáticos:*

- **Disolución patrón de etanol 20 % (v/v):** se prepara diluyendo un volumen exacto de 20 mL de etanol absoluto enrasando hasta 100 mL con disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.
- **Disolución patrón de ácido L-málico 12 g L^{-1} :** se disuelven 0,0813 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0.
- **Disolución patrón de ácido D-láctico 3 g L^{-1} :** se disuelven 0,0187 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.
- **Disolución patrón de ácido L-láctico 3 g L^{-1} :** se disuelven 0,0165 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.

- *Medidas con los bioanalizadores automatizados:*

- **Disolución patrón de etanol 2 % (v/v):** se prepara diluyendo un volumen exacto de 2 mL de etanol absoluto enrasando hasta 100 mL con disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.
- **Disolución patrón de ácido L-málico 12 g L^{-1} :** se disuelven 0,0813 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0. Las disoluciones de menor concentración se preparan

por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0.

Disoluciones de enzimas y mediadores para la preparación de los biosensores:

- **Disolución de MDH de $2,0 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$:** se disuelve el contenido del envase de enzima (1000 U) en 500 μL de tampón fosfato de pH 7,4.
- **Disolución de DLDH de $5,0 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$:** se disuelve el contenido del envase de enzima (500 U) en 100 μL de tampón fosfato de pH 7,4.
- **Disolución de DP de $0,5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$:** se disuelven 1,6 mg de la enzima, pesados exactamente, en 25 μL de disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.
- **Disolución de TTF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$:** se prepara disolviendo 5,1 mg del compuesto, pesados exactamente, en 50 μL de acetona.

Otras disoluciones utilizadas:

- **Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4:** se disuelven las cantidades adecuadas de ambas sales (2,38 y 4,29 g, respectivamente) en 1 L de agua ultrapura obteniéndose el pH indicado. Cuando se requiere otro pH próximo al de esta disolución reguladora se ajusta con HCl o con NaOH 2 mol L^{-1} .
- **Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} :** se disuelven 0,6634 g de NAD^+ , pesados exactamente, en 1 L de disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.
- **Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} :** se disuelven 0,6634 g de NAD^+ , pesados exactamente, en 1 L de disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0.

3.2.3.2. Preparación de los biosensores

Biosensores de acero inoxidable con capa delgada de oro

La metodología experimental que se ha seguido en la preparación de todos los biosensores de acero inoxidable con capa de oro que aparecen en este trabajo es la sujeta a la **patente WO 2010010211 A3** desarrollada por **InBea Biosensores S.L.** Antes de proceder a la deposición de la capa de oro sobre la superficie de acero inoxidable, se somete al electrodo a un pretratamiento para asegurar la obtención de una superficie perfectamente limpia y reproducible. Dicho pretratamiento consiste en el pulido de la superficie del electrodo con polvo de diamante ($3\mu\text{m}$) durante 1 minuto, y posterior limpieza con agua desionizada en un baño de ultrasonidos durante otro minuto. Una vez seco el electrodo, se procede a depositar mediante "sputtering" una fina capa de oro sobre la superficie de acero inoxidable. Posteriormente sobre dicha capa, sin tratamiento previo de la misma, se depositan los reactivos característicos que componen cada biosensor. Por último, se coloca sobre la superficie del electrodo una membrana de diálisis semipermeable, previamente hidratada con agua desionizada, que se sujeta al electrodo con una carcasa de goma. De este modo se hace efectiva la inmovilización de las enzimas por atrapamiento físico entre la superficie de oro y la membrana.

El procedimiento de modificación del sustrato electródico para cada biosensor desarrollado en esta Tesis Doctoral es el que se detalla a continuación:

- **Biosensor de ácido L-málico TTF-MDH-DP-AuE:** se depositan $3\ \mu\text{L}$ de una disolución de DP $0,5\ \text{U}\ \mu\text{L}^{-1}$ sobre la superficie del electrodo y seguidamente, antes de que se seque la gota, se depositan $3\ \mu\text{L}$ de una disolución de MDH $2,0\ \text{U}\ \mu\text{L}^{-1}$ y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación se depositan $3\ \mu\text{L}$ de una disolución de TTF $0,5\ \text{mol}\ \text{L}^{-1}$. Una vez evaporado el disolvente para el mediador, se coloca la membrana de diálisis.
- **Biosensor de ácido D-láctico TTF-DLDH-DP-AuE:** se depositan $3\ \mu\text{L}$ de una disolución de DP $0,5\ \text{U}\ \mu\text{L}^{-1}$ sobre la superficie del electrodo y seguidamente, antes de que se seque la gota, se depositan $2\ \mu\text{L}$ de una disolución de DLDH $5,0\ \text{U}\ \mu\text{L}^{-1}$ y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación se

depositan 3 μL de una disolución de TTF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Una vez evaporado el disolvente para el mediador, se coloca la membrana de diálisis.

Biosensor compuesto de alcohol de grafito-Teflón

La metodología empleada para la preparación del biosensor compuesto de alcohol de grafito-Teflón es la descrita por [Peña, 2003], sujeta a la patente WO 2002012550 A1.

3.2.3.3. Obtención de los amperogramas en disoluciones agitadas

Para obtener los amperogramas, se introducen los electrodos de trabajo, de referencia y auxiliar en la célula de medida que contiene la disolución reguladora de trabajo correspondiente, y se agita mecánicamente a velocidad constante durante todo el tiempo que dure el experimento. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se añade la cantidad adecuada de sustrato con una micropipeta, y se espera hasta que la corriente alcance el estado estacionario; de esta manera se realizan tantas adiciones, de pequeños volúmenes, como sea necesario. Posteriormente, se mide la variación en intensidad de corriente que produce cada adición y se relaciona con la magnitud estudiada.

3.2.3.4. Medidas en flujo con detección amperométrica

- Medidas con los bioanalizadores semiautomáticos:

Para obtener los amperogramas en continuo, se introducen en la célula de flujo el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar y se pasa la disolución portadora, en las condiciones de trabajo seleccionadas, por todo el sistema durante unos minutos hasta llenar dicha célula. El electrodo de trabajo se introduce en la célula de flujo evitando que queden burbujas de aire en el sistema, se conectan los electrodos al potencióstato, se aplica el potencial de medida y se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo

se ha estabilizado, se procede a la introducción de patrón o muestra en el sistema de flujo de modo que el portador lo arrastra hasta la célula de medida y se registra la señal amperométrica. Cuando se alcanza de nuevo la línea base se puede llevar a cabo la siguiente medida. Posteriormente, se toma la intensidad de cada medida y se relaciona con la magnitud estudiada. Para las determinaciones en continuo se han diseñado diferentes sistemas de flujo en función del parámetro monitorizado y del tipo de análisis a llevar a cabo.

- Medidas con los bioanalizadores automatizados:

Para trabajar con los prototipos automatizados, en primer lugar se introducen en la célula de flujo el electrodo de referencia y el biosensor, se conectan al potencióstato del equipo, y se activa, manualmente a través del interruptor externo destinado a tal efecto, la bomba peristáltica que hace llegar la disolución portadora hasta dicha célula. Una vez comprobado que el desecho de la célula sale de manera efectiva de la misma y que no hay burbujas de aire en su interior, así como que las disoluciones necesarias para el análisis están dispuestas en las entradas de flujo correspondientes, se da la orden de inicio de análisis desde el "software" de control del bioanalizador propio de la aplicación. El método de análisis a ejecutar por dicho "software" es el establecido previamente desde el fichero de configuración e interfaz de usuario del mismo (ver el Apartado 3.3.2.1.1.3, para el bioanalizador automatizado de etanol, y el Apartado 3.3.2.2.1.3, para el bioanalizador automático de ácido L-málico). La variación de la intensidad de corriente con el tiempo es registrada por el bioanalizador en las condiciones de trabajo establecidas para el mismo, obteniéndose en tiempo real la información analítica, con respecto al parámetro monitorizado, en función del método de análisis programado.

3.2.3.5. Determinaciones en muestras

3.2.3.5.1. Determinación de etanol en cervezas "0,0" y "Sin"

El biosensor compósito de alcohol de grafito-Teflón se empleó para la determinación de este analito en cervezas de bajo contenido alcohólico trabajando como detector amperométrico en un sistema de análisis de flujo en continuo. En el caso del biosensor de alcohol de acero inoxidable con capa fina de oro, éste se empleó para la determinación de etanol en este tipo de muestras según las metodologías de amperometría en disoluciones agitadas (método propuesto por InBea, ya validado para la determinación del grado alcohólico en cervezas, que se encuentra en el manual "Bioanalizador de grado alcohólico en cervezas") y como detector en un sistema de análisis por inyección en flujo.

Asimismo, trabajando con el bioanalizador automatizado desarrollado para el análisis de etanol en este tipo de cervezas, se utilizó el biosensor compósito de alcohol de grafito-Teflón como detector amperométrico, en el caso de la monitorización en flujo continuo, y el biosensor de alcohol de acero inoxidable con capa fina de oro, en el caso de la monitorización FIA.

Preparación de las muestras

En la determinación de etanol en cervezas de baja graduación mediante amperometría en disoluciones agitadas, en el caso de las cervezas "0,0" no se requirió tratamiento previo de la muestra y, de este modo, se adicionó una alícuota del volumen adecuado de la muestra directamente a la célula electroquímica que contiene 20 mL de tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. En el caso de las cervezas "Sin", se requirió una dilución previa 1:25 de la muestra en la disolución reguladora fosfato de trabajo.

En la determinación de etanol en cervezas de baja graduación trabajando con los sistemas de flujo, cuando se empleó el sistema de flujo para la monitorización en continuo no se requirió tratamiento previo de la cerveza. Por otro lado, cuando se trabajó con el sistema FIA, se tuvo que llevar a cabo una desgasificación previa de la muestra mediante agitación con varilla de vidrio.

En la determinación de etanol en cervezas de baja graduación trabajando con el bioanalizador automatizado, en ningún caso se requirió tratamiento previo de la muestra, llevándose a cabo la introducción directa de la cerveza en el mismo.

Obtención de las señales amperométricas

- *Amperogramas en discontinuo:*

La determinación se llevó a cabo realizando un calibrado en el intervalo de concentración comprendido entre $6,0 \times 10^{-5}$ y $1,2 \times 10^{-4}$ % (v/v), por adición de alícuotas de 50 μL de una disolución patrón de etanol $2,4 \times 10^{-2}$ % (v/v), a la célula de medida que contenía 20 mL de disolución reguladora fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Sobre una nueva disolución de trabajo se realizó la adición de la muestra, transfiriendo a la célula de medida una alícuota de 250 μL para el análisis de cerveza "0,0" y de 50 μL para el análisis de cerveza "Sin", previamente tratada como se ha indicado en el apartado anterior. Las medidas amperométricas se realizaron con agitación mecánica constante, aplicando un potencial de 0,0 V, y registrando la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. La concentración de etanol se obtuvo por interpolación de la intensidad de corriente en el estado estacionario medida para cada muestra en la recta de calibrado y, en el caso de la cerveza "Sin", este valor se corrigió aplicando el factor de dilución correspondiente.

- *Bioanalizadores semiautomáticos:*

La metodología de calibración que se empleó es el calibrado unipuntual, consistiendo en la obtención de la recta de calibrado a partir de un punto experimental y el punto (0,0). Para la determinación de etanol en cervezas "0,0" el patrón empleado fue de concentración 0,04 % (v/v) y en cervezas "Sin" la concentración de referencia empleada fue 0,8 % (v/v).

Trabajando con el sistema de flujo en continuo, se llevó a cabo la introducción de la disolución patrón de concentración adecuada tras esperar la estabilización de la línea base y se registró la intensidad de corriente, alcanzando el estado estacionario, al aplicar un potencial constante de 0,0 V. Para la introducción de las muestras, se hizo pasar previamente por el sistema la disolución portadora tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 para la recuperación de la línea base y

separación efectiva de las señales amperométricas. La medida de la intensidad de corriente registrada se interpoló en la recta del calibrado unipuntual y se obtuvo la concentración de etanol en la cerveza analizada.

Cuando se trabajó con el sistema FIA, una vez estabilizada la línea base, se inyectó la disolución patrón de etanol de concentración adecuada y se obtuvo el diagrama correspondiente al aplicar un potencial constante de 0,0 V. Una vez recuperada la línea base, se realizaron inyecciones de la muestra preparada según se ha indicado en el apartado de preparación de muestras. Para la obtención de la concentración de etanol en la muestra, la medida de la intensidad de pico FIA registrada se interpoló en la recta de calibrado unipuntual.

- Bioanalizador automatizado:

La metodología de calibración programada para el bioanalizador, independientemente del tipo de monitorización amperométrica, fue el calibrado unipuntual. Para la determinación de etanol en cervezas de bajo contenido alcohólico las concentraciones de los patrones empleadas fueron de 0,04 % (v/v), en el análisis de cervezas "0,0", y 0,8 % (v/v), en el análisis de cervezas "Sin".

Trabajando con el bioanalizador automatizado en las condiciones experimentales establecidas, tras la estabilización de la línea base, el sistema llevó a cabo la introducción de la disolución a medir (patrón de concentración adecuada o cerveza, siguiendo el método de análisis predefinido) y registró la intensidad de corriente de la señal analítica. Para la obtención de la concentración de etanol en la muestra, el sistema interpoló la medida de la intensidad de corriente registrada para la cerveza en la recta de calibrado unipuntual.

3.2.3.5.2. Determinación de ácido L-málico en vinos

El biosensor de ácido L-málico desarrollado se empleó para la determinación de este compuesto en materiales de referencia certificados trabajando en amperometría en discontinuo y como detector amperométrico en un sistema de análisis por inyección en flujo.

Asimismo, el bioanalizador de ácido L-málico automático desarrollado se utilizó para el análisis de materiales de referencia certificados, empleando el biosensor de ácido L-málico como detector amperométrico del mismo.

Preparación de las muestras

La determinación de ácido L-málico en los materiales de referencia requirió el tratamiento de los mismos, tanto si se trabajaba en amperometría en disoluciones agitadas como con los sistemas de flujo. En el primer caso, en el análisis de los materiales de referencia 1 y 2 se llevó a cabo una dilución previa 1:5 y en el material de referencia 4 una dilución 1:10, en tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0.

En los análisis trabajando con el sistema FIA semiautomático y el bioanalizador automático se requirió llevar a cabo una dilución 1:25, para los materiales de referencia 1,2 y 3, y una dilución 1:100, para el material de referencia 4. Para realizar las diluciones, en todos los casos, se utilizó la disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0.

Obtención de las señales amperométricas

- *Amperogramas en discontinuo:*

La determinación se llevó a cabo realizando un calibrado en el intervalo de concentración comprendido entre $2,0 \times 10^{-3}$ y $4,0 \times 10^{-3}$ g L⁻¹ por adición de alícuotas de 50 µL de una disolución patrón de ácido L-málico 0,8 g L⁻¹ a la célula de medida que contenía 20 mL de disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0 y NAD⁺ 1 mmol L⁻¹. Sobre una nueva disolución de trabajo se realizó la adición de la muestra, transfiriendo a la célula de medida una alícuota de 200 µL en el caso de los materiales de referencia 1 y 2 y de 100 µL para el análisis del material de referencia 4, previamente tratada como se ha indicado en el apartado anterior. Las medidas amperométricas se realizaron con agitación mecánica constante, aplicando un potencial de +0,15 V, y registrando la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. La medida de la intensidad de la señal amperométrica registrada se interpoló en la recta de calibrado y, tras corregir por el factor de

dilución correspondiente, se obtuvo la concentración de ácido L-málico en la muestra.

- *Bioanalizador semiautomático:*

Se prepararon disoluciones de ácido L-málico de concentraciones adecuadas, que cubrieran el intervalo de concentración comprendido entre 0,03 y 0,12 g L⁻¹, a partir de la disolución patrón de ácido L-málico. Se realizaron inyecciones de cada una de ellas y se obtuvo el fiagrama correspondiente, aplicando un potencial constante de +0,15 V. La representación de la corriente de pico en función de la concentración permitió construir el calibrado correspondiente, considerando el 0 de concentración para la obtención de la expresión polinómica de ajuste. A continuación se hicieron inyecciones de la disolución de muestra, preparada según se ha indicado en el apartado de preparación de muestras. Para la obtención de la concentración de ácido L-málico en la muestra, la intensidad de pico FIA medida se interpoló en el calibrado, corrigiendo dicho valor con el correspondiente factor de dilución.

- *Bioanalizador automático:*

Se prepararon disoluciones de ácido L-málico de concentraciones adecuadas, que cubrieran el intervalo de concentración comprendido entre 0,03 y 0,12 g L⁻¹, a partir de la disolución patrón de ácido L-málico. El bioanalizador, trabajando en las condiciones experimentales establecidas, llevó a cabo la medida de cada una de ellas, realizando tantas réplicas como estuviera programado en el método de análisis. El sistema registró el fiagrama correspondiente y, a partir de las medidas de los patrones, obtuvo la expresión de ajuste para la relación señal-concentración. A continuación, el bioanalizador realizó la medida de las muestras, preparadas como se ha indicado en el apartado de preparación de muestras. Para la obtención de la concentración de ácido L-málico en la muestra, el sistema interpoló en el calibrado la intensidad de pico FIA registrada, corrigiendo dicho valor con el correspondiente factor de dilución.

3.2.3.5.3. Determinación de ácido láctico en cervezas

El biosensor de ácido D-láctico desarrollado en esta Tesis Doctoral y el biosensor de ácido L-láctico desarrollado por InBea Biosensores se utilizaron para la determinación de los isómeros de este ácido en muestras de cerveza, trabajando en amperometría en discontinuo. En el caso del biosensor de ácido L-láctico, la metodología propuesta es la validada por InBea, que se encuentra en el manual "Bioanalizador de ácido láctico en muestras de cerveza". Asimismo, ambos biosensores se emplearon como detectores amperométricos en un sistema de inyección en flujo semiautomático para la detección simultánea de estos compuestos en cerveza.

Preparación de las muestras

En la determinación de ácido láctico en cervezas mediante amperometría en disoluciones agitadas no se requirió el tratamiento de las mismas y, por lo tanto, se procedió adicionando una alícuota del volumen adecuado de las muestras directamente a la célula electroquímica que contenía 20 mL del tampón fosfato de trabajo utilizado para cada biosensor.

En los análisis trabajando con el sistema FIA, se requirió una dilución 1:10 de la cerveza en la disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4.

Obtención de las señales amperométricas

- *Amperogramas en discontinuo:*

- o Estudio del efecto matriz

Para estudiar la existencia de efecto matriz en el análisis de cervezas trabajando con el biosensor de ácido D-láctico desarrollado, se llevó a cabo la comparación de pendientes obtenidas mediante el método de calibración externo y el método de adiciones estándar. Dicho estudio se efectuó sobre tres tipos de cerveza: con alcohol, "Sin" y "0,0".

- Método de adiciones estándar:

En primer lugar se llevó a cabo la adición de una alícuota de la muestra, preparada según se ha explicado en el apartado anterior, a la célula de medida que contiene 20 mL de disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 y NAD⁺ 1 mmol L⁻¹. Estas alícuotas fueron 200 µL para la cerveza con alcohol, 1 mL para la cerveza "Sin" y 400 µL para la cerveza "0,0". Las medidas amperométricas se registraron con agitación mecánica constante, aplicando un potencial de +0,15 V, hasta alcanzar el estado estacionario. A continuación, se efectuaron adiciones sucesivas de alícuotas de una disolución patrón de ácido D-láctico 0,4 g L⁻¹ hasta que se midieron las señales correspondientes para la obtención de la recta de calibrado. En el ensayo con la cerveza con alcohol estas adiciones fueron de 20 µL. En el caso de los ensayos con las cervezas "Sin" y "0,0", éstas fueron de 40 µL.

- Método de calibración externo:

Se construyó un calibrado por adición de alícuotas sucesivas, a la célula de medida con 20 mL de la disolución reguladora de trabajo, de volúmenes constantes de una disolución de ácido D-láctico 0,4 g L⁻¹ en el intervalo de concentraciones comprendido entre 4x10⁻⁴ y 1,6x10⁻³ g L⁻¹, en el ensayo con la cerveza con alcohol, y entre 8x10⁻⁴ y 3,2x10⁻³ g L⁻¹, en el ensayo con las cervezas "Sin" y "0,0".

o Análisis de muestras

En el caso del biosensor de ácido D-láctico, la determinación se llevó a cabo realizando un calibrado en el intervalo de concentración comprendido entre 4,5x10⁻⁴ y 9,0x10⁻⁴ g L⁻¹ por adición de alícuotas de 20 µL de una disolución patrón de concentración 0,45 g L⁻¹ a la célula de medida que contenía 20 mL de disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 y NAD⁺ 1 mmol L⁻¹. Sobre una nueva disolución de trabajo se realizó la adición de la muestra, transfiriendo a la célula de medida una alícuota de 250 µL para aquellas cervezas que mostraron un nivel de ácido D-láctico ≤ 60 mg L⁻¹, y de 100 µL para aquellas cervezas que contenían una concentración de este analito por encima de dicho valor. Las medidas amperométricas se realizaron con agitación mecánica constante, aplicando un potencial de +0,15 V, y registrando la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. La concentración de ácido D-láctico en la cerveza analizada se

obtuvo al interpolar la medida de la intensidad de la señal amperométrica en la recta de calibrado.

En el caso del biosensor de ácido L-láctico, la determinación se llevó a cabo realizando un calibrado en el intervalo de concentración comprendido entre $1,8 \times 10^{-3}$ y $3,6 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ por adición de alícuotas de 40 μL de una disolución patrón de concentración $0,9 \text{ g L}^{-1}$ a la célula de medida que contenía 20 mL de disolución reguladora fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Sobre una nueva disolución de trabajo se realizó la adición de la muestra, transfiriendo a la célula de medida una alícuota de 500 μL . Las medidas amperométricas se realizaron con agitación mecánica constante, aplicando un potencial de 0,0 V, y registrando la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. La concentración de ácido L-láctico en la cerveza analizada se obtuvo al interpolar la medida de la intensidad de la señal amperométrica en la recta de calibrado.

- *Bioanalizador semiautomático:*

Se prepararon disoluciones que contenían ácido D-láctico y ácido L-láctico de concentraciones adecuadas, cubriendo para ambos el intervalo de concentración comprendido entre 3×10^{-3} y $1,2 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$, a partir de las disoluciones patrón de cada compuesto. Se realizaron inyecciones de cada una de ellas y se obtuvieron los diagramas correspondientes, aplicando un potencial constante de +0,15 V para el biosensor de D-láctico y de 0,0 para el biosensor de L-láctico. La representación de la corriente de pico en función de la concentración, para cada especie, permitió construir el calibrado correspondiente. A continuación se hicieron inyecciones de la disolución de muestra preparada según se ha indicado en el apartado de preparación de muestras. Para la obtención de la concentración de cada analito en la cerveza analizada, la medida de la intensidad de pico FIA registrada se interpoló en el correspondiente calibrado, considerando el factor de dilución para el cálculo de la concentración real.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Bioanalizadores semiautomáticos

3.3.1.1. Bioanalizadores de etanol para la monitorización del grado alcohólico en cervezas "0,0" y "Sin"

Con el objetivo de obtener más adelante un único sistema de detección, con una precisión y una exactitud adecuadas, y que ofreciera versatilidad en cuanto al modo de trabajo en la monitorización de alcohol en cervezas con baja graduación alcohólica, se diseñaron y ensayaron diferentes modelos de sistemas en flujo así como varios dispositivos y componentes de los mismos. Posteriormente, se determinaron sus características analíticas y se evaluaron sus características operacionales y su aplicabilidad para el análisis de alcohol en muestras reales de cerveza.

3.3.1.1.1. Diseño, desarrollo y optimización de un sistema de flujo en continuo manual

3.3.1.1.1.1. Optimización de las variables experimentales

Todos los componentes a integrar en el diseño final del bioanalizador se evaluaron en sistemas de flujo en continuo de forma manual.

3.3.1.1.1.1. Selección del biosensor de etanol

Se eligió como detector para la monitorización de etanol en cerveza un biosensor amperométrico ya desarrollado en el Grupo de Investigación, cuya metodología de preparación está sujeta a la **patente WO 2002012550 A1**, por su demostrada capacidad para la determinación del grado alcohólico en discontinuo en diferentes muestras que contienen alcohol, incluyendo la cerveza. Este biosensor es el electrodo compuesto bienzimático de grafito-Teflón-alcohol oxidasa (AOD)-peroxidasa (HRP)-ferroceno (Fc), en el que las enzimas y el mediador están incluidas físicamente dentro de la matriz electródica (**Figura 10**).

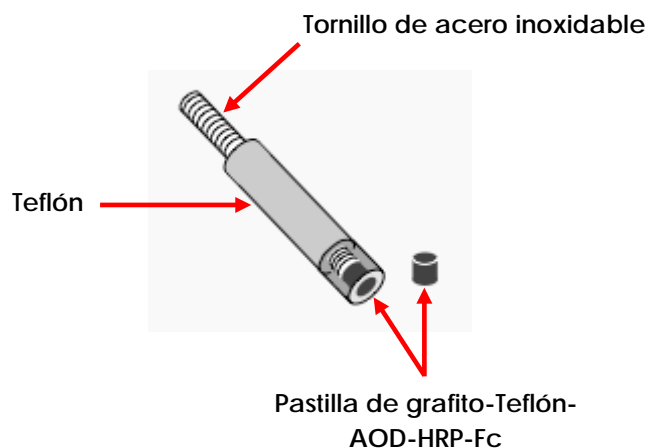


Figura 10. Esquema del electrodo compuesto de grafito-Teflón de alcohol.

Este biosensor bienzimático emplea el sistema AOD/HRP/Fc para determinar la concentración de alcohol a través de la secuencia de reacciones que se muestra en la **Figura 11**. El alcohol es oxidado a aldehído en una reacción catalizada por la AOD, y el peróxido de hidrógeno generado es reducido por el ferroceno en una reacción acoplada catalizada por la HRP. La reacción electródica que se utiliza para monitorizar la secuencia de reacciones implicadas en el biosensor de alcohol es la debida a la reducción amperométrica del ion ferricinio.

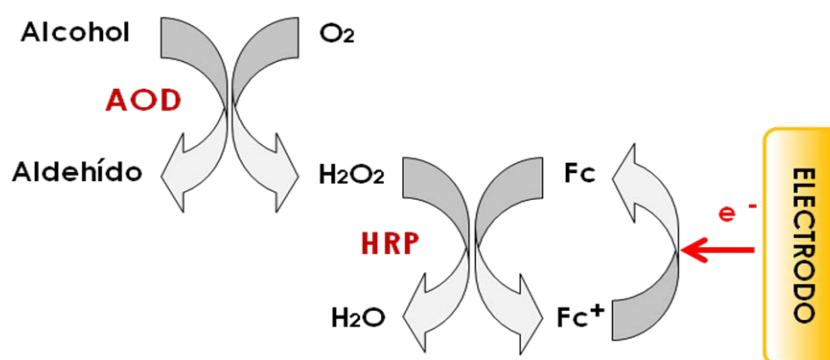


Figura 11. Secuencia de reacciones enzimática y electrónicas implicadas en la detección de alcohol empleando el biosensor compuesto enzimático amperométrico de grafito-Teflón-AOD-HRP-Fc.

Las variables que se consideraron para elegir el biosensor fueron el límite de detección, el intervalo dinámico de concentraciones, el tiempo de almacenamiento y, con carácter fundamental, el tiempo de vida del biosensor durante el análisis. En la **Tabla 7** se muestran las características del biosensor de alcohol seleccionado trabajando en discontinuo [Guzmán-Vázquez de Prada, 2003].

Tabla 7. Características analíticas y propiedades del biosensor compósito bienzimático de grafito-Teflón-AOD-HRP-Fc trabajando en disoluciones agitadas de tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 y empleando etanol como sustrato. E_{ap} = 0,0 V vs. Ag/AgCl.

Potencial de trabajo (vs. Ag/AgCl)	0,0 V
Medio de trabajo	tampón fosfato 0,05 mol L ⁻¹ de pH 7,4
Intervalo lineal	(1,00 – 117)x10 ⁻⁴ % (v/v)
Sensibilidad	(9,52 ± 0,05)x10 ⁴ nA % ⁻¹
Límite de detección	3,0x10 ⁻⁵ % (v/v)
Límite de cuantificación	1,0x10 ⁻⁴ % (v/v)
RSD	5,7 %
Tiempo de vida	15 días
Condiciones de almacenamiento	En seco a 0°C
Tiempo de almacenamiento	3 meses

Dentro de las variables consideradas, el límite de detección no resultó un parámetro determinante en la elección de un biosensor para la monitorización de alcohol en continuo debido a que el límite superior del intervalo dinámico de concentraciones se encuentra por debajo de las concentraciones típicas de las cervezas "0,0", cuya concentración está entre 0,002 y 0,04 % (v/v), y, por lo tanto, es necesaria la dilución de la muestra antes de llegar al detector.

Con respecto al tiempo de almacenamiento, en seco y a una temperatura de 0°C, este biosensor compósito puede ser almacenado durante 3 meses sin pérdida aparente de actividad enzimática. Esto resulta ventajoso en términos de durabilidad y estabilidad con respecto a las condiciones de transporte del mismo.

Por último, en relación al tiempo de vida del biosensor en la monitorización de etanol en continuo, presentó tiempos de trabajo entre 3-4 días midiendo de manera continua en las mismas condiciones de trabajo que las optimizadas por Guzmán-Vázquez de Prada & Col. [Guzmán-Vázquez de Prada, 2003] que corresponden a un potencial aplicado de 0,0 V y un pH de 7,4 para la disolución reguladora de trabajo. El estudio del tiempo de trabajo en continuo del biosensor se expone en el Apartado 3.3.1.1.2.1, una vez desarrollados los diferentes componentes del sistema de flujo y optimizadas las diferentes variables experimentales.

3.3.1.1.2. Selección de la célula electroquímica de flujo

La célula de flujo empleada fue una "wall-jet" de gran volumen diseñada por el Grupo de Investigación, en la que el biosensor y los electrodos auxiliar y de referencia se encuentran en contacto con la misma disolución portadora. Se seleccionó este diseño debido a que, cuando se trabaja con detección electroquímica, la sensibilidad es mayor. Además, el gran volumen de la célula permite la dilución rápida del analito, con la consiguiente recuperación de la línea base en un tiempo corto incluso trabajando con velocidades de flujo no muy altas. En esta célula, la disolución portadora se introduce en la célula de medida a través de un tubo de Teflón, e incide perpendicularmente con la superficie del biosensor (Figura 12).

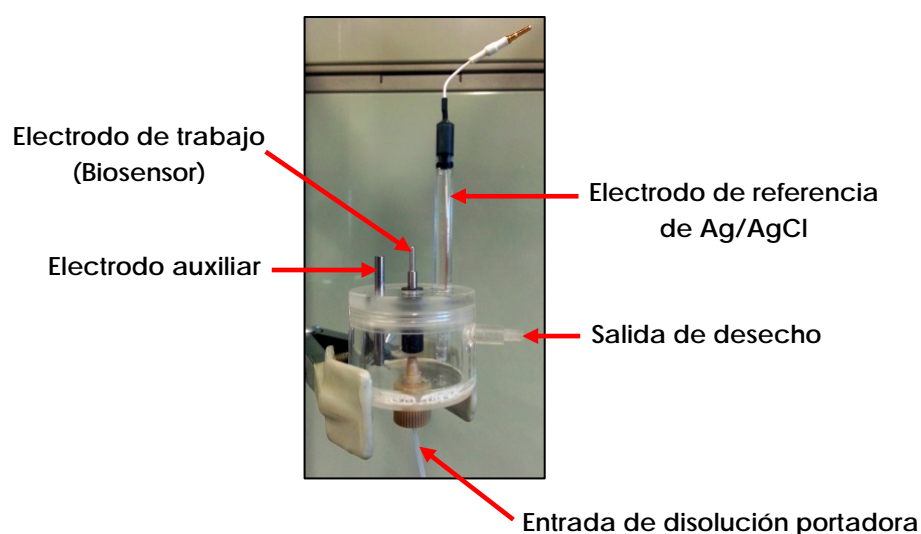


Figura 12. Célula "wall-jet" de gran volumen.

3.3.1.1.1.3. Diseño, desarrollo y optimización de la unidad muestreadora

Debido a la gran diferencia que hay entre las características analíticas que presenta el biosensor de alcohol seleccionado (intervalo lineal y límite de cuantificación) y el grado alcohólico de las cervezas "0,0" y "Sin", se hizo necesario llevar a cabo la dilución de la cerveza antes de llegar a la célula de flujo. Para posibilitar el análisis de etanol en cerveza sin tratamiento previo de la misma, esta dilución debía ser realizada *in situ* por algún componente del sistema de flujo en continuo. Debido a la naturaleza volátil que presenta el etanol, se optó por la difusión gaseosa como estrategia para la dilución de la muestra antes de que ésta llegara al detector. Esta metodología de muestreo ha sido empleada con éxito para la previa dilución en flujo de la muestra en el análisis de etanol en bebidas alcohólicas [Pais, 2013] [Paixao, 2002] [Segundo, 2004] [Rangel, 2000]. Así, en función de las condiciones de trabajo, se posibilita obtener una baja eficiencia de extracción del etanol. Además, esta metodología también potencia la selectividad del análisis al aislar al analito de posibles interferentes [Cerdá, 2008] y posibilita prevenir el ensuciamiento de la superficie del electrodo con la matriz de la muestra.

Para el desarrollo y optimización de un dispositivo de estas características se ensayaron diseños que se basaron en el empleo de membranas permeables al etanol e impermeables al agua, es decir, una unidad muestreadora en la que la dilución de la muestra se diera, como ya se ha comentado, a través de un proceso de difusión gaseosa. Para la elección de la membrana más adecuada se diseñó un primer sistema de flujo en continuo semiautomático que constaba de una bomba peristáltica, una unidad muestreadora y la célula electroquímica de flujo, cuyos electrodos estaban conectados a un detector amperométrico (Figura 13a).

La unidad muestreadora consistió en un dispositivo compuesto por dos paredes o bloques de metacrilato entre los cuales se interpone una membrana permeable al etanol. Uno de los lados de dicha membrana se exponía a la muestra de cerveza, mientras que por el otro lado se hacía pasar la disolución portadora (Figura 13b).

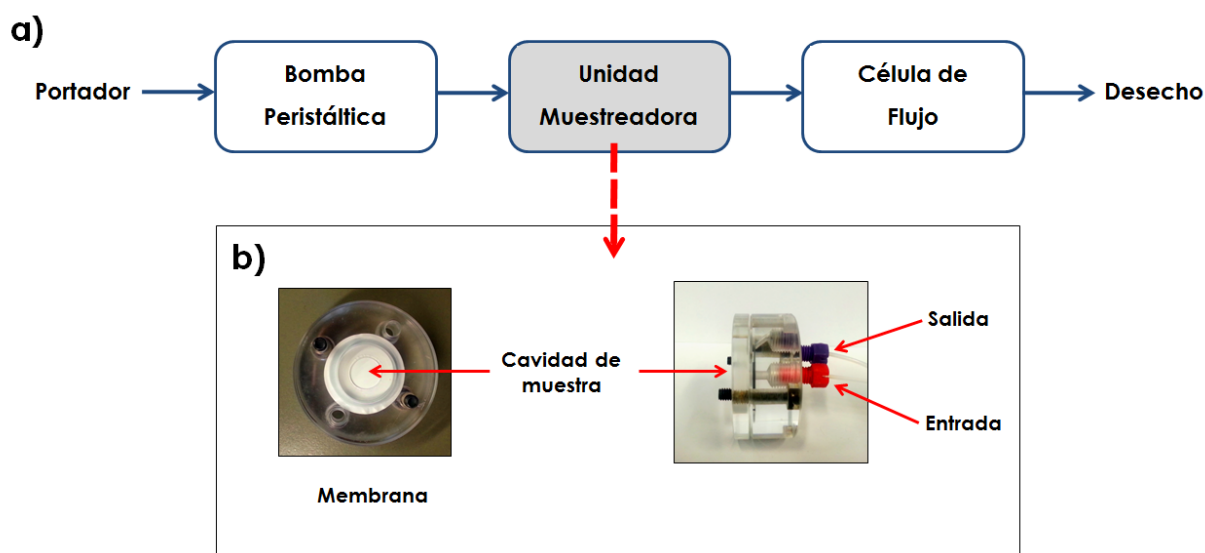


Figura 13. (a) Esquema del sistema de flujo en continuo I. (b) Vista frontal y lateral de la unidad simple de muestreo.

En el proceso de difusión gaseosa el etanol que contiene la cerveza pasaba a través de la membrana y era arrastrado por el portador hasta la célula de flujo. De entre todas las membranas ensayadas, la que proporcionó una mejor respuesta analítica fue una membrana de Teflón (PTFE). Este tipo de membrana ha sido ampliamente utilizada para trabajar con difusión gaseosa para el análisis de vino y cerveza [Choengchan, 2006] [Mohns, 1995] [Pinyou, 2011], y también había demostrado un buen comportamiento con este analito en otra aplicación desarrollada por el Grupo de Investigación (análisis de alcohol en sudor, [Gamella, 2014]).

El correcto funcionamiento del dispositivo muestreador se comprobó estudiando las señales amperométricas obtenidas por deposición de disoluciones patrón de etanol sobre la membrana, trabajando con la unidad muestreadora orientada adecuadamente para posibilitar la permanencia de la muestra en la cavidad de dicho dispositivo. A modo de ejemplo se muestran en la **Figura 14** las curvas obtenidas para la adición de diferentes disoluciones patrón de etanol a la unidad muestreadora. Como se puede observar en las figuras, se obtuvieron señales crecientes con el aumento de la concentración de etanol y una buena recuperación de la línea base original tras retirar la disolución patrón de etanol.

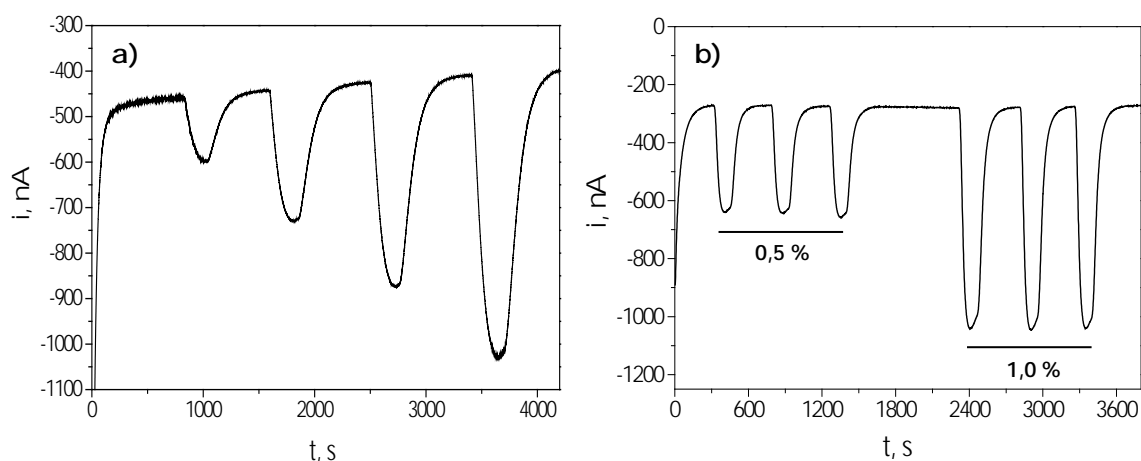


Figura 14. Registros amperométricos obtenidos por adiciones de 1 mL de disoluciones patrón de etanol de concentraciones **(a)** 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 % (v/v) y **(b)** 0,5 y 1,0 % (v/v) a la unidad muestreadora. Unidad simple de muestreo de 10 mm de diámetro de superficie de contacto con 3 membranas PTFE de 0,45 μm . Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Dados los resultados satisfactorios obtenidos con el empleo de membranas de Teflón, se procedió a estudiar el diseño de la unidad muestreadora. Las variables de diseño a considerar fueron: el tamaño de poro de la membrana PTFE, el número de membranas equipadas en el dispositivo y la superficie de contacto entre la disolución dadora y la aceptora. En los estudios realizados se pudo comprobar que dichas variables determinan el factor de dilución proporcionado por el dispositivo muestreador y, por lo tanto, las características analíticas del sistema se ven condicionadas por el diseño final de este componente.

En primer lugar se estudió el número de membranas de Teflón a incluir dentro de la unidad muestreadora con el fin de disminuir el contenido de etanol que atraviesa la membrana y, por tanto, la concentración de etanol en la disolución portadora que alcanza el detector. Para ello, se realizaron calibrados con patrones de etanol de concentraciones comprendidas entre 0,5 y 8,0 % (v/v) en cuatro experimentos diferentes, equipando la unidad muestreadora simple de 10 mm de diámetro de superficie de contacto con 1, 2, 3 y 4 membranas PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro, respectivamente. En la **Figura 15** se han representado las curvas de calibrado y en la **Tabla 8** se muestran las concentraciones máximas de etanol admitidas para el intervalo de linealidad obtenido en las diferentes condiciones.

Como era de esperar, se encontró que a mayor número de membranas, menor es la cantidad de etanol que llega al detector. Cabe destacar el hecho de que a partir de 3 membranas no se observó una diferencia significativa en cuanto a sensibilidad e intervalo dinámico, es decir, a partir de cierto número de membranas ya no se ve condicionado el rendimiento con que se da el proceso de difusión gaseosa.

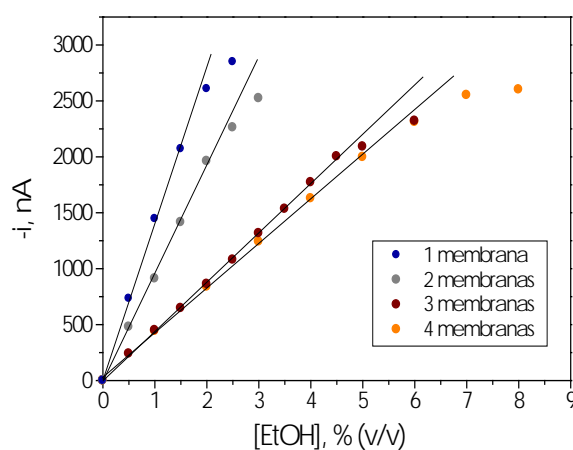


Figura 15. Intensidades de corriente registradas al adicionar 1 mL de disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes a la unidad muestreadora. Unidad simple de muestreo de 10 mm de diámetro de superficie de contacto con 1(●), 2(●), 3(●) y 4(●) membranas PTFE con un diámetro de poro de 0,45 μm . Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Tabla 8. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y concentraciones máximas de etanol admitidas para los intervalos de linealidad, correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 15.

Nº membranas	Pendiente, nA % ⁻¹	O.o, nA	r	Límite superior de linealidad, %
1	$(1,38 \pm 0,04) \times 10^3$	24 ± 34	0,9993	1,5
2	$(9,7 \pm 0,2) \times 10^2$	-18 ± 29	0,9991	2,0
3	$(4,41 \pm 0,04) \times 10^2$	-2 ± 9	0,9997	4,5
4	$(3,98 \pm 0,06) \times 10^2$	28 ± 17	0,9996	5,0

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

A la vista de los resultados obtenidos, para estudios posteriores se eligió equipar la unidad muestreadora con 1 membrana de Teflón ya que, siendo posible llevar a cabo el análisis de cerveza "Sin" empleando las cuatro condiciones ensayadas, de este modo se evitan posibles formaciones de burbujas entre membranas que darían lugar a una disminución de la reproducibilidad de las medidas analíticas.

En segundo lugar se estudió el tamaño de poro y para ello se realizó un calibrado con patrones de etanol de concentraciones comprendidas entre 0,5 y 3,5 % (v/v), equipando la unidad muestreadora simple de 10 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,20 μm de diámetro de poro. En la **Figura 16** se ha representado la curva de calibrado y en la **Tabla 9** se muestra la concentración máxima de etanol admitida para el intervalo de linealidad obtenido, en las que se incluyen la curva y los resultados que se obtuvieron con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. En este caso se encontró que el tamaño de poro sólo influye en el paso de mayor o menor cantidad de etanol a través de la misma, lo que proporciona pendientes de calibrados menores cuando se emplean membranas de un tamaño de poro menor, pero a su vez se consiguen unos márgenes de linealidad más amplios.

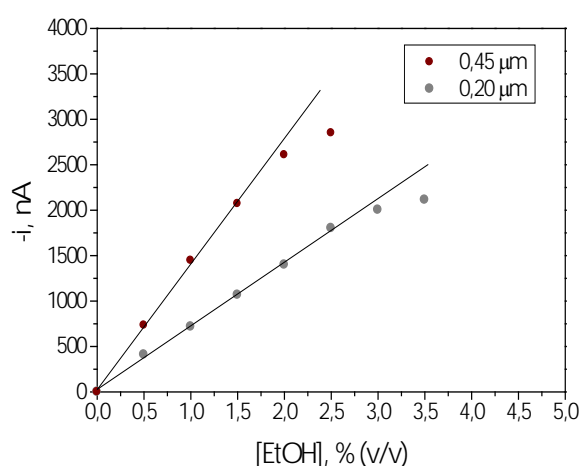


Figura 16. Intensidades de corriente registradas al adicionar 1 mL de disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes a la unidad muestreadora. Unidad simple de muestreo de 10 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE con un diámetro de poro de (●) 0,45 μm y (●) 0,20 μm . Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Tabla 9. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y concentraciones máximas de etanol admitidas para los intervalos de linealidad, correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 16.

Diámetro de poro, μm	Pendiente, $\text{nA } \%^{-1}$	O.o, nA	r	Límite superior de linealidad, %
0,45	$(1,38 \pm 0,04) \times 10^3$	24 ± 34	0,9993	1,5
0,20	$(7,0 \pm 0,1) \times 10^2$	19 ± 20	0,9993	2,5

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

El tamaño de poro de la membrana de Teflón elegido para llevar a cabo la monitorización de alcohol en cervezas de baja graduación ha sido de 0,45 μm teniendo en cuenta la mayor sensibilidad de la señal analítica obtenida. Aunque el intervalo lineal que se consigue es menor que con membranas de 0,20 μm , es suficientemente amplio como para adaptarse a las diferentes concentraciones en las que se encuentra el etanol en las cervezas a analizar. Además, también se obtienen límites de detección más bajos, lo que facilitará la determinación de contenidos de etanol menores en la monitorización de cerveza "0,0".

Por último, con respecto a la superficie de contacto entre la disolución muestra y la disolución portadora, se realizó un calibrado con patrones de etanol de concentraciones comprendidas entre 5,0 y 20,0 % (v/v) empleando una unidad muestreadora simple de 2 mm de diámetro de superficie de contacto equipada con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. En la **Figura 17** se ha representado la curva de calibrado y en la **Tabla 10** se muestra la concentración máxima de etanol admitida para el intervalo de linealidad obtenido en este ensayo. Se incluyen también la curva y los resultados que se obtuvieron con la unidad de 10 mm de diámetro. A la vista de los datos obtenidos, se puede concluir que al ir disminuyendo las dimensiones de dicha superficie se obtienen intervalos dinámicos de concentraciones más adecuados para la monitorización de alcohol en bebidas con una alta graduación. Estos resultados pusieron de manifiesto el hecho de que las dimensiones de la superficie de contacto entre la disolución dadora y la aceptora influyen en mayor grado en el factor de dilución proporcionado por el dispositivo muestreador en comparación con las otras dos variables de diseño. Esta

mayor dependencia de la sensibilidad por la superficie de contacto se tomó en cuenta para posteriores modificaciones del diseño de la unidad muestreadora.

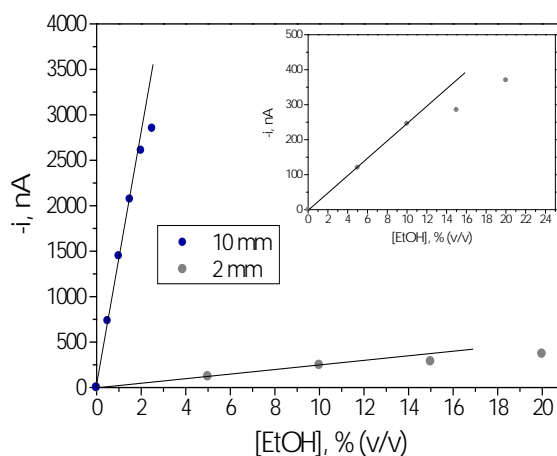


Figura 17. Intensidades de corriente registradas al adicionar 1 mL de disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes a la unidad muestreadora. Unidad simple de muestreo de (●)10 mm y (●)2 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. E_{ap} = 0,0 V vs. Ag/AgCl.

Tabla 10. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y concentraciones máximas de etanol admitidas para los intervalos de linealidad, correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 17.

Díámetro de contacto, mm	Pendiente, nA % ⁻¹	O.o, nA	r	Límite superior de linealidad, %
10	(1,38 ± 0,04) × 10 ³	24 ± 34	0,9993	1,5
2	(2,46 ± 0,03) × 10	-1 ± 2	0,9999	10,0

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Para proseguir con los siguientes estudios, considerando las tres variables de diseño del dispositivo muestreador, se optó por emplear 10 mm de diámetro de superficie de contacto y una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro por ser la configuración que proporcionó una adecuada sensibilidad por parte del biosensor para el análisis de cervezas con bajo contenido alcohólico. Con la idea de poder integrar este componente en un sistema de flujo en continuo, se procedió a

trabajar empleando la unidad muestreadora simple a modo de sonda de muestreo sumergiéndola en la disolución patrón de etanol y así evaluar su aplicabilidad. En la **Figura 18** se observa que se obtuvieron señales amperométricas medidas en el estado estacionario con una buena reproducibilidad y eficaz recuperación de la línea base empleando esta metodología de trabajo.

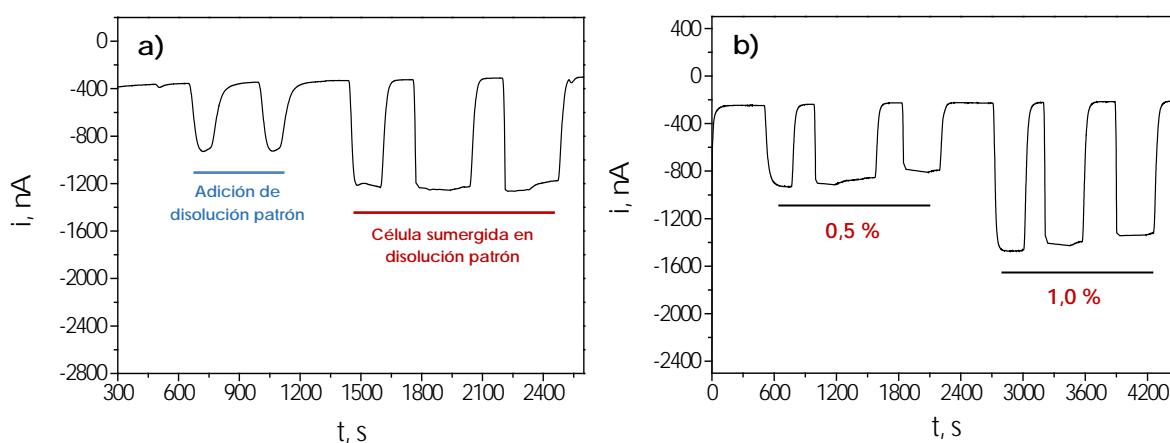


Figura 18. (a) Registro amperométrico obtenido por adiciones de 1 mL de una disolución patrón de etanol de 0,5 % (v/v) a la unidad muestreadora y posterior inmersión de la célula en la misma disolución patrón de etanol. (b) Registro amperométrico obtenido por inmersión de la unidad muestreadora en disoluciones patrón de etanol de concentraciones 0,5 y 1,0 % (v/v). Unidad simple de muestreo de 10 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm . Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Dada la buena respuesta obtenida, se decidió emplear esta configuración de la unidad muestreadora para el análisis de muestras reales. Con objeto de introducir en el sistema de flujo, además de las muestras, disoluciones patrón para la construcción de los calibrados, se hizo necesario implementar una segunda unidad muestreadora. Para controlar que al sensor llegara patrón o muestra se requirió a su vez el empleo de válvulas que permitieran dirigir el sistema de flujo de manera manual según las necesidades del proceso de medida. El sistema de flujo en continuo con dos dispositivos muestreadores diseñado se muestra en la **Figura 19**.

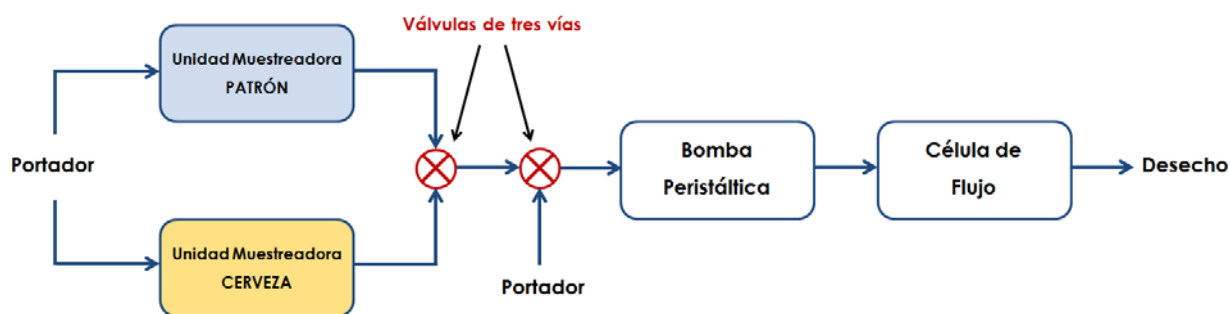


Figura 19. Esquema del sistema de flujo en continuo II.

Con este sistema de flujo se analizaron diferentes patrones y muestras de cerveza y se evaluó el empleo de dos unidades muestreadoras independientes para patrón y para cerveza. En la **Tabla 11** se muestran los resultados obtenidos en el análisis de disoluciones patrón de etanol, trabajando en el laboratorio en las condiciones de potencial, medio portador y caudal establecidas.

Tabla 11. Resultados obtenidos en el análisis de patrones de etanol de varias concentraciones empleando el sistema de flujo en continuo II.

Muestra	[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} %	t _{exp}	t _{tab}
Patrón EtOH 0,040 %	0,038	0,036 ± 0,005 (RSD _{n=3} = 5,7 %)	3,051	4,303
	0,034			
	0,037			
Patrón EtOH 0,050 %	0,047	0,048 ± 0,004 (RSD _{n=4} = 4,0 %)	2,089	3,182
	0,049			
	0,045			
	0,049			
Patrón EtOH 0,060 %	0,062	0,063 ± 0,003 (RSD _{n=3} = 1,8 %)	3,900	4,303
	0,064			
	0,062			

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Para evaluar la exactitud del método se han comparado las medias experimentales obtenidas con los valores de concentración de cada disolución patrón de etanol analizada a través del cálculo del estadístico t para contrastes de significación [Miller, 2002], cuyos valores de $t_{\text{experimental}}$ determinados se incluyen en la Tabla 11. Como se puede observar, en todos los casos se ha obtenido un valor de t_{exp} inferior a la correspondiente t de Student tabulada, indicativo de que no existen diferencias significativas entre los valores determinados con el bioanalizador manual y los valores nominales de las disoluciones patrón, por lo tanto, el método no está sujeto a errores sistemáticos.

Tras los resultados satisfactorios obtenidos tanto en el análisis de patrones como en el estudio de recuperación, se decidió comprobar si el sistema cumplía los requerimientos de exactitud y reproducibilidad en el análisis de etanol en unas muestras de cerveza ciegas, previamente desgasificadas, proporcionadas por una empresa cervecera. En la **Tabla 12** se recogen los resultados obtenidos en el laboratorio de I+D de la empresa cervecera empleando el sistema de flujo desarrollado, donde se incluyen los valores de concentración de etanol determinados por cromatografía de gases.

Tabla 12. Resultados obtenidos en el análisis de muestras de cerveza "0,0" dopadas con etanol.

Muestra	Tª de muestra	(1) [EtOH], %	(2) [EtOH], %	E _r , %
Cerveza "0,0" dopada a un nivel entre 0,04–0,05 %	4°C	0,015	0,044	-65,9
	ambiente	0,043		-2,3
Cerveza "0,0" dopada a un nivel entre 0,08–0,10 %	4°C	0,040	0,085	-52,9
	ambiente	0,092		+8,2

(1): resultado obtenido en el laboratorio de I+D de la empresa cervecera con el bioanalizador (sistema de flujo continuo II).

(2): resultado obtenido en el laboratorio de I+D de la empresa cervecera mediante cromatografía de gases.

Como se puede observar, se obtuvieron resultados significativamente diferentes en función de la temperatura de las muestras, como se deduce de los valores de error relativo " E_r " (Tabla 12) calculados tomando como referencia el dato obtenido por cromatografía de gases. Es evidente que los niveles de alcohol determinados con el sistema de flujo en las cervezas a 4°C son considerablemente menores que los medidos en las muestras que se encontraban a temperatura ambiente. Esto es debido a que el proceso de transporte de etanol a través de la membrana se ve más dificultado a medida que disminuye la temperatura con lo que el proceso de difusión gaseosa tiene un menor rendimiento y, por tanto, la concentración de etanol en la disolución aceptora es menor a bajas temperaturas.

Este problema debía ser resuelto ya que la producción de cerveza se realiza a 4°C, hecho que no había sido considerado previamente. Para su resolución se plantearon varias estrategias teniendo en cuenta dos consideraciones:

- La unidad muestreadora debe estar en contacto con la muestra y con los patrones.
- El rendimiento con que se da el proceso de difusión gaseosa debe ser el mismo para patrones y muestras.

Mantener a temperatura ambiente la unidad muestreadora para la muestra, que es la temperatura a la que se encontraba la unidad muestreadora para el patrón, resultaba muy complicado, debido a que habría que implementar en el sistema un dispositivo calefactor. También se planteó la posibilidad de enfriar las disoluciones patrón de etanol para garantizar que la temperatura de sistema del patrón y de la muestra fuera la misma y, por tanto, se obtuviera el mismo rendimiento en el proceso de difusión gaseosa, pero se obtuvieron resultados poco reproducibles debido a que es complicado y costoso mantener la temperatura de los patrones del sistema de flujo continuo.

Por todo ello, fue necesario rediseñar tanto la unidad muestreadora como el sistema de flujo de modo que se asegurara que la temperatura y, por tanto, la reproducibilidad en el proceso de difusión gaseosa de muestras y de patrones fuera la misma. Por tanto, el nuevo diseño debía permitir que tanto la muestra como el patrón pasaran por el mismo dispositivo muestreador y de este modo evitar que

pequeñas diferencias o defectos de la membrana pudieran producir grandes variaciones en el cálculo de concentración de etanol en la muestra, además de asegurar que el proceso de difusión gaseosa se diera a la misma temperatura. Para ello, se debía optimizar el recorrido realizado por la cerveza hasta la unidad muestreadora de modo que ésta alcanzara la temperatura ambiente antes de llegar a dicha unidad.

En la **Figura 20** se muestra el nuevo esquema de flujo continuo **(a)** y la nueva unidad muestreadora **(b)**. Como se puede observar en la **Figura 20a**, se hace necesario tener dos subsistemas de flujo, uno que lleva la correspondiente disolución (muestra o patrón) que contiene etanol (disolución dadora) a la unidad muestreadora y otro que arrastra el etanol que atraviesa la membrana de difusión gaseosa del dispositivo muestreador y lo lleva hasta el detector (disolución aceptora).

En el **subsistema I**, para la introducción tanto de la cerveza como de la disolución patrón, se hace necesario el empleo de una válvula de tres vías. Además, la necesidad de introducir en el subsistema la disolución portadora para separar la cerveza de la disolución patrón determina que haya que utilizar otra válvula de tres vías (Figura 20). De esta forma se consigue, dependiendo de la posición en la que estén cada una de las válvulas, que al muestreador llegue la cerveza o las disoluciones patrón, o bien la propia disolución portadora. Lógicamente, con este sistema se puede recuperar la línea base y separar las señales correspondientes a disolución patrón o a muestra.

En la **Figura 20b** se muestra el nuevo dispositivo muestreador, señalándose las entradas y salidas de las disoluciones dadora y aceptora. Se diseñaron dos modelos de muestreador de 20 y 14 mm de diámetro de superficie de contacto entre disoluciones dadora y aceptora con el fin de emplearse para la monitorización de etanol en cervezas "0,0" y "Sin", ya que el contenido de etanol en estas muestras es acusadamente diferente. Lógicamente, entre los dos componentes del muestreador se colocó una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro.

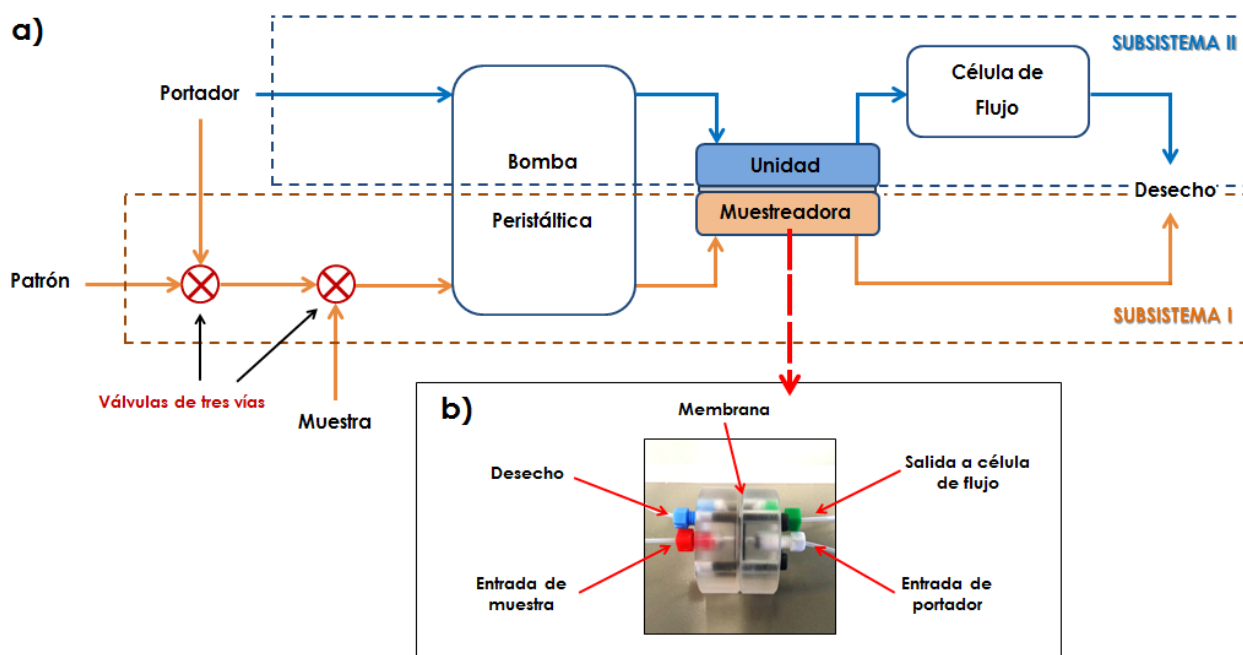


Figura 20. (a) Esquema del sistema de flujo en continuo III. (b) Vista lateral de la unidad doble de muestreo de 14 mm.

En la Figura 21a se presentan las señales amperométricas registradas empleando el sistema de flujo en continuo mostrado en la Figura 16 para diferentes disoluciones patrón de etanol y en la Figura 21b se ha representado la correspondiente curva de calibrado obtenida a partir de las señales con pendiente $(9,50 \pm 0,08) \times 10^3 \text{ nA } \%^{-1}$, ordenada en el origen $(-5 \pm 6) \text{ nA}$ y coeficiente de correlación $r = 0,9999$.

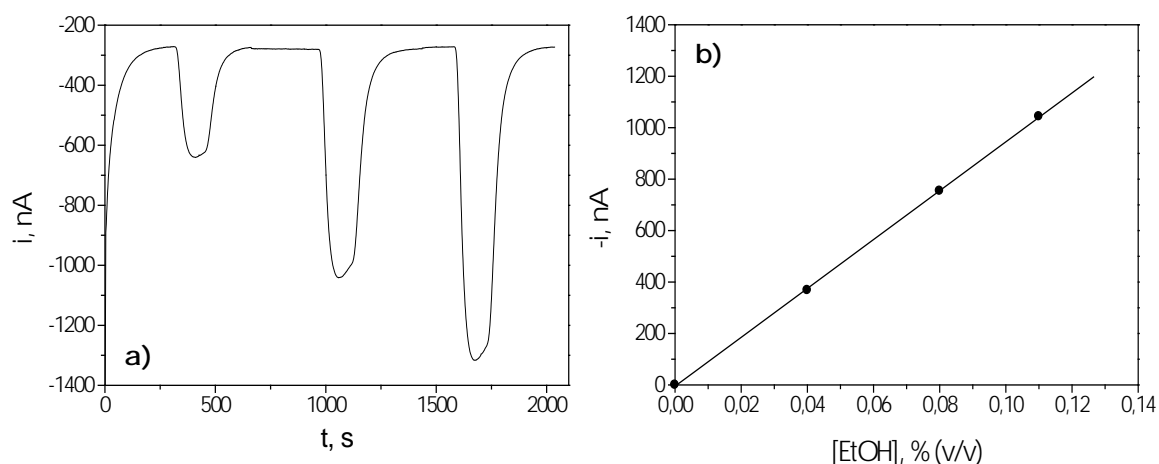


Figura 21. (a) Registro amperométrico obtenido al introducir, en el sistema de flujo en continuo III, disoluciones patrón de etanol de 0,04, 0,08 y 0,11 % (v/v). (b) Curva de calibrado correspondiente al registro (a). Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de $0,45 \mu\text{m}$. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Con el objetivo de comprobar que el sistema diseñado permite analizar muestras a 4°C, se llevó a cabo el análisis de diferentes patrones a temperatura ambiente y a 4°C. Los resultados se recogen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Resultados obtenidos en el análisis de patrones de etanol de varias concentraciones empleando el sistema de flujo en continuo III.

Muestra	Tª de muestra	[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} , %	t _{exp}
Patrón EtOH 0,040 %	ambiente	0,0394	0,040 ± 0,001 (RSD _{n=4} = 2,2 %)	1,120
		0,0410		
		0,0389		
		0,0399		
Patrón EtOH 0,040 %	4°C	0,0390	0,041 ± 0,002 (RSD _{n=4} = 3,0 %)	1,120
		0,0406		
		0,0419		
		0,0411		
Patrón EtOH 0,080 %	ambiente	0,0777	0,079 ± 0,009 (RSD _{n=3} = 3,6 %)	1,594
		0,0766		
		0,0820		
Patrón EtOH 0,080 %	4°C	0,0816	0,08 ± 0,01 (RSD _{n=3} = 4,8 %)	
		0,0878		
		0,0804		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Como se puede observar, se obtuvo una buena reproducibilidad de las medidas realizadas con diferentes patrones y distintas temperaturas, como se puede deducir de los valores de RSD obtenidos que en ninguno de los casos fue mayor de 5 %.

Para la comparación de los resultados obtenidos a diferentes temperaturas, se ha empleado como metodología el ensayo de hipótesis utilizando el método de la *t* de Student para la comparación de dos medias experimentales. Como se puede observar en la Tabla 13, se obtuvieron valores de *t*_{experimental} inferiores a las

correspondientes t_{tabulada} , siendo los valores $t_{\text{tab}}(6 \text{ grados de libertad, } p = 0,05) = 2,447$ para el ensayo con patrón de 0,04 % (v/v) y $t_{\text{tab}}(4 \text{ grados de libertad, } p = 0,05) = 2,776$ para el ensayo con patrón de 0,08 % (v/v). Como se deduce de la comparación de la t de Student para las diferentes temperaturas con los distintos patrones, no se observaron diferencias significativas en los valores de concentración de etanol determinados al variar la temperatura de la muestra y, por lo tanto, se puede afirmar que no hay errores sistemáticos en el método propuesto. Esto es debido a que el camino que recorre la muestra desde el punto de muestreo hasta la unidad muestreadora es lo suficientemente largo como para que se alcance la temperatura de la disolución aceptora (temperatura ambiente), lo cual hace que no haya variaciones en la cantidad de etanol que atraviesa la membrana y, por tanto, no se produzcan variaciones en la concentración de etanol medida, tal y como se pone de manifiesto en los resultados obtenidos.

Por lo tanto, a la vista de estos resultados se puede decir que la célula de muestreo es adecuada para la monitorización de etanol en cervezas tanto a temperatura de fabricación (4°C) como a temperatura ambiente.

3.3.1.1.1.4. Diseño y desarrollo del dispositivo desgasificador

Debido a que la cerveza tiene un elevado contenido de gas disuelto, fue necesaria la implementación de un sistema que eliminara las burbujas antes de que la muestra llegara al dispositivo muestreador. Se ha comprobado que en presencia del gas la difusión de etanol a través de la membrana es poco reproducible porque la superficie de contacto de la cerveza con la membrana se ve reducida, lo que se traduce en variaciones acusadas de la señal analítica. Para resolver este problema se acoplaron en el sistema diferentes desgasificadores comerciales y filtros empleados en HPLC para la eliminación de burbujas. Sin embargo, con estos dispositivos la disminución del gas disuelto que se conseguía no era suficiente como para obtener resultados reproducibles. Como alternativa, se diseñó y optimizó el desgasificador que aparece en la **Figura 22b** que permitió la separación prácticamente completa entre la cerveza y el gas que lleva disuelto.

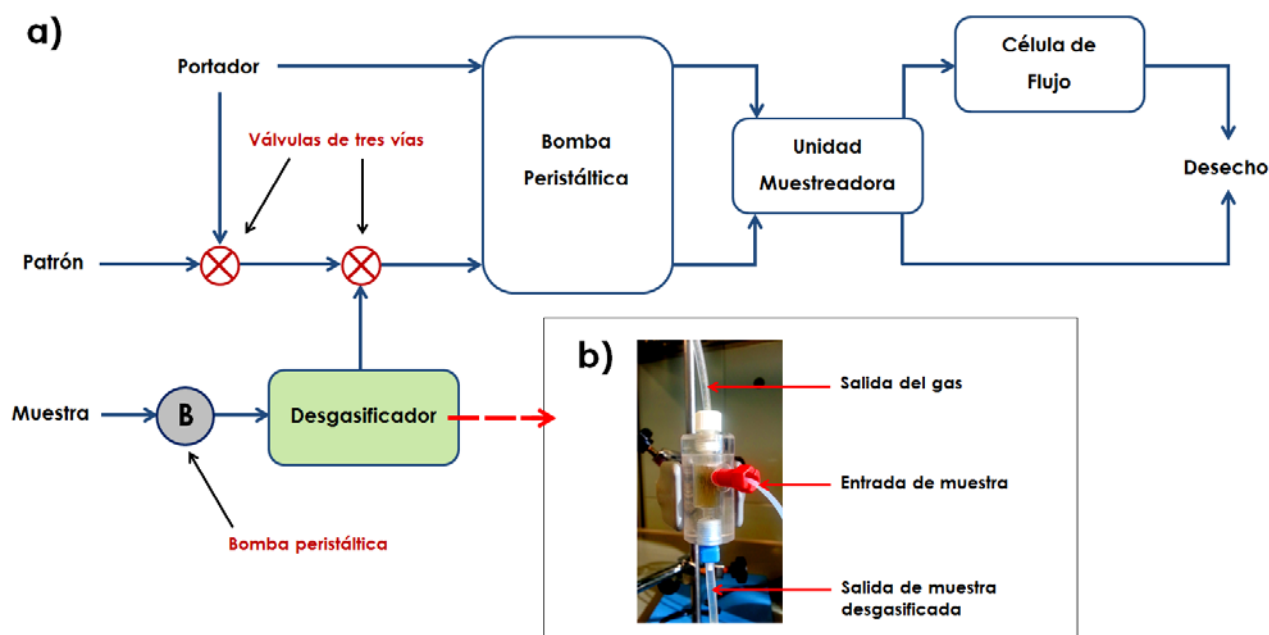


Figura 22. (a) Esquema del sistema de flujo en continuo IV. (b) Dispositivo desgasificador.

Lógicamente, el desburbujeador se debe implementar entre el punto de muestreo y la válvula de tres vías con el fin de que el sistema esté lo más libre de gas y que la formación de burbujas se dé en el menor grado posible (Figura 22a). Como se puede observar en la Figura 22a, es necesario el empleo de una bomba peristáltica auxiliar para alimentar el dispositivo desgasificador con la cerveza a analizar. Este componente no sería necesario en el caso de que la entrada de muestra se llevara a cabo en la línea de producción de la cerveza, ya que la presión generada por el caudal de la línea sería suficiente para que la muestra alcanzara el desburbujeador.

En la Figura 23 se muestra un ejemplo del efecto del ruido y la perturbación sobre las señales amperométricas por parte de las burbujas presentes en la muestra. Tras incorporar el dispositivo desgasificador al sistema de flujo, dichas señales se estabilizaron, lo que indica la minimización suficiente del contenido de gas en la muestra como para que no se produzca una distorsión de las señales analíticas.

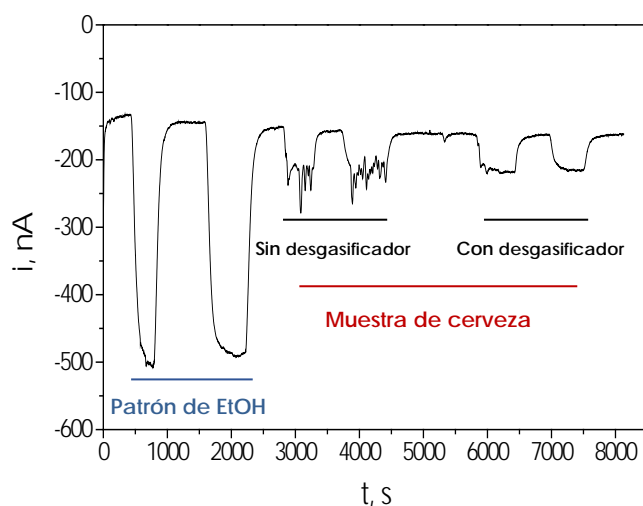


Figura 23. Registro amperométrico obtenido antes y después de acoplar el dispositivo desgasificador al sistema de flujo en continuo. Señales correspondientes a disolución patrón de etanol 0,04 % (v/v) y cerveza 0,0. Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm . Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

3.3.1.1.2. Estudios de estabilidad

3.3.1.1.2.1. Estabilidad del biosensor de etanol

La estabilidad del biosensor compuesto de grafito-Teflón ya ha sido estudiada cuando se utiliza como sistema de detección en las medidas en discontinuo [Guzmán-Vázquez de Prada, 2003] (patente WO 2002012550 A1). Por esta razón, en este apartado solamente se estudiarán las variables que afectan a la estabilidad del biosensor cuando se emplea como dispositivo detector en el sistema de flujo continuo. Así, se estudiará la repetitividad de las señales analíticas y la reproducibilidad de los calibrados, y el tiempo de vida útil del biosensor cuando está monitorizando continuamente el contenido de etanol en la cerveza.

El estudio del tiempo de vida del biosensor se realizó directamente con cerveza "Sin" introducida de forma ininterrumpida en el sistema de flujo continuo, utilizando diferentes biosensores compósitos. En la **Figura 24** se muestran los registros i - t para uno de los biosensores ensayados. Como se puede observar, el biosensor compuesto presenta una deriva en la señal amperométrica con el tiempo, lo que se traduce en una disminución de la señal analítica. Por esta razón, durante

el tiempo de vida del biosensor se realizaron recalibrados con objeto de comprobar que aún se podía regresar a línea base, y que, por tanto, la pérdida de señal correspondía al desgaste del biosensor. Los recalibrados se realizaron sin parar el sistema de flujo con disoluciones patrón de etanol a un nivel de concentración de entre 1,0-2,0 % (v/v). Cuando la señal disminuía acusadamente y, por tanto, la concentración calculada era menor, se introducían en el sistema las disoluciones patrón de etanol correspondientes como se puede ver en la Figura 20. De esta manera, el biosensor compósito podía seguir utilizándose en la monitorización de etanol, proporcionando valores del contenido de etanol reales, ya que se minimizaba el efecto de la deriva de la señal analítica obtenida. Teniendo en cuenta esta deriva, la recalibración, se realizó, en principio, cada 60 minutos.

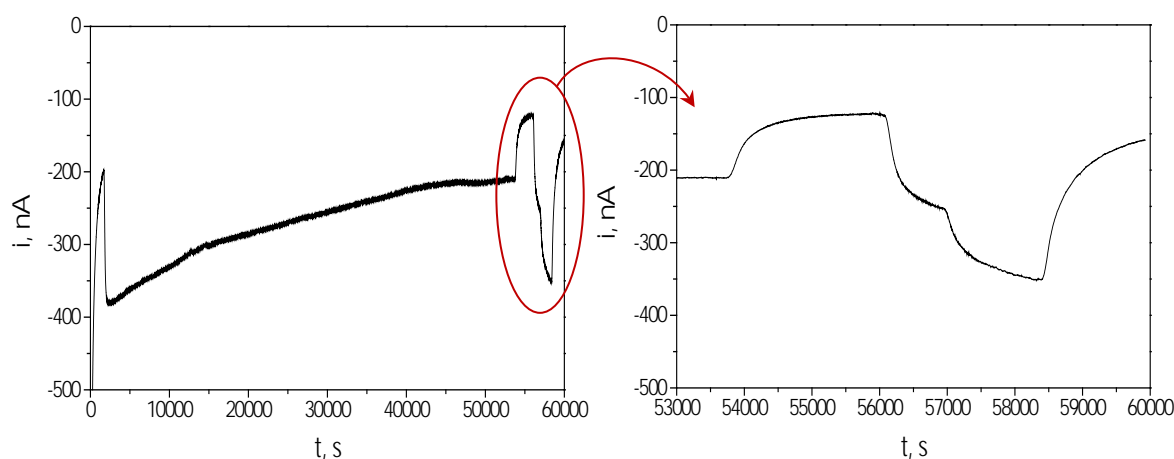


Figura 24. Registro amperométrico obtenido durante el tercer día de trabajo para el biosensor. Señales correspondientes a la medida continua de cerveza "Sin" y calibrado con disoluciones patrón de etanol 1,0 y 2,0 % (v/v). Unidad doble de muestreo de 14 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm . Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Este mismo estudio se realizó con un total de 10 biosensores diferentes. El criterio para decidir el final del tiempo de vida del biosensor fue que no se pudieran tener calibrados útiles para la cuantificación de etanol. Se obtuvo un tiempo de vida medio de 80 horas (aproximadamente 3 días y medio), siendo la duración máxima 95 horas y la mínima 76 horas.

En la **Figura 25** se muestra un registro del mismo biosensor entre el tercer y cuarto día de trabajo, en el que se puede observar cómo al cabo de unas 12 horas ya no fue posible obtener un calibrado lineal en todo el margen de concentraciones necesario para realizar la monitorización de etanol en la cerveza. Como se puede apreciar en dicha figura, la medida de intensidad de corriente para el nivel de concentración de etanol más alto del calibrado es prácticamente la misma que para el nivel de concentración inferior. Por ello, se considera en este punto que el biosensor no puede seguir utilizándose para la cuantificación del contenido de etanol en cerveza.

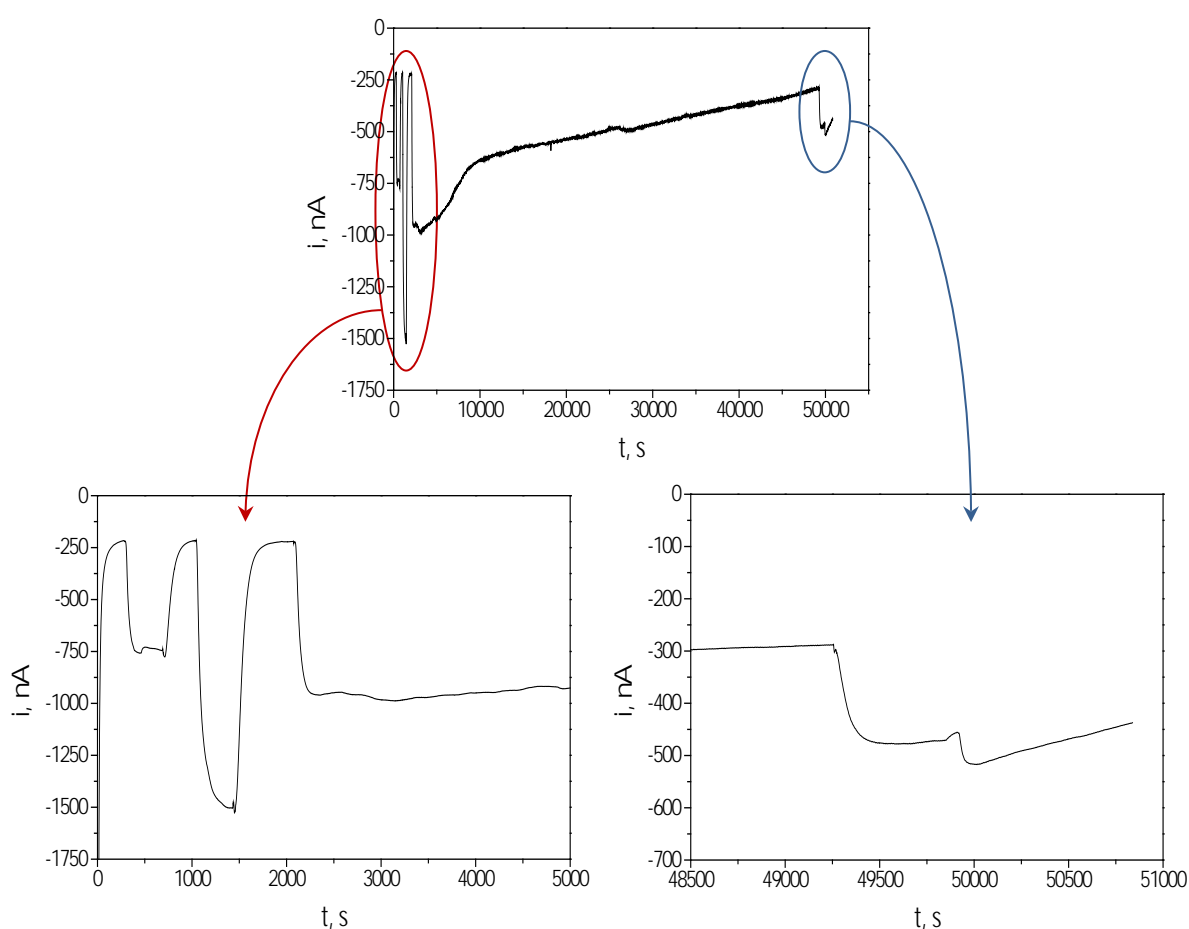


Figura 25. Registro amperométrico obtenido durante la noche del tercer al cuarto día de trabajo para el biosensor. Señales correspondientes a la medida continua de cerveza "Sin" y calibrado con disoluciones patrón de etanol 1,0 y 2,0 % (v/v). Unidad doble de muestreo de 14 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm . Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

La repetitividad de las medidas se evaluó para una serie de 10 disoluciones patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v), utilizando el sistema que emplea la unidad muestreadora de 20 mm de diámetro, y de 0,8 % (v/v) para el sistema que emplea la unidad muestreadora de 14 mm de diámetro (**Figura 26**). Los valores de desviación estándar relativa obtenidos fueron de 2,9 y 5,6 %, respectivamente. Estos resultados reflejan una aceptable repetitividad de las medidas amperométricas realizadas con el bioanalizador manual desarrollado.

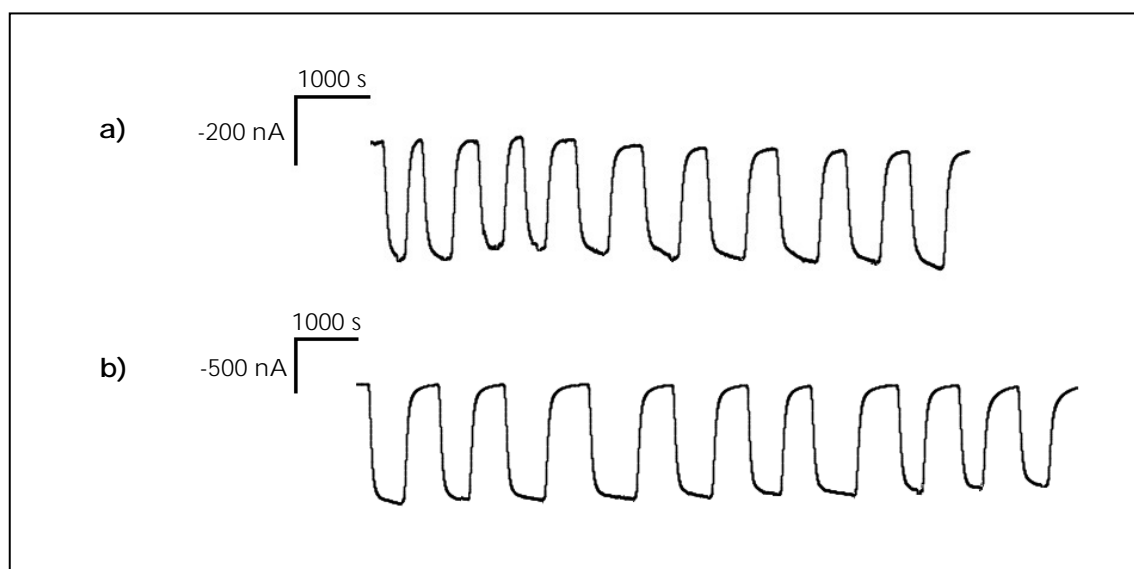


Figura 26. Señales amperométricas correspondientes a 10 medidas sucesivas registradas al introducir disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v) **(a)** y 0,8 % (v/v) **(b)** en el bioanalizador manual. Unidad doble de muestreo de 20 mm **(a)** y 14 mm **(b)** de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

La reproducibilidad de los calibrados se estudió con el objetivo de comprobar si era posible la monitorización de alcohol con el bioanalizador manual de flujo en continuo. Para este estudio se realizaron calibrados con disoluciones patrón de etanol de concentraciones comprendidas entre 0,02 y 0,06 % (v/v) para el sistema que emplea la unidad muestreadora de 20 mm, y entre 0,3 y 0,9 % (v/v) para el sistema que emplea la unidad de 14 mm. En la **Figura 27** se muestran las señales amperométricas correspondientes a 3 calibrados sucesivos realizados con cada unidad muestreadora.

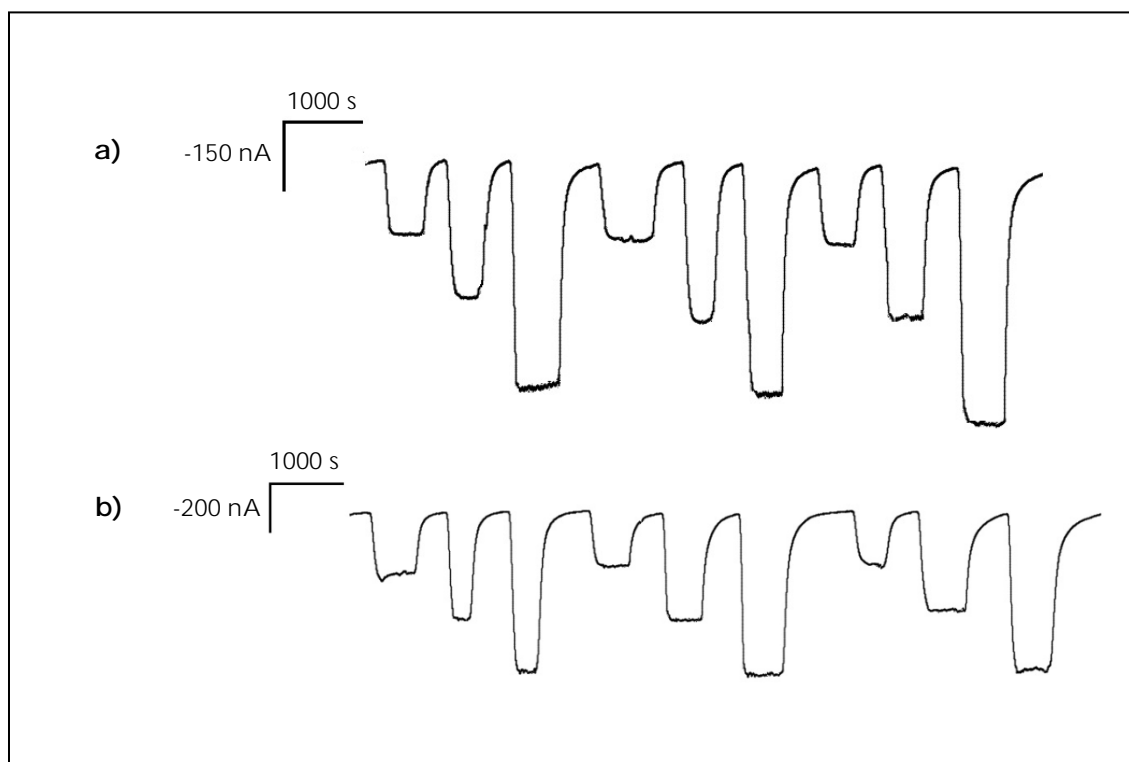


Figura 27. Señales amperométricas correspondientes a 3 calibrados sucesivos registradas al introducir disoluciones patrón de etanol de concentraciones **(a)** 0,02, 0,04 y 0,06 % (v/v) y **(b)** 0,3, 0,6 y 0,9 % (v/v). Unidad doble de muestreo de 20 mm **(a)** y 14 mm **(b)** de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Tabla 14. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y valores de desviación estándar relativa determinados en el cálculo de las pendientes promedio correspondientes a los calibrados de la Figura 27.

Muestreador	Pendiente, nA % ⁻¹	O.o, nA	r	Pendiente promedio, nA % ⁻¹	RSD, %
20 mm	$(7,9 \pm 0,2) \times 10^3$	-2 ± 8	0,9992	$(8,0 \pm 0,4) \times 10^3$	2,2
	$(8,2 \pm 0,2) \times 10^3$	0 ± 8	0,9993		
	$(7,97 \pm 0,08) \times 10^3$	3 ± 3	0,9999		
14 mm	$(7,1 \pm 0,2) \times 10^2$	10 ± 13	0,9990	$(7,1 \pm 0,2) \times 10^2$	1,3
	$(7,2 \pm 0,1) \times 10^2$	6 ± 7	0,9997		
	$(7,0 \pm 0,2) \times 10^2$	-1 ± 10	0,9994		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Asimismo, en la **Tabla 14** se recogen los valores de pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de dichos calibrados, junto con los valores de RSD obtenidos en la determinación de la media de las pendientes. Dichos valores de desviación estándar relativa, tanto para los valores de las pendientes de los calibrados, como para las intensidades de corriente en el estado estacionario realizando medidas repetidas, reflejan la buena reproducibilidad de las medidas analíticas obtenidas con el bioanalizador manual.

3.3.1.1.2.2. Estabilidad de la membrana PTFE

La membrana de Teflón de la unidad muestreadora también presenta un tiempo de vida útil debido a que, al estar en contacto continuo con muestras de cerveza, tiene lugar un proceso de ensuciamiento que hace necesario su cambio. Así, con las membranas ensayadas, se observó una duración aproximada de 105 h en 18 días de trabajo monitorizando etanol en cerveza. Es necesario indicar que este tiempo de vida es más prolongado de lo que cabía esperar gracias a la etapa de limpieza que se aplica al sistema bioanalizador con disolución básica y agua destilada que se lleva a cabo periódicamente al finalizar el análisis. De este modo se evita un deterioro más rápido de este componente y, por lo tanto, no necesita ser sustituido de manera muy frecuente.

3.3.1.1.3. Curvas de calibrado y características analíticas

Con el diseño final del sistema de análisis en flujo manual con detección amperométrica desarrollado se procedió a construir las curvas de calibrado y a establecer las características analíticas del bioanalizador manual empleando las dos unidades muestreadoras desarrolladas. Se ha estudiado la respuesta obtenida en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,002 y 0,160 % (v/v) de etanol para el bioanalizador con el dispositivo de 20 mm de diámetro, y desde 0,02 a 1,80 % (v/v) para el sistema con el dispositivo de 14 mm. Las curvas de calibrado obtenidas para la determinación de etanol en continuo se muestran en la **Figura 28**.

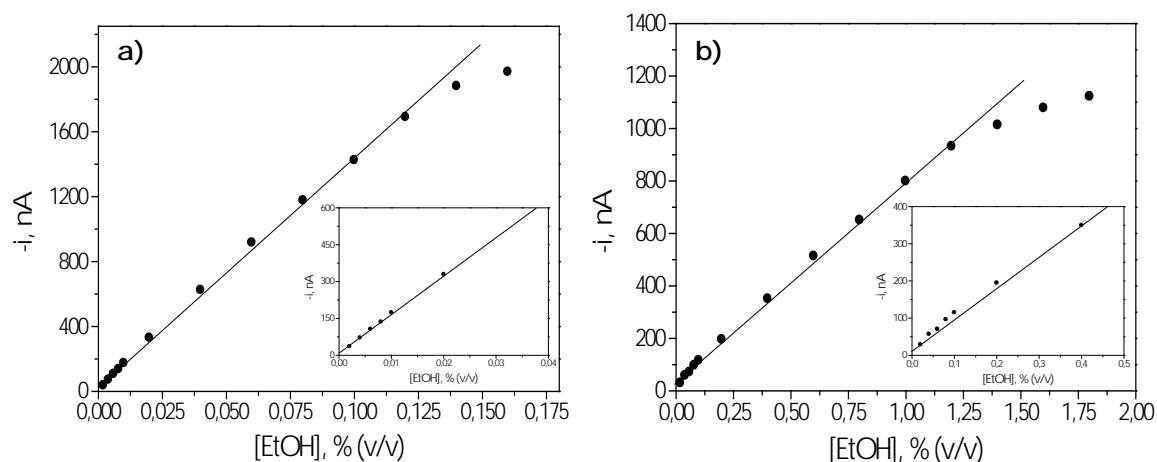


Figura 28. Curvas de calibrado obtenidas a partir de los registros intensidad-tiempo para disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes. Unidad doble de muestreo de 20 mm (a) y 14 mm (b) de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 0,5 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Para establecer el intervalo lineal de los calibrados se ha tomado como criterio que el coeficiente de correlación r de la representación por mínimos cuadrados correspondiente al intervalo de concentraciones seleccionado no sea inferior a 0,998 [Gamella, 2010^b].

Como criterios para estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado los sugeridos por la IUPAC [Inczedy, 1998]. En el caso del límite de detección se ha empleado $3S_b/m$, donde "m" es la pendiente del intervalo lineal del calibrado y " S_b " es la desviación estándar del blanco en intensidad de corriente. Ese valor de " S_b " se ha calculado utilizando los valores de corriente medidos durante los 300 s previos a la medida de etanol. Por lo que respecta al límite de cuantificación, se ha calculado de acuerdo con el criterio $10S_b/m$, donde los parámetros y el método de estimar la desviación estándar del blanco son los mismos que los empleados en la determinación del límite de detección.

Las características analíticas determinadas a partir de los registros intensidad-tiempo para la construcción de las curvas de calibrado se recogen en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Intervalos de linealidad, pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 28.

Muestreador	Intervalo de linealidad, %	Pendiente, nA % ⁻¹	O.o, nA	r	LD, %	LC, %
20 mm	(7,300 - 1200)x10 ⁻⁴	(1,41 ± 0,02)x10 ⁴	8 ± 10	0,9992	2,2x10 ⁻⁴	7,3x10 ⁻⁴
14 mm	(9,900 - 1200)x10 ⁻³	(7,7 ± 0,1)x10 ²	5 ± 6	0,9990	3,0x10 ⁻³	9,9x10 ⁻³

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

El intervalo lineal de concentraciones obtenido para el dispositivo muestreador de 20 mm de diámetro de superficie de contacto entre disolución dadora y disolución aceptora se utilizará para la determinación de cerveza "0,0", ya que el contenido máximo de etanol permitido en estas cervezas es de 0,04 %, que está dentro de dicho intervalo. Por lo que se refiere a la unidad muestreadora de 14 mm de diámetro se empleará para la monitorización de etanol en cervezas "Sin" ya que el valor de 1 % está incluido en el intervalo dinámico de concentraciones, que es el valor máximo permitido para este tipo de cervezas.

Con el fin de mejorar los tiempos de análisis y simplificar la metodología de cara a la automatización total del sistema, a partir de este momento se van a construir calibrados unipuntuales ya que, como se recoge en la Tabla 15, se obtienen coeficientes de correlación muy cercanos a 1. Además el valor obtenido de la ordenada en el origen del calibrado es muy pequeña, teniendo el 0,0 dentro de su intervalo de confianza, por lo que se puede decir que prácticamente es 0,0. El **calibrado unipuntual** se refiere a que el calibrado se construye con un solo punto experimental, el otro punto considerado para obtener una recta es el (0,0).

3.3.1.1.4. Análisis de muestras de cerveza

La aplicabilidad del bioanalizador manual (**Figura 29**) desarrollado se ha empleado en el análisis de cervezas "0,0" y "Sin". Este prototipo consta de la unidad muestreadora que, dependiendo del tipo de cerveza a analizar, tiene unas dimensiones diferentes, y por un biosensor que actúa de sistema de detección, que

van a ser dispositivos desechables y, por tanto, con un tiempo de vida útil determinado.

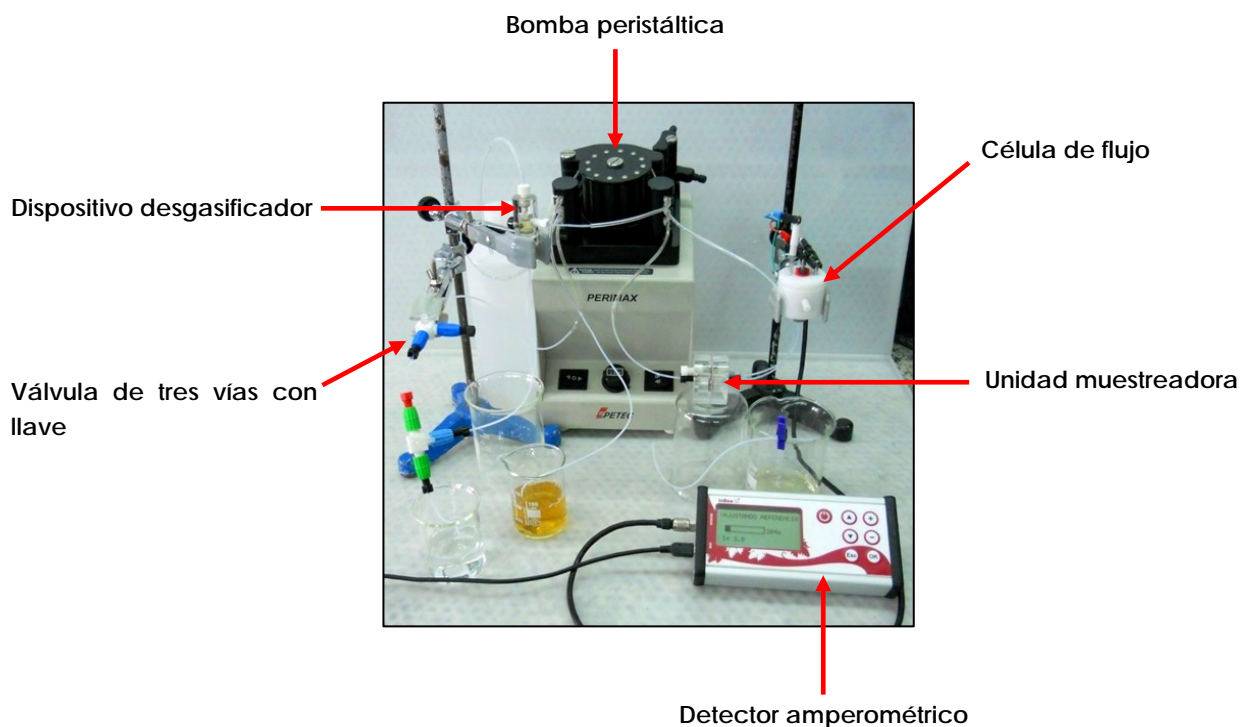


Figura 29. Prototipo del bioanalizador manual para la monitorización de etanol en continuo.

Este prototipo de flujo continuo manual se tomó como punto de partida para el desarrollo de otros bioanalizadores, presentados en esta Tesis Doctoral, realizando, lógicamente, las modificaciones oportunas para que cumplan los objetivos planteados en cada caso.

Con el fin de validar el bioanalizador manual desarrollado, se procedió al análisis de diferentes muestras ciegas de cerveza facilitadas por una empresa cervecera, para las que previamente se había calculado el valor del contenido de etanol mediante cromatografía de gases en el laboratorio de I+D de esta empresa. Todas las muestras ciegas fueron analizadas a 4°C, y ninguna fue sometida a un proceso de desgasificación ni a ningún otro tratamiento previo a la introducción de la muestra en el bioanalizador.

Para la determinación de etanol en cada muestra, en primer lugar se realizó un calibrado unipuntual con disolución patrón de etanol de concentración

adecuada en función del tipo de cerveza a analizar. Así, para la cerveza "0,0" se empleó patrón de una concentración de 0,04 % (v/v), por ser éste el valor límite de contenido alcohólico que permite la ley para este tipo de cerveza, mientras que en el caso de la cerveza "Sin" se empleó un patrón de 0,8 % (v/v), valor muy cercano al límite del 1,0 % (v/v) que se permite para este otro tipo de cerveza (RD 53/1995).

En las **Tablas 16 y 17** se recogen los valores de concentración obtenidos para cada tipo de cerveza.

Tabla 16. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de etanol en muestras de cerveza "0,0" empleando el bioanalizador manual con la unidad muestreadora de 20 mm de diámetro y el método cromatográfico.

Muestra	(1) [EtOH], %	(2) [EtOH], %	(3) [EtOH], %	(1/2) t_{exp}	(1/3) t_{exp}	(2/3) t_{exp}
Cerveza "0,0" - 1	0,006 ± 0,002 (RSD _{n=3} = 12,4 %)	0,005 ± 0,002 (RSD _{n=3} = 13,4 %)	0,005 ± 0,001 (RSD _{n=3} = 11,1 %)	1,264	2,138	0,760
Cerveza "0,0" - 2	0,0038 ± 0,0007 (RSD _{n=3} = 7,5 %)	-	0,0036 ± 0,0004 (RSD _{n=3} = 4,3 %)	-	1,414	-
Cerveza "0,0" - 3	0,025 ± 0,005 (RSD _{n=3} = 8,2 %)	0,022 ± 0,005 (RSD _{n=3} = 9,1 %)	0,021 ± 0,004 (RSD _{n=3} = 7,5 %)	2,000	2,636	0,450
Cerveza "0,0" dopada 0,04 - 0,05 %	0,045 ± 0,007 (RSD _{n=3} = 5,9 %)	0,047 ± 0,008 (RSD _{n=3} = 6,4 %)	0,043 ± 0,002 (RSD _{n=3} = 2,1 %)	0,866	1,508	2,451
Cerveza "0,0" dopada 0,08 - 0,1 %	0,086 ± 0,005 (RSD _{n=3} = 2,4 %)	0,086 ± 0,009 (RSD _{n=3} = 4,2 %)	0,085 ± 0,006 (RSD _{n=3} = 3,0 %)	0,139	0,192	0,274

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 17. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de etanol en muestras de cerveza "Sin" empleando el bioanalizador manual con la unidad muestreadora de 14 mm de diámetro y el método cromatográfico.

Muestra	(1) [EtOH], %	(2) [EtOH], %	(3) [EtOH], %	(1/2) t_{exp}	(1/3) t_{exp}	(2/3) t_{exp}
Cerveza "Sin" - 1	0,9 ± 0,1 (RSD _{n=3} = 6,1 %)	-	0,83 ± 0,03 (RSD _{n=3} = 1,7 %)	-	2,341	-
Cerveza "Sin" - 2	0,87 ± 0,03 (RSD _{n=3} = 1,2 %)	0,86 ± 0,04 (RSD _{n=3} = 1,8 %)	0,88 ± 0,05 (RSD _{n=3} = 2,5 %)	1,429	0,472	1,421
Cerveza "Sin" - 3	1,3 ± 0,2 (RSD _{n=3} = 5,3 %)	-	1,4 ± 0,3 (RSD _{n=3} = 6,9 %)	-	1,580	-
Cerveza "Sin" - 4	0,9 ± 0,2 (RSD _{n=3} = 8,8 %)	-	0,85 ± 0,05 (RSD _{n=3} = 2,4 %)	-	0,241	-

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Leyenda para las Tablas 16 y 17:

(1): resultado obtenido en el laboratorio de I+D de la empresa cervecera empleando cromatografía de gases.

(2): resultado obtenido en el laboratorio de I+D de la empresa cervecera empleando el bioanalizador manual desarrollado.

(3): resultado obtenido en el laboratorio de la UCM por el bioanalizador manual desarrollado.

(1/2): valor experimental del estadístico t a un nivel de significación del 0,05 para la comparación de las concentraciones medias obtenidas con el bioanalizador desarrollado trabajando en el laboratorio de I+D de la empresa cervecera y por cromatografía de gases.

(1/3): valor experimental del estadístico t a un nivel de significación del 0,05 para la comparación de las concentraciones medias obtenidas con el bioanalizador desarrollado trabajando en el laboratorio de la UCM y por cromatografía de gases.

(2/3): valor experimental del estadístico t a un nivel de significación del 0,05 para la comparación de las concentraciones medias obtenidas con el bioanalizador desarrollado trabajando en el laboratorio de I+D de la empresa cervecera y en el laboratorio de la UCM.

La validación de los resultados se ha llevado a cabo mediante contrastes de significación para métodos de análisis donde las muestras analizadas tienen diferentes contenidos de analito a determinar. La metodología empleada ha sido el ensayo de hipótesis utilizando el método de la t de Student para la comparación de dos medias experimentales y el uso de rectas de regresión mediante mínimos cuadrados para comparar métodos analíticos.

Se han comparado estadísticamente las concentraciones medias experimentales obtenidas en la determinación de etanol en las muestras de cerveza empleando el bioanalizador manual en el laboratorio de la empresa cervecera y en el laboratorio de la UCM, y a su vez cada resultado se ha comparado con el obtenido empleando la metodología de la cromatografía de gases. Como se puede observar en las Tablas 16 y 17, en todos los casos los valores de $t_{\text{experimental}}$ calculados para cada muestra han resultado ser menores que el valor crítico t_{tab} (4 grados de libertad, $p = 0,05$) = 2,776, por lo que se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los métodos empleados al nivel de significación estudiado.

Adicionalmente, se ha empleado el método de las rectas de regresión para la comparación de la metodología validada de la cromatografía de gases, empleada por la empresa cervecera, y la del bioanalizador manual trabajando en el laboratorio de la UCM. Estas rectas de regresión se han construido con los datos experimentales del método a evaluar (eje y) y del método validado (eje x). Un método no tiene errores sistemáticos si la ordenada en el origen y la pendiente obtenida por mínimos cuadrados tienen valores de 0 y 1, respectivamente. Por la dificultad con que esto ocurre, se considera que dos métodos no son significativamente diferentes cuando la ordenada en el origen calculada contiene en su intervalo de confianza el cero y a su vez el intervalo de la pendiente contiene el valor 1. Como evaluador de la bondad del ajuste se toma en consideración el coeficiente de correlación r obtenido.

La recta de regresión obtenida, representada en la **Figura 30**, tiene un valor de la pendiente de $(1,02 \pm 0,03)$ y de la ordenada en el origen de $(-0,01 \pm 0,02)$, por lo tanto los intervalos de confianza de cada parámetro incluyen el 1 y el 0, respectivamente, lo que pone de manifiesto que el método desarrollado para la determinación de etanol en cervezas es adecuado. Además, el valor del coeficiente

r es de 0,996, lo que indica una buena correlación de los resultados de grado alcohólico obtenidos con el bioanalizador y el método validado.

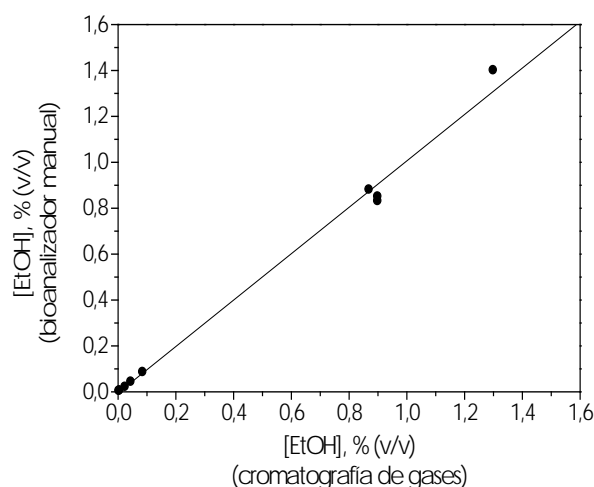


Figura 30. Comparación de los resultados obtenidos para el análisis del contenido de etanol en cervezas empleando el bioanalizador manual de flujo en continuo desarrollado frente a los resultados obtenidos con el cromatógrafo de gases.

3.3.1.1.2. Diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual

Para realizar el diseño del sistema FIA se partió del sistema de flujo optimizado anteriormente y se fueron modificando y adicionando los componentes necesarios para obtener los diagramas correspondientes. En la **Figura 31** se muestra el esquema del sistema FIA a desarrollar con las modificaciones realizadas con respecto al sistema de flujo continuo.

En primer lugar, fue necesario integrar un sistema de inyección (**Figura 31b**) con el fin de que llegara al detector un volumen de muestra fijo de forma reproducible. Lógicamente, fue necesario poner la unidad muestreadora después de la válvula de inyección (**Figura 31a**) con las mismas características de tamaño de poro y de superficie de contacto que en el sistema de flujo continuo específicas para cada tipo de cerveza, con el fin de que la dilución del etanol que contiene la cerveza se realizase en el propio sistema FIA.

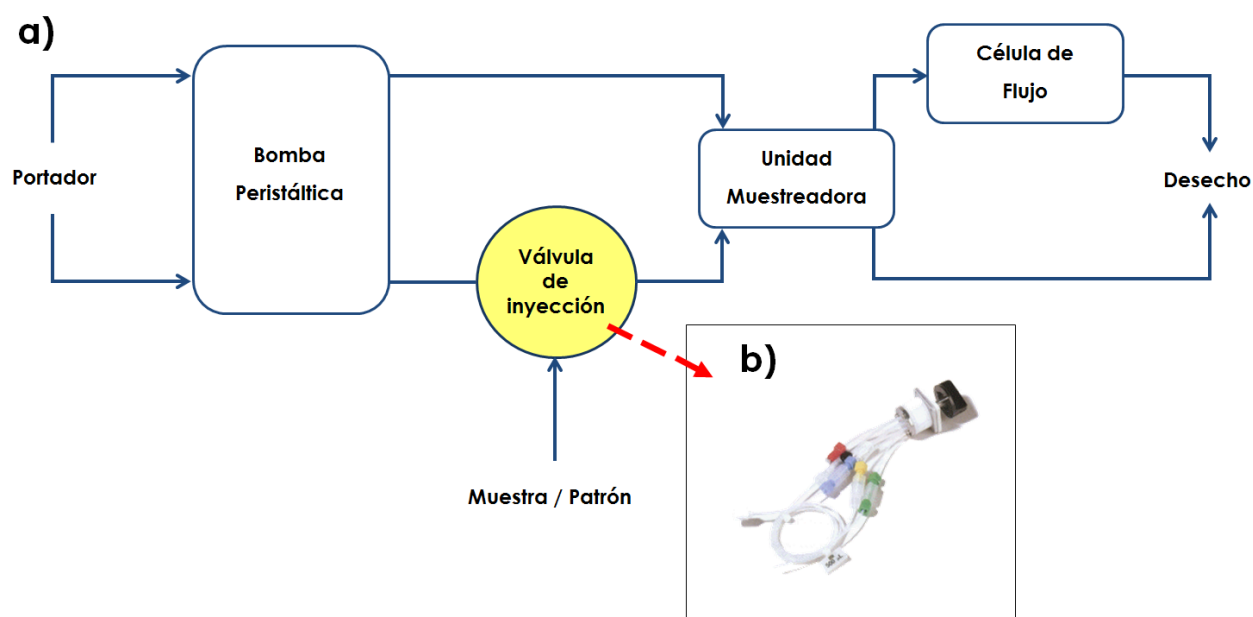


Figura 31. (a) Esquema del sistema FIA para el análisis de etanol en cerveza. (b) Válvula manual de inyección.

Como la inyección se iba a realizar de forma manual, la degasificación de la muestra se realizó también de forma manual mediante agitación con una varilla de vidrio y, por lo tanto, se eliminó del sistema FIA el degasificador.

Como se puede observar en el esquema, al igual que se diseñó para el sistema de flujo en continuo III (Figura 20a del Apartado 3.3.1.1.1.3), se trabajó con dos subsistemas de flujo. Uno de ellos, en el que la disolución portadora arrastraba el contenido del bucle de la válvula de inyección hasta la unidad muestreadora, y otro en el que la disolución aceptora arrastraba el etanol que atravesaba la membrana de difusión gaseosa del dispositivo muestreador y lo llevaba hasta el detector.

3.3.1.1.2.1. Optimización de las variables experimentales

3.3.1.1.2.1.1. Selección del biosensor de etanol

Los sistemas FIA son métodos cinéticos de tiempo fijo, por lo que no se alcanza ni el equilibrio físico ni el químico (reacción enzimática). De este modo las señales amperométricas obtenidas serán menores en el sistema FIA que cuando se trabaja con el sistema de flujo continuo en el que se alcanza el estado estacionario. Estos aspectos van a influir de forma decisiva en la elección del sistema de detección y por lo tanto en el biosensor a emplear en el sistema FIA.

Como se puede observar en el diagrama obtenido para la monitorización de cervezas "0,0" empleando el biosensor de grafito-Teflón como detector en el sistema FIA, mostrado en la **Figura 32**, la sensibilidad de las señales analíticas disminuye drásticamente con respecto a las obtenidas con el sistema de flujo continuo, además de tener una relación señal/ruido muy baja. Así, la medida de etanol con este tipo de sensor se hace menos reproducible e incluso se pueden tener problemas en la cuantificación del contenido de etanol en este tipo de cervezas.

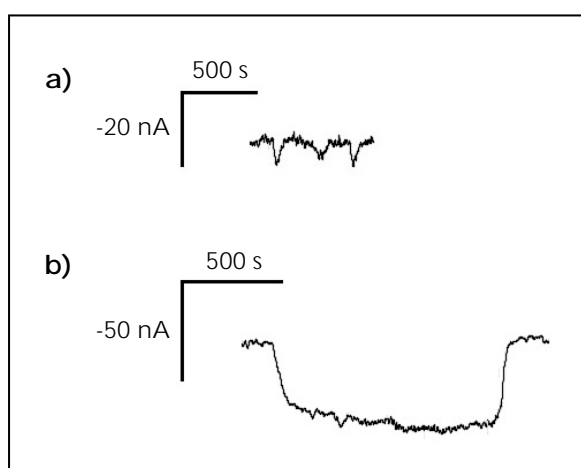


Figura 32. Intensidades de corriente registradas durante la monitorización de cerveza "0,0" desgasificada con un grado alcohólico de 2×10^{-3} % empleando como detector amperométrico un biosensor compuesto de grafito-Teflón de alcohol en el sistema FIA con un volumen de bucle de $500 \mu\text{L}$ (Figura 31a, Apartado 3.3.1.1.2) (a) y en el sistema de flujo en continuo III (Figura 20a, Apartado 3.3.1.1.1.3) (b). Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Por esta razón, se decidió comparar el biosensor de grafito-Teflón como sistema de detección con otro biosensor enzimático de AOD desarrollado por InBea Biosensores S.L (Figura 33), sujeto a la **patente WO 2010010211 A3**. Este biosensor utiliza como sustrato electródico un disco de acero inoxidable de 3 mm de diámetro sobre el que se deposita una fina capa de oro mediante la técnica de "sputtering". Sobre esta superficie, enzimas y mediador quedan inmovilizados por atrapamiento físico mediante el empleo de una membrana de difusión gaseosa semipermeable sujeta con una carcasa de goma. El sistema de reconocimiento está basado en las mismas reacciones enzimáticas y emplea el mismo mediador que el biosensor compuesto de grafito-Teflón, llevándose a cabo la monitorización de alcohol mediante la secuencia de reacciones mostrada anteriormente en la Figura 11 del Apartado 3.3.1.1.1.1.1.



Figura 33. Electrodo de acero inoxidable con capa de oro depositada por "sputtering".

En la **Tabla 18** se muestran las características del biosensor de capa fina de oro cuando se emplea como detector en medidas en discontinuo. Las características que se consideraron para comparar este biosensor con el compuesto de grafito-Teflón (Tabla 7 del Apartado 3.3.1.1.1.1.1) fueron principalmente la sensibilidad, el límite de detección y la relación señal/ruido. Como se puede observar en dicha tabla, el biosensor de acero inoxidable con capa de oro resulta mucho más sensible y con límites de detección más bajos que el biosensor compuesto, además de obtenerse un intervalo dinámico de concentraciones más amplio.

Tabla 18. Características analíticas y propiedades del biosensor de capa fina de oro de AOD-HRP-Fc trabajando en disoluciones agitadas de tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y empleando etanol como sustrato. $E_{ap} = 0,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. Datos facilitados por InBea Biosensores S.L.

Potencial de trabajo (vs. Ag/AgCl)	0,0 V
Medio de trabajo	tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4
Intervalo lineal	$(1,700 - 1750) \times 10^{-6} \%$ (v/v)
Sensibilidad	$(5,66 \pm 0,02) \times 10^5 \text{ nA } \%^{-1}$
Límite de detección	$5,6 \times 10^{-7} \%$ (v/v)
Límite de cuantificación	$1,7 \times 10^{-6} \%$ (v/v)
RSD	5,4 %
Tiempo de vida	20 días /60 medidas
Condiciones de almacenamiento	En humedad a 4°C
Tiempo de almacenamiento	20 días

Para comparar la relación señal/ruido de ambos biosensores, se registró un fiagrama empleando, como sistema de detección del bioanalizador FIA manual mostrado en la Figura 31a (Apartado 3.3.1.1.2), el biosensor de capa fina de oro en la monitorización de cerveza "0,0" y se comparó con el obtenido con el biosensor compuesto (Figura 34).

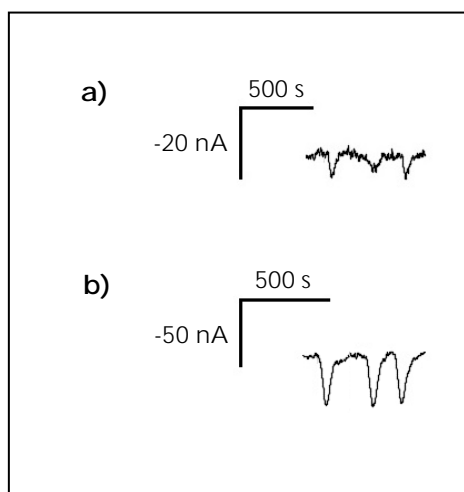


Figura 34. Intensidades de corriente correspondientes a la inyección por triplicado de $500 \mu\text{L}$ de cerveza "0,0" desgasificada con un grado alcohólico de $2 \times 10^3 \%$ registradas con un biosensor compuesto de grafito-Teflón de alcohol (a) y un biosensor de capa fina de oro de alcohol (b). Célula doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl.

Como se puede observar, además de la mayor sensibilidad del biosensor de "sputtering", se obtuvo una mejora drástica de la relación señal/ruido.

También es necesario indicar que, aunque el tiempo de almacenamiento es menor para los biosensores de "sputtering", 20 días son suficientes para los objetivos que se pretenden alcanzar.

Por lo que se refiere a la fabricación, el biosensor de acero inoxidable presenta una preparación mucho más sencilla y rápida que el biosensor compuesto de grafito-Teflón ya que, mientras en el primer caso sólo conlleva la deposición de pequeñas cantidades de los reactivos sobre la superficie del electrodo, la elaboración de la pastilla compósita requiere dos días. Además, en la preparación de dicha pastilla se emplean cantidades mucho mayores de enzimas y mediador que en el caso del biosensor de acero inoxidable y, teniendo en cuenta que el detector es un componente desechable del bioanalizador, resulta menos costoso, desde el punto de vista económico, trabajar con biosensores de acero inoxidable con capa de oro que con compósitos de grafito-Teflón.

3.3.1.1.2.1.2. Estudio de las variables hidrodinámicas: caudal y volumen de inyección

Se ha estudiado la influencia de las distintas variables hidrodinámicas, como son el caudal de la disolución portadora y el volumen de inyección, sobre las señales amperométricas del fiagrama. Adicionalmente, este estudio va a permitir conocer si la unidad muestreadora desarrollada, además de aislar el etanol de la muestra, va a producir una dilución adecuada para que las concentraciones de etanol que llegan al detector estén dentro del intervalo dinámico de medida y, por tanto, se pueda inyectar la cerveza tras una simple etapa de eliminación del gas contenido en su composición.

En primer lugar se evaluó la influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de corriente de pico FIA. Para realizar este estudio se han construido los correspondientes calibrados realizando inyecciones de 500 μL de disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes. Se trabajó con

caudales de 0,5, 1,0 y 2,0 mL min⁻¹, y se realizaron los ensayos empleando las unidades muestreadoras dobles de 20 y de 14 mm de diámetro. Las curvas de calibrado se han representado en la **Figura 35**.

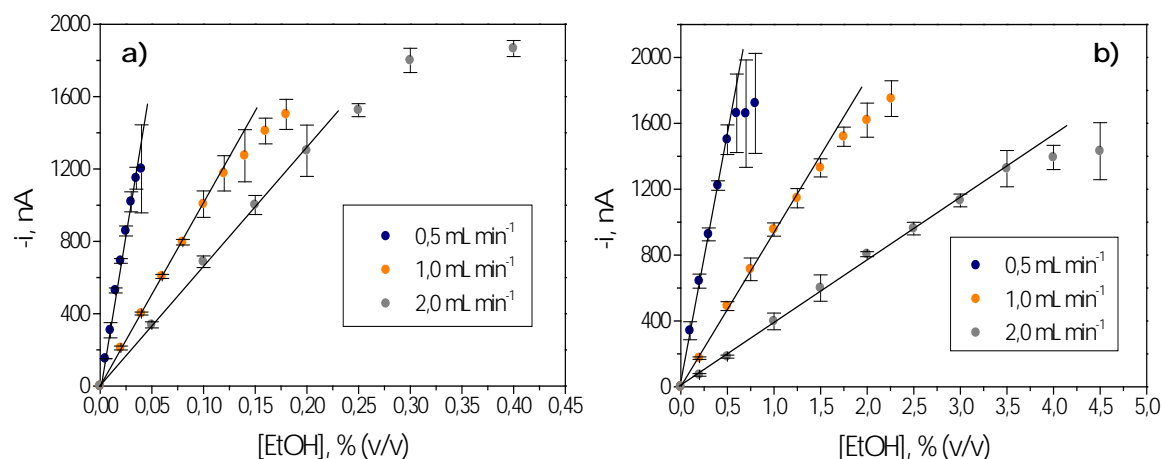


Figura 35. Intensidades de corriente registradas al inyectar 500 μL de disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes trabajando con (●) 0,5, (●) 1,0 y (●) 2,0 mL min⁻¹ de caudal para el portador. Unidad doble de muestreo de 20 mm (a) y 14 mm (b) de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Tabla 19. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y concentraciones máximas de etanol admitidas para los intervalos de linealidad, correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 35.

Caudal, mL min ⁻¹	Diámetro de contacto, mm	Pendiente, nA % ⁻¹	O.o, nA	r	Límite superior de linealidad, %
0,5	20	$(3,46 \pm 0,07) \times 10^4$	-12 ± 12	0,9991	0,03
	14	$(2,98 \pm 0,05) \times 10^3$	17 ± 15	0,9995	0,50
1,0	20	$(9,98 \pm 0,07) \times 10^3$	4 ± 4	0,9999	0,12
	14	$(9,3 \pm 0,2) \times 10^2$	5 ± 15	0,9991	1,25
2,0	20	$(6,5 \pm 0,1) \times 10^3$	13 ± 14	0,9995	0,20
	14	$(3,81 \pm 0,06) \times 10^2$	8 ± 11	0,9992	3,50

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Asimismo, las concentraciones máximas de etanol admitidas para los intervalos de linealidad obtenidos en las diferentes condiciones se muestran en la **Tabla 19**.

A la vista de los resultados, de entre los caudales estudiados, se llegó a una situación de compromiso entre un mayor intervalo lineal y una sensibilidad adecuada para la monitorización de etanol. Se escogió como valor óptimo un caudal de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, ya que a este valor (o superiores) el intervalo de linealidad proporcionado por el biosensor era el adecuado para la monitorización de alcohol tanto en cervezas "0,0", empleando la unidad muestreadora de 20 mm, como en cervezas "Sin", en este caso trabajando con la unidad muestreadora de 14 mm. Además, las intensidades de corriente de las señales obtenidas, proporcionan una sensibilidad adecuada para llevar a cabo la determinación de etanol en cervezas con bajo contenido alcohólico. Asimismo, se tuvo en cuenta otra variable como es la frecuencia de muestreo. En cada uno de los caudales estudiados la anchura de los picos FIA en la línea base, en unidades de tiempo, para una disolución patrón de etanol de 0,02 % (v/v) fue de 250 s, 160 s y 140 s para $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ y $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente. Al no observar una mejora significativa en la frecuencia de muestreo con el aumento del caudal, se decidió establecer $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ como caudal de trabajo.

La influencia del volumen de inyección se ha ensayado a un nivel de concentración de 0,02% (v/v) de etanol utilizando bucles de 50, 100, 250 y 500 μL . Los fiagramas obtenidos se muestran en la **Figura 36**, donde se puede observar cómo al aumentar el volumen de muestra inyectado, aumenta la intensidad de corriente pero también aumenta la anchura y, por tanto, el tiempo de residencia, además de observarse un aumento de la relación señal/ruido. Los valores de RSD obtenidos fueron de 25,1, 15,4, 11,3 y 2,0 % para los volúmenes de inyección de 50, 100, 250 y 500 μL , respectivamente. Por lo tanto, se eligió como volumen de inyección 500 μL como situación de compromiso entre una buena sensibilidad y una adecuada capacidad de muestreo, además de por la precisión obtenida.

Por lo tanto, para estudios posteriores realizados con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del biosensor en el sistema FIA propuesto se seleccionó como caudal de trabajo 1 mL min^{-1} y un volumen de inyección de 500 μL .

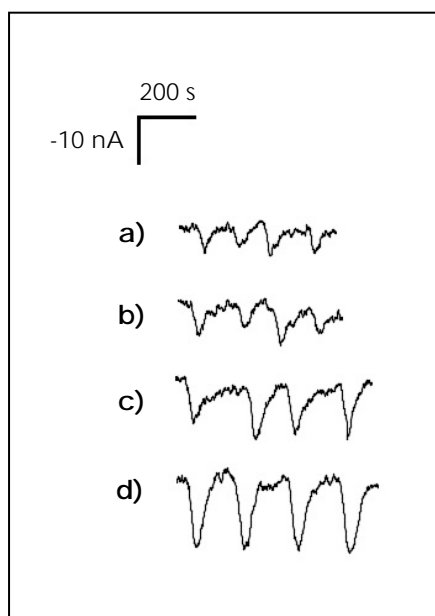


Figura 36. *Diagramas registrados al inyectar (a) 50 μL , (b) 100 μL , (c) 250 μL y (d) 500 μL de disolución patrón de etanol de concentración 2×10^{-3} % (v/v). Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Caudal de trabajo: 1,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.*

3.3.1.1.2.2. Estudios de estabilidad

En este apartado, se va estudiar la estabilidad de las señales analíticas del sistema FIA en cuanto a la repetitividad de las señales amperométricas, y la reproducibilidad de los calibrados. Además se evaluará el tiempo de vida útil del biosensor de capa fina de oro empleado como detector amperométrico del bioanalizador FIA.

La repetitividad de las señales amperométricas se ha estudiado realizando 20 medidas sucesivas de disoluciones patrón de etanol, empleando tanto la unidad muestreadora de 20 mm como la de 14 mm de diámetro de superficie de contacto, para niveles de concentración de 0,04 y 0,8 % (v/v), respectivamente. Los valores obtenidos para la desviación estándar relativa de las señales fueron de 2,8 % cuando se emplea el dispositivo muestreador de 20 mm de diámetro y de 4,9 % con el dispositivo de 14 mm. Esto es indicativo de que tanto la detección amperométrica en flujo como el proceso de dilución del volumen inyectado se dan de manera reproducible en las condiciones hidrodinámicas ensayadas. Los diagramas correspondientes a este estudio se muestran en la **Figura 37**.

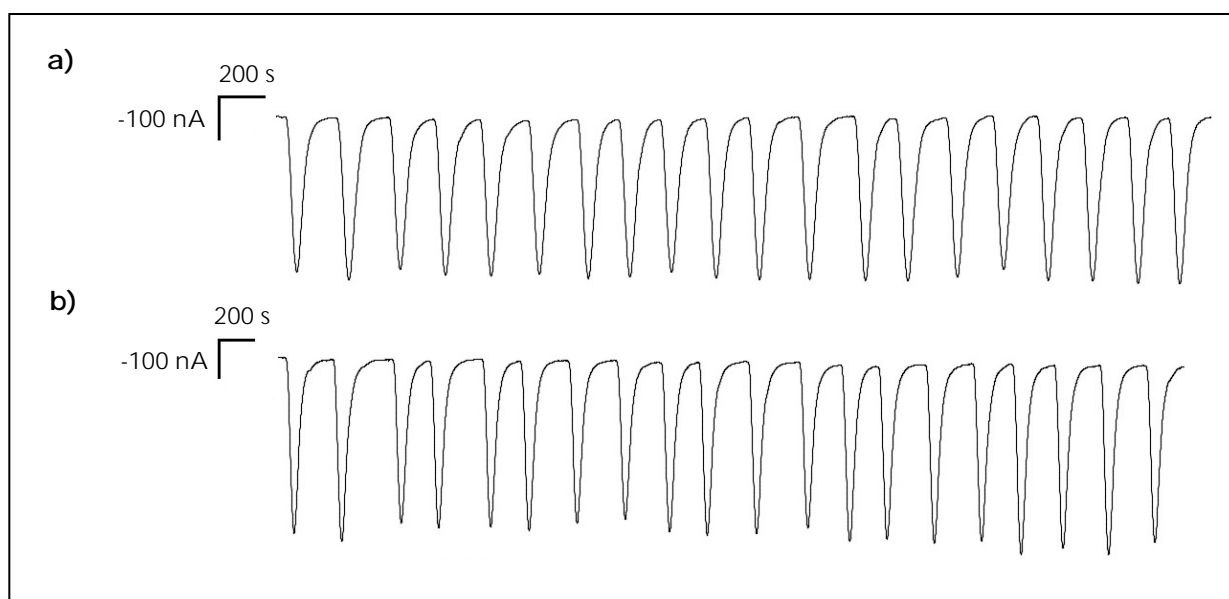


Figura 37. *Fiagramas correspondientes a 20 medidas sucesivas registradas al inyectar 500 μL de disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v) (a) y 0,8 % (v/v) (b). Célula doble de muestreo de 20 mm (a) y 14 mm (b) de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Caudal de trabajo: 1,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.*

El estudio de la reproducibilidad para calibrados unipuntuales se realizó con el objetivo de comprobar si era posible la monitorización de alcohol con el bioanalizador FIA mediante esta metodología. Para ello, se realizaron inyecciones por triplicado a diferentes niveles de concentración comprendidos entre 0,02 y 0,06 % (v/v) cuando se emplea la unidad muestreadora de 20 mm y de 0,4 a 1,2 % (v/v) para el muestreador de 14 mm. Los fiagramas obtenidos se muestran en la **Figura 38**. Con los valores de la media de intensidad de señal se construyeron los correspondientes calibrados unipuntuales. Además, también se construyeron calibrados de cuatro puntos incluyendo el (0,0), con los valores medios de la intensidad de señal para los diferentes niveles de concentración de etanol. En la **Tabla 20** se muestran los valores de pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de los calibrados obtenidos con cada dispositivo muestreador, junto con los valores de RSD obtenidos en el cálculo de las pendientes promedio.

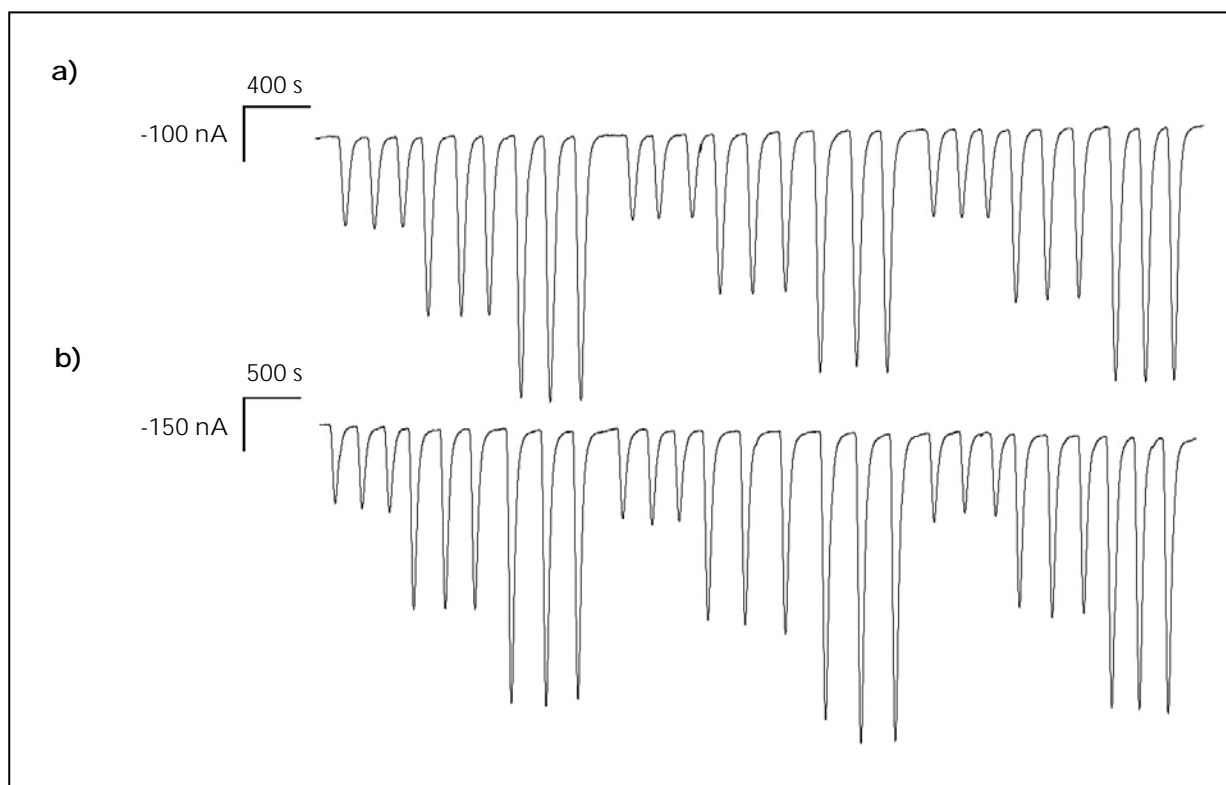


Figura 38. Diagramas correspondientes a 3 calibrados sucesivos registrados al inyectar por triplicado 500 μL de disoluciones patrón de etanol de concentraciones **(a)** 0,02 , 0,04 y 0,06 % (v/v) y **(b)** 0,4 , 0,8 y 1,2 % (v/v). Unidad doble de muestreo de 20 mm **(a)** y 14 mm **(b)** de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4. Caudal de trabajo: 1,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Tabla 20. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y valores de desviación estándar relativa determinados en el cálculo de las pendientes promedio correspondientes a los calibrados de la Figura 38.

Muestreador	Pendiente, nA \%^{-1}	O.o, nA	r	Pendiente promedio, nA \%^{-1}	RSD, %
20 mm	$(7,90 \pm 0,08) \times 10^3$	2 ± 3	0,9999	$(8 \pm 1) \times 10^3$	5,1
	$(7,13 \pm 0,09) \times 10^3$	3 ± 3	0,9998		
	$(7,55 \pm 0,08) \times 10^3$	3 ± 3	0,9992		
14 mm	$(6,4 \pm 0,2) \times 10^2$	-11 ± 12	0,9993	$(7 \pm 1) \times 10^2$	5,8
	$(7,0 \pm 0,2) \times 10^2$	-11 ± 12	0,9995		
	$(6,4 \pm 0,1) \times 10^2$	-8 ± 9	0,9996		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

En las **Tablas 21** y **22** se recogen las pendientes promedio y los valores de RSD calculados para el calibrado unipuntual a cada concentración de patrón de etanol, trabajando con las distintas unidades muestreadoras.

Tabla 21. Pendientes promedio y valores de desviación estándar relativa obtenidos correspondientes a las intensidades de pico registradas para cada concentración de la Figura 38a.

Patrón	Pendiente _{promedio} , nA % ⁻¹	RSD _(n=3) , %	t _{exp} (1)	t _{exp} (2)
0,02 % (v/v)	$(8,1 \pm 0,2) \times 10^3$	1,2	3,292	2,452
	$(7,5 \pm 0,4) \times 10^3$	2,1	4,054	0,069
	$(7,9 \pm 0,4) \times 10^3$	1,9	4,083	1,667
0,04 % (v/v)	$(8,0 \pm 0,2) \times 10^3$	1,1	3,977	2,346
	$(7,17 \pm 0,07) \times 10^3$	0,4	2,603	1,594
	$(7,7 \pm 0,2) \times 10^3$	0,9	2,754	0,588
0,06 % (v/v)	$(7,9 \pm 0,1) \times 10^3$	0,6	0,264	1,622
	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^3$	1,4	0,532	1,593
	$(7,56 \pm 0,05) \times 10^3$	0,3	0,786	0,162

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 22. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y valores de desviación estándar relativa determinados en el cálculo de las pendientes promedio correspondientes a los calibrados de la Figura 38b.

Patrón	Pendiente _{promedio} , nA % ⁻¹	RSD _(n=3) , %	t _{exp} (1)	t _{exp} (2)
0,4 % (v/v)	$(6,0 \pm 0,5) \times 10^2$	3,6	3,431	2,488
	$(6,4 \pm 0,6) \times 10^2$	4,0	4,263	0,702
	$(5,9 \pm 0,7) \times 10^2$	4,7	2,905	2,556
0,8 % (v/v)	$(6,3 \pm 0,1) \times 10^2$	0,7	4,275	1,406
	$(6,8 \pm 0,6) \times 10^2$	3,4	1,600	0,875
	$(6,2 \pm 0,4) \times 10^2$	2,8	1,558	1,613
1,2 % (v/v)	$(6,3 \pm 0,2) \times 10^2$	1,6	0,892	1,140
	$(7,0 \pm 0,7) \times 10^2$	3,9	0,244	1,493
	$(6,4 \pm 0,1) \times 10^2$	1,0	0,464	1,119

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Leyenda para las Tablas 21 y 22:

(1): valor experimental del estadístico t a un nivel de significación del 0,05 para la comparación de la pendiente promedio obtenida para cada concentración con la pendiente del calibrado de cuatro puntos al que pertenece.

(2): valor experimental del estadístico t a un nivel de significación del 0,05 para la comparación de la pendiente promedio obtenida para cada concentración con la pendiente promedio calculada para cada unidad muestreadora.

Como se puede apreciar en las Tablas 21 y 22, se ha llevado a cabo una comparación estadística entre los valores de la pendiente de los diferentes calibrados unipuntuales, que consideran un punto experimental y el punto (0,0) para la construcción de la recta de calibrado, y las pendientes de los calibrados de cuatro puntos. También se ha llevado a cabo la comparación entre los promedios de las pendientes para cada unidad muestreadora. Los valores de la t de Student experimentales se recogen en las Tablas 21 y 22 para los resultados obtenidos con el muestreador de 20 mm y de 14 mm, respectivamente. Como se puede observar, en todos los casos se ha obtenido un valor de $t_{\text{experimental}}$ inferior al valor t_{tabulada} (2 grados de libertad, $p = 0,05$) = 4,303, indicando que no existen diferencias significativas entre la determinación del valor de la pendiente a través de la medida de un solo patrón o el empleo de cuatro puntos de calibrado.

Para la comparación del valor de la pendiente promedio del calibrado unipuntual obtenido a cada concentración con el valor medio de la pendiente obtenido a partir de los calibrados de cuatro puntos se ha empleado el contraste t para dos medias experimentales, de modo que, como se puede observar en los datos de las Tablas 21 y 22, se ha obtenido de nuevo en todos los casos un valor de $t_{\text{experimental}}$ inferior al valor crítico t_{tabulada} (4 grados de libertad, $p = 0,05$) = 2,776. Por lo tanto, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre la pendiente del calibrado calculada a partir de la medida de un solo patrón de etanol, o mediante el empleo de más puntos en el calibrado. Además, estos resultados ponen de manifiesto la buena reproducibilidad de los calibrados obtenidos empleando el bioanalizador FIA con ambas unidades muestreadoras.

Por último, la estabilidad del biosensor con el tiempo, trabajando en las condiciones seleccionadas, se evaluó registrando medidas diarias de intensidad de corriente, con el sistema FIA, inyectando 500 μL de disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v). El biosensor se almacenó durante este estudio en humedad a 4°C. En la **Figura 39** se muestra el gráfico de control construido para un biosensor Fc-AOD-HRP-AuE tomando como valor central la media de 4 medidas sucesivas de patrón de etanol, obtenidas el primer día de trabajo del biosensor, y como valor de los límites superior e inferior de control la media $\pm 3s$ (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

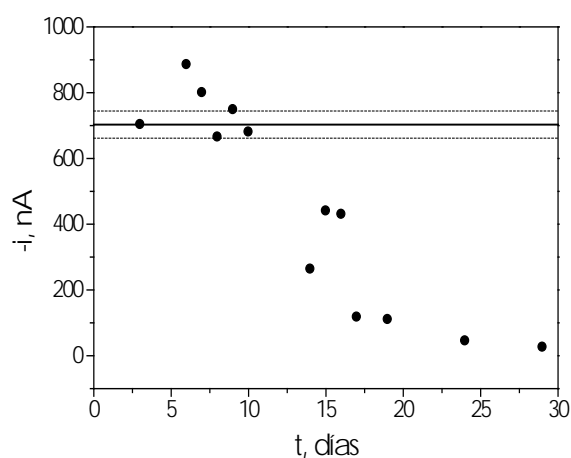


Figura 39. Gráfico de control para evaluar la estabilidad de un biosensor Fc-AOD-HRP-AuE. Intensidades de corriente correspondientes a disolución patrón de etanol de 0,04 % (v/v). Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Volumen de bucle: 500 μL . Caudal de trabajo: 1,0 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Como se puede observar, el biosensor va perdiendo señal de manera progresiva con los días de uso, encontrándose que aproximadamente a los 15 días de vida el biosensor ya no era capaz de detectar etanol en cervezas con un contenido inferior al 0,003 % (v/v). Además, se observó una disminución de la relación señal/ruido, que hacía prácticamente inutilizable el biosensor como detector en el sistema FIA. Este estudio se repitió cuatro veces, concluyéndose que el biosensor era útil durante un periodo promedio de 13 ± 1 días. Es necesario indicar, que aunque la pérdida de sensibilidad del biosensor es acusada desde los primeros días, éste tiene la suficiente sensibilidad como para poder detectar

durante esos 13 días el contenido de etanol por debajo de 0,04 % que es el límite máximo permitido para las cervezas "0,0". Esto es posible porque el análisis de cerveza se lleva a cabo siempre previa calibración realizada normalmente al principio de la jornada de trabajo.

3.3.1.1.2.3. Curvas de calibrado y características analíticas

Se construyeron las curvas de calibrado para el sistema FIA desarrollado en las condiciones experimentales optimizadas, en función del diámetro de la superficie de contacto entre la disolución dadora y la aceptora. Trabajando con la unidad muestreadora de 20 mm los calibrados se construyeron a niveles de concentración de etanol en el intervalo comprendido entre $5,0 \times 10^{-4}$ y 0,20 % (v/v) (Figura 40a), y en el caso de la unidad de 14 mm este intervalo fue de entre $8,0 \times 10^{-3}$ y 2,0 % (v/v) (Figura 40b).

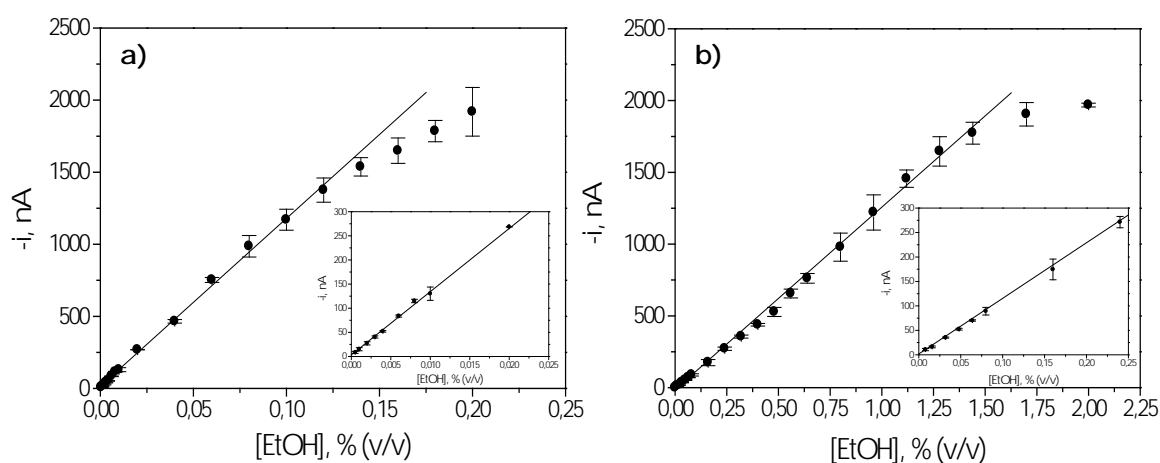


Figura 40. Curvas de calibrado obtenidas a partir de los registros intensidad-tiempo para inyecciones de disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes. Unidad doble de muestreo de 20 mm (a) y 14 mm (b) de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Volumen de bucle: $500 \mu\text{L}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Para establecer el intervalo lineal de los calibrados y estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado como criterios los indicados

anteriormente en el Apartado 3.3.1.1.3. En la **Tabla 23** se muestran las características analíticas determinadas a partir de las intensidades de corriente de las señales medidas en los correspondientes diagramas.

Tabla 23. Intervalos de linealidad, pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 40.

Muestreador	Intervalo de linealidad, %	Pendiente, nA % ⁻¹	O.o, nA	r	LD, %	LC, %
20 mm	$(6,800 - 1200) \times 10^{-4}$	$(1,17 \pm 0,01) \times 10^4$	5 ± 10	0,9990	$2,0 \times 10^{-4}$	$6,8 \times 10^{-4}$
14 mm	$(6,200 - 1280) \times 10^{-3}$	$(1,28 \pm 0,02) \times 10^3$	2 ± 5	0,9990	$1,9 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-3}$

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Del mismo modo que se concluyó para el sistema de flujo en continuo, en función de las características analíticas obtenidas y la magnitud de las señales amperométricas registradas, se consideró adecuado el uso del bioanalizador FIA manual con la unidad muestreadora de 20 mm de diámetro para el análisis de cervezas "0,0" y el dispositivo de 14 mm para el análisis de cervezas "Sin". Indicar nuevamente que, teniendo en cuenta los parámetros de las curvas de calibrado, se puede emplear la calibración unipuntual para la monitorización de etanol en cervezas empleando el sistema FIA desarrollado.

3.3.1.1.2.4. Análisis de muestras de cerveza

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en el análisis de diferentes muestras de cerveza comerciales empleando el sistema de análisis por inyección en flujo con detección amperométrica desarrollado, basado en el empleo de un biosensor enzimático de alcohol de acero inoxidable con capa de oro depositada por "sputtering". Todas las muestras fueron analizadas a 4°C y desgasificadas mediante agitación con varilla de vidrio antes de ser inyectadas.

Para la determinación de etanol en cada muestra, al igual que con el sistema de análisis en flujo continuo, se realizó un calibrado unipuntual con la disolución

patrón de etanol de concentración adecuada en función del tipo de cerveza a analizar, siendo de 0,04 % (v/v) para el análisis de cerveza "0,0" y 0,8 % (v/v) para el análisis de cerveza "Sin". En la **Tabla 24** se recogen los valores de concentración para cada tipo de cerveza obtenidos empleando el bioanalizador FIA y el método amperométrico en discontinuo propuesto por InBea (Manual "Bioanalizador de grado alcohólico en cervezas") ya validado para la determinación del grado alcohólico en cervezas, y que emplea el mismo biosensor de etanol como electrodo de trabajo.

Tabla 24. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de etanol en muestras de cerveza con bajo contenido alcohólico empleando el bioanalizador FIA manual con la unidad muestreadora de 20 mm para la cerveza "0,0" y de 14 mm para la cerveza "Sin" y el método validado de InBea Biosensores S.L.

Método	Bioanalizador FIA	InBea	t_{exp}
Muestra	[EtOH] Promedio % (v/v)	[EtOH] Promedio % (v/v)	
Cerveza "0,0"-1	0,0030 ± 0,0002 (RSD $n=5$ = 4,4 %)	0,0028 ± 0,0003 (RSD $n=5$ = 7,8 %)	1,015
Cerveza "0,0"-2	0,0024 ± 0,0003 (RSD $n=5$ = 10,2 %)	0,0024 ± 0,0002 (RSD $n=5$ = 6,1 %)	
Cerveza "Sin"	0,83 ± 0,07 (RSD $n=5$ = 7,2 %)	0,81 ± 0,07 (RSD $n=5$ = 7,2 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Para la validación de los resultados se han comparado de nuevo los valores obtenidos por cada método aplicando el criterio de la t de Student para datos emparejados. Teniendo en cuenta que el valor crítico tabulado $t_{tab}(2$ grados de libertad, $p = 0,05) = 4,303$ es superior al valor de $t_{experimental}$ calculada (Tabla 24), se deduce que no existen diferencias significativas entre los valores de etanol obtenidos con el bioanalizador FIA desarrollado y el método validado de InBea.

3.3.1.2. Bioanalizador de ácido L-málico en vinos: diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual

Con el objetivo final de desarrollar un bioanalizador FIA con detección amperométrica para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino, previamente se llevó a cabo el diseño, desarrollo y optimización de un nuevo biosensor adecuado para la detección de este analito en dicha matriz. Posteriormente se determinaron las características analíticas del método con el prototipo manual del bioanalizador, y se evaluaron sus características operacionales y aplicabilidad real para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino.

3.3.1.2.1. Optimización de las variables experimentales

Todos los estudios relacionados con la fabricación y funcionamiento del biosensor de ácido L-málico se llevaron a cabo mediante amperometría a potencial constante en disoluciones agitadas, empleando ácido L-málico como sustrato.

3.3.1.2.1.1. Desarrollo del biosensor de ácido L-málico

El biosensor bienzimático de ácido L-málico se basa en el empleo de una superficie electródica de capa fina de oro sobre un electrodo de acero inoxidable depositada mediante la técnica de "sputtering" (ver Figura 33 del Apartado 3.3.1.2.1.1) siguiendo la metodología descrita en el Apartado 3.2.3.2, que emplea el sistema malato deshidrogenasa (MDH)/diaforasa (DP)/tetratiafulvaleno (TTF) para determinar la concentración de ácido málico a través de la secuencia de reacciones que se muestra en la **Figura 41**. El ácido málico es oxidado a oxalacetato en una reacción catalizada por la MDH, y el NAD^+ (forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido) se reduce a NADH, siendo éste re-oxidado por el TTF^+ en la reacción catalizada por la DP. La diaforasa es una enzima NADH-aceptor oxidorreductasa, cuya función es oxidar el NADH generado que queda adsorbido en la superficie del electrodo, con el fin de evitar la pérdida de actividad enzimática

por parte de la enzima deshidrogenasa [Limoges, 2006]. La reacción electroquímica que se utiliza para monitorizar la secuencia de reacciones implicadas en el biosensor de ácido málico es la debida a la oxidación amperométrica de la forma reducida del TTF.

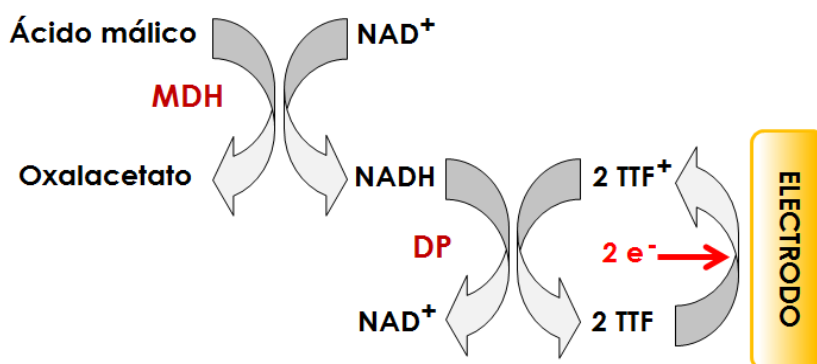


Figura 41. Secuencia de reacciones enzimática y electroquímica implicadas en la detección de ácido málico empleando el biosensor enzimático amperométrico TTF-MDH-DP-AuE.

3.3.1.2.1.1. Composición del biosensor y condiciones de trabajo

Con objeto de obtener un desarrollo con un funcionamiento adecuado para el análisis de ácido L-málico en vinos, se ha llevado a cabo la optimización de la composición del biosensor y de las diferentes variables experimentales que afectan a la medida.

Con respecto a la composición del biosensor, en primer lugar se estudió la cantidad de DP y MDH a inmovilizar sobre la superficie del electrodo. Para ello, se prepararon biosensores de TTF-MDH-DP-AuE empleando diferentes configuraciones en cuanto a las unidades de DP y de MDH (desde 1,5 a 2,5 U para la DP y desde 4 a 12 U para la MDH) y como mediador redox se estableció el uso del TTF, siendo la cantidad depositada de éste (1,5 μmol) la misma que la empleada en otros desarrollos del Grupo de Investigación que utilizan deshidrogenasas en su fabricación [Campuzano, 2003] [Gamella, 2008] [Vargas, 2013]. Se estudió la variación de las intensidades de corriente en estado estacionario registradas tras la adición de 50 μL de ácido málico 0,8 g L⁻¹ a la célula de medida que contenía 20 mL

de tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} , aplicando un potencial de $+0,10 \text{ V}$. En la **Figura 42** se muestran los resultados obtenidos.

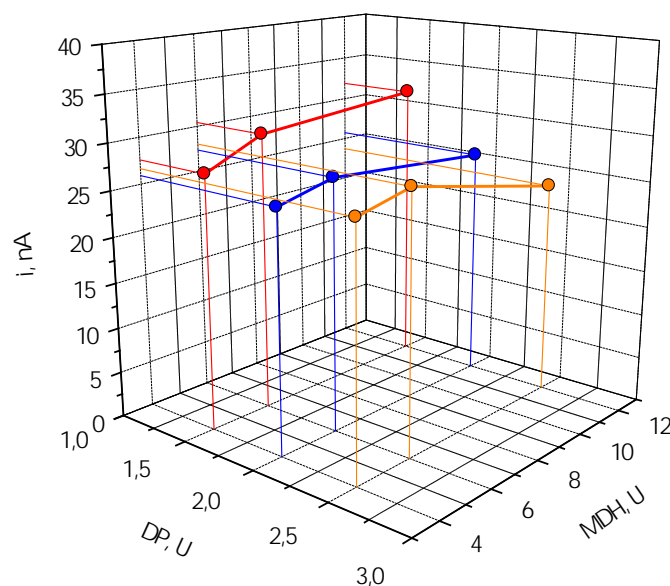


Figura 42. Intensidades de corriente obtenidas con biosensores de TTF-MDH-DP-AuE que contienen \bullet 1,5 U de DP y 4, 6 y 12 U de MDH, \bullet 2,0 U de DP y 4, 6 y 12 U de MDH y \bullet 2,5 U de DP y 4, 6 y 12 U de MDH para una concentración de ácido L-málico de $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. Medio de trabajo: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,10 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Como se puede observar, los mejores resultados se obtuvieron para los biosensores en los que se depositaron 1,5 U de DP, siendo los peores resultados los obtenidos para la configuración que empleó la mayor cantidad de DP y MDH. Esto puede ser debido a que, al ir aumentando la cantidad de enzima depositada, el rendimiento con que se da la transferencia electrónica se vea disminuido por un posible bloqueo de la superficie electrodo. Considerando como valor óptimo de DP 1,5 U, y teniendo en cuenta el pequeño aumento de señal observado al emplear 12 U de MDH en comparación con la obtenida para 6 U de MDH, se seleccionaron 6 U de MDH para la preparación de los biosensores con el fin de evitar el encarecimiento del sensor, dado el elevado precio de esta enzima.

En lo relativo al mediador redox, se llevó a cabo el estudio empleando dos mediadores ampliamente utilizados en el Grupo de Investigación para el desarrollo de biosensores enzimáticos [Campuzano, 2004] [Guzmán-Vázquez de Prada, 2003]

[Guzmán-Vázquez de Prada, 2004] [Gamella, 2008] [Gamella, 2010^A], que son el TTF y el ferroceno (Fc). Para este estudio se preparó un biosensor de composición 1,5 U de DP, 6 U de MDH y 1,5 μmol de Fc y se registró la intensidad de corriente en estado estacionario para una concentración de ácido málico $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, en tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,0, en presencia de NAD^+ 1 mmol L^{-1} aplicando un potencial de +0,10 V. En este caso se obtuvo una intensidad de corriente aproximadamente la mitad que en el caso de utilizar TTF como mediador. A la vista de los resultados, se seleccionó como composición para la preparación del biosensor de ácido L-málico DP(1,5 U)/MDH(6 U)/TTF(1,5 μmol).

La elección del potencial aplicado al biosensor de ácido L-málico se efectuó teniendo en cuenta la medida de la intensidad de corriente en estado estacionario a diferentes valores del potencial aplicado en el intervalo comprendido entre 0,0 y +0,25 V, obtenida para una concentración de ácido L-málico de $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (**Figura 43a**). Como se puede ver en el gráfico, se obtiene un máximo para un valor de potencial de +0,15 V. El descenso de la señal amperométrica a potenciales superiores a +0,15 V es similar al comportamiento observado con biosensores desarrollados por el Grupo de Investigación, que emplean TTF como mediador [Campuzano, 2005] [Campuzano, 2007] [Gamella, 2008] [Vargas, 2013] y puede ser atribuido a que a potenciales más positivos se produce la oxidación irreversible del TTF^+ a TTF^{2+} , que es soluble en disolución acuosa.

Una vez seleccionado el potencial de trabajo, se llevó a cabo el estudio de la influencia del pH de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ sobre la intensidad de corriente en estado estacionario a un nivel de concentración de ácido L-málico de $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ en el intervalo de pH comprendido entre 5 y 12. Como puede observarse en la **Figura 43b**, se obtuvo una respuesta amperométrica máxima a un valor de pH de 8,0, por lo que se seleccionó este valor como pH de trabajo para estudios posteriores.

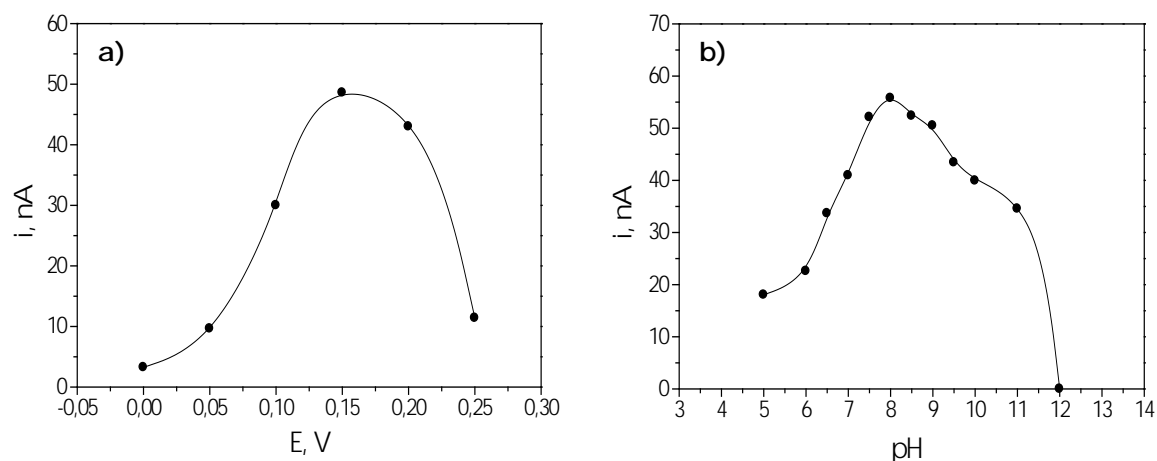


Figura 43. Variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario obtenida para una concentración de ácido L-málico de 2×10^{-3} g L $^{-1}$, medida en tampón fosfato 0,05 mol L $^{-1}$ que contiene 1 mmol L $^{-1}$ de NAD $^{+}$, con el potencial aplicado (pH 7,0) (a) y con el pH de la disolución de trabajo ($E_{ap} = +0,15$ V vs. Ag/AgCl) (b).

Por último, para terminar de definir las condiciones de trabajo del biosensor de ácido L-málico desarrollado, se estudió la influencia de la concentración del cofactor NAD $^{+}$ incorporado a la disolución reguladora. Los experimentos se llevaron a cabo en el rango de concentraciones comprendido entre 0,05 y 5 mmol L $^{-1}$ de NAD $^{+}$, para una concentración de ácido L-málico de 2×10^{-3} g L $^{-1}$ (Figura 44).

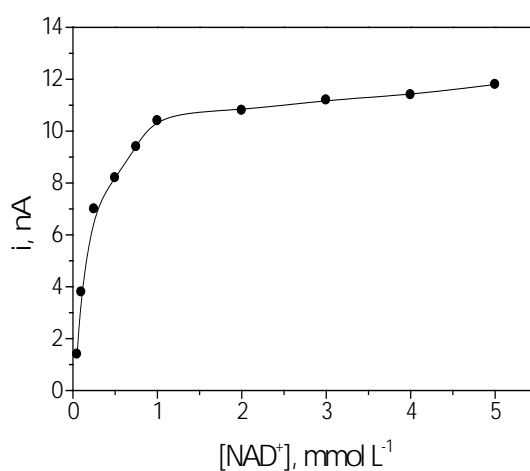


Figura 44. Variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario para el biosensor TTF-MDH-DP-AuE con la concentración de NAD $^{+}$ incorporada al tampón fosfato 0,05 mol L $^{-1}$ de pH 8,0 para una concentración de ácido L-málico de 2×10^{-3} g L $^{-1}$. $E_{ap} = +0,15$ V vs. Ag/AgCl.

Como se puede observar en la Figura 44, se obtuvo un aumento de la intensidad de corriente con la concentración de NAD^+ hasta 1 mmol L^{-1} , no encontrándose una mejora significativa en la señal amperométrica para concentraciones superiores. Teniendo en cuenta que un empleo de cantidades más altas supondría un encarecimiento considerable de las medidas, se seleccionó el valor de 1 mmol L^{-1} de NAD^+ para la composición del medio de trabajo.

3.3.1.2.1.2. Estudios de estabilidad

En este apartado se han evaluado diferentes aspectos relacionados con la estabilidad del biosensor desarrollado: repetitividad de las señales amperométricas para un mismo biosensor, reproducibilidad de las medidas obtenidas con diferentes electrodos preparados de la misma manera y la estabilidad del electrodo con el tiempo.

Para estudiar la repetitividad de las señales amperométricas se realizaron 10 medidas repetidas para disoluciones diferentes de ácido málico a un nivel de concentración de $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (Figura 45). Se obtuvo un valor de desviación estándar relativa (RSD) de 5,2 % lo que refleja la buena estabilidad de las medidas analíticas obtenidas con el biosensor.

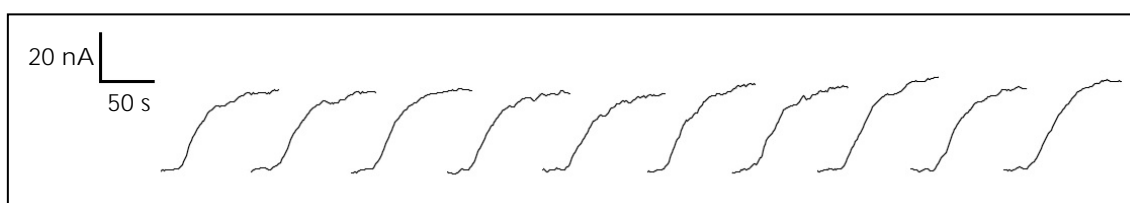


Figura 45. Señales de intensidades de corriente registradas con el biosensor de TTF-MDH-DP-AuE en disoluciones agitadas para una concentración de ácido L-málico de $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. Medio de trabajo: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

La evaluación de la reproducibilidad en la fabricación de los biosensores se ha llevado a cabo comparando los valores de las pendientes de calibrados de ácido málico, realizados en el intervalo de concentración comprendido entre $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ y

$4 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, obtenidos con cinco biosensores diferentes. El valor obtenido para la desviación estándar relativa, incluido en la **Tabla 25**, es indicativo de una fabricación muy reproducible. Sin embargo, esta variable no es concluyente ya que antes de proceder a la determinación de ácido málico en la muestra es necesario realizar un calibrado, por lo que la falta de reproducibilidad en la fabricación del biosensor no será un factor determinante si la señal analítica obtenida con cada biosensor es adecuada para la medida del contenido de este analito en la muestra.

Tabla 25. Pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación correspondientes a calibrados realizados con 5 biosensores de ácido L-málico diferentes.

Pendiente, nA g ⁻¹ L	O.o, nA	r	Pendiente _{promedio} , nA g ⁻¹ L	RSD, %
$(1,60 \pm 0,05) \times 10^4$	-1 ± 1	0,9995		
$(1,70 \pm 0,04) \times 10^4$	0 ± 1	0,9997		
$(1,52 \pm 0,03) \times 10^4$	$-0,4 \pm 0,8$	0,9998	$(1,62 \pm 0,09) \times 10^4$	4,3
$(1,60 \pm 0,06) \times 10^4$	-1 ± 2	0,9992		
$(1,70 \pm 0,04) \times 10^4$	-1 ± 1	0,9995		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Por último, se estudió el tiempo de vida útil del biosensor de ácido málico desarrollado considerándose que éste es el tiempo durante el que proporciona medidas de exactitud y precisión aceptables en el análisis de diferentes muestras. Este estudio se ha llevado a cabo realizando medidas de intensidad de corriente en estado estacionario en disoluciones agitadas de tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} para una concentración de ácido L-málico de $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, aplicando un potencial de $+0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Durante este estudio el biosensor ha sido almacenado en disolución reguladora fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,0 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. En la **Figura 46** se muestra el gráfico de control construido tomando como valor central la media de 5 medidas sucesivas de patrón de ácido L-málico, obtenidos el primer día de trabajo del biosensor, y como valor de los límites superior e inferior de

control la media $\pm 3s$ (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

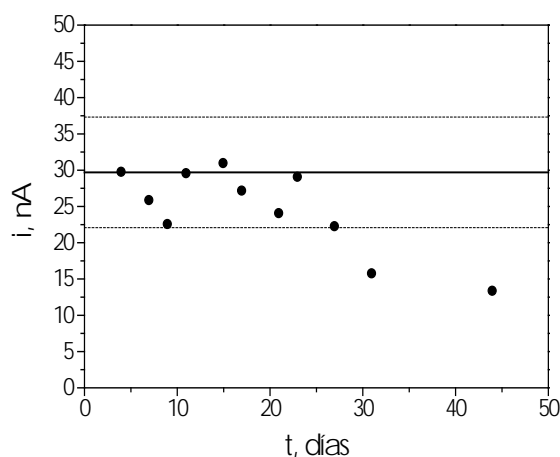


Figura 46. Estabilidad del biosensor de TTF-MDH-DP-AuE. Intensidades de corriente registradas durante 44 días para un mismo biosensor de ácido málico.

Como se puede observar, la señal del biosensor está por debajo del límite inferior claramente a partir del día 30, en el que se aprecia una disminución de hasta un 45 % con respecto a la del primer día. El biosensor de ácido málico se mantiene operativo durante unos 25 días, tiempo de vida promediado para los cinco biosensores empleados en este estudio. Durante dicho estudio, se analizaron alrededor de 45 muestras con cada uno de los biosensores utilizados.

3.3.1.2.1.3. Curvas de calibrado y características analíticas

Empleando las condiciones experimentales indicadas anteriormente y trabajando mediante amperometría en disoluciones agitadas, se obtuvieron las curvas de calibrado para el ácido málico en el intervalo de concentraciones comprendido entre $1,3 \times 10^{-4}$ y $6,7 \times 10^{-3}$ g L⁻¹. En la **Figura 47** se ha representado la dependencia de la intensidad de corriente obtenida en el estado estacionario con la concentración de ácido málico.

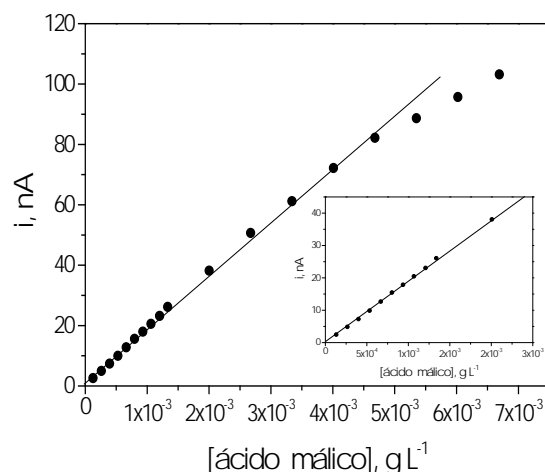


Figura 47. Curva de calibrado obtenida con un biosensor de ácido málico trabajando en disoluciones agitadas de tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Como criterios para establecer el intervalo lineal y el cálculo de los límites de detección y de cuantificación se han tomado los indicados anteriormente en el Apartado 3.3.1.1.3. Las características analíticas obtenidas para el biosensor de ácido L-málico desarrollado se recogen en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Intervalo de linealidad, pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a la curva de calibrado de la Figura 47.

Intervalo lineal, g L^{-1}	Pendiente, $\text{nA g}^{-1} \text{ L}$	O.o, nA	r	LD, g L^{-1}	LC, g L^{-1}
$(9,80 - 470) \times 10^{-5}$	$(1,78 \pm 0,02) \times 10^4$	1 ± 1	0,9991	$2,9 \times 10^{-5}$	$9,8 \times 10^{-5}$

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Si se comparan las características de la Tabla 26 con las de otros biosensores enzimáticos amperométricos encontrados en la bibliografía (Tabla 5 del Apartado 3.1.5.1), se puede observar que se han obtenido una mayor sensibilidad y un límite de detección más bajo para el biosensor TTF-MDH-DP-AuE frente a otros desarrollos reportados en la literatura ([Arif, 2004], [Arvinte, 2008^A], [Arvinte, 2009], [Bucur, 2006], [Gamella, 2010^A], [Gooding, 2000], [Gurban, 2006], [Lupu, 2004], [Maines, 2000], [Manzoli, 2004], [Mazzei, 2007], [Monosik, 2012^B], [Ruhai, 2012]).

3.3.1.2.1.4. Estudio de interferencias

Para verificar la selectividad del biosensor desarrollado, se evaluó el efecto de la presencia de sustancias que están normalmente presentes en los vinos sobre la respuesta amperométrica del ácido L-málico, trabajando en disoluciones agitadas en las condiciones experimentales establecidas para la determinación de esta especie. Para el estudio, se han considerado como interferentes potenciales los compuestos que se muestran en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Concentraciones máximas de las principales especies presentes en la composición del vino.

Tipo de compuesto	Especie	Concentración máxima	Referencia
Alcohol	Etanol	14 % (v/v)	[p. web 12]
	Glicerol	15 g L ⁻¹	
Azúcar	Glucosa	0,95 g L ⁻¹	[p. web 13]
	Fructosa	0,84 g L ⁻¹	
	Arabinosa	0,3 g L ⁻¹	
	Galactosa	0,13 g L ⁻¹	
Ácido orgánico	Ácido cítrico	1 g L ⁻¹	[p. web 14]
	Ácido tartárico	11,5 g L ⁻¹	
	Ácido glucónico	3 g L ⁻¹	[Peinado, 2003]
	Ácido láctico	4,2 g L ⁻¹	[p. web 13]
	Ácido acético	0,9 g L ⁻¹	
	Ácido ascórbico	15 mg L ⁻¹	[Ough, 1996]
Compuesto nitrogenado	Glutamina	2 g L ⁻¹	[p. web 12]

Para la monitorización de las señales amperométricas se ha tenido en cuenta un contenido máximo en muestra de la especie a evaluar y la concentración mínima de ácido L-málico que se puede encontrar en vinos (0,16 g L⁻¹ [p. web 13]), con lo que el volumen de vino a adicionar en una célula de 20 mL sería de unos 250 µL. Este volumen de muestra supondría una concentración del posible interferente del orden que se muestra en el pie de la **Figura 48**, siendo esos los valores estudiados.

Así, en la siguiente figura, se muestran los registros intensidad-tiempo obtenidos tras adicionar 250 μL de una disolución patrón de ácido L-málico $0,16 \text{ g L}^{-1}$ y de disoluciones patrón de concentración máxima (Tabla 27) de los interferentes estudiados a la célula de medida con 20 mL de la disolución de trabajo. Como se puede observar, ninguno de los compuestos ensayados como interferentes potenciales dio señal amperométrica en el nivel de concentración monitorizado, lo que permite considerar libre de interferencias la determinación de la concentración de ácido málico en muestras de vino.

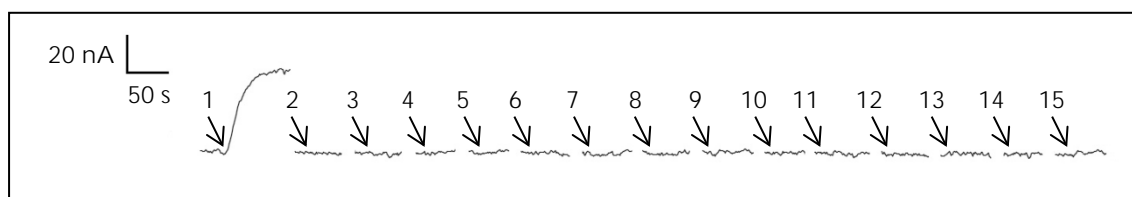


Figura 48. Respuestas amperométricas medidas para: ácido L-málico $2 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (1), D-glucosa $1,2 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (2), D-fructosa $1,05 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (3), L-arabinosa $3,80 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (4), D-galactosa $1,60 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (5), etanol 0,175 % (v/v) (6), glicerol $0,188 \text{ g L}^{-1}$ (7), ácido cítrico $1,25 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (8), ácido glucónico $3,755 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (9), ácido tartárico $0,144 \text{ g L}^{-1}$ (10), ácido D-láctico $5,25 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (11), ácido L-láctico $5,25 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (12), ácido acético $1,12 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (13), glutamina $2,50 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ (14), ácido ascórbico $1,88 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ (15). Tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl.

3.3.1.2.1.1.5. Análisis de muestras de vino en discontinuo

Con objeto de comprobar la aplicabilidad del biosensor desarrollado para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino y validar el método, se llevó a cabo la determinación de este analito en materiales de referencia certificados mediante amperometría en disoluciones agitadas. En primer lugar se realizó un calibrado para el intervalo de concentración comprendido entre $2,0 \times 10^{-3}$ y $4,0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ para ácido L-málico realizando adiciones de una disolución patrón de concentración adecuada preparada en la disolución reguladora fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 a una célula con 20 mL de la disolución de trabajo. Las muestras se prepararon por simple dilución del material de referencia certificado (dilución 1:10 para la referencia 4, y 1:5 para las referencias 1 y 2) en la disolución tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0, para adecuar la concentración de ácido málico al intervalo de medida de las curvas

de calibrado. A partir de estas disoluciones se llevó a cabo la adición del volumen adecuado a la célula de medida. La representación de la intensidad de corriente registrada en el estado estacionario frente a la concentración permite construir la curva de calibrado donde se interpolan las intensidades medidas para las muestras. Los resultados obtenidos en las determinaciones se recogen en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de ácido L-málico en materiales de referencia certificados del Centre Œnologique de Bourgogne (Lote 2009) con el biosensor de ácido málico desarrollado trabajando en amperometría en disoluciones agitadas.

Material de referencia	[ácido L-málico], g L ⁻¹	[ácido L-málico] Promedio, g L ⁻¹	t _{exp}
Vino tinto Referencia 1 [ácido L-málico]: (1,5 ± 0,2) g L ⁻¹	1,40	1,48 ± 0,08 (RSD _{n=5} = 4,5 %)	0,667
	1,55		
	1,45		
	1,55		
	1,45		
Vino blanco Referencia 2 [ácido L-málico]: (1,02 ± 0,07) g L ⁻¹	1,020	1,07 ± 0,05 (RSD _{n=5} = 3,8 %)	2,749
	1,078		
	1,131		
	1,063		
	1,053		
Vino rosado Referencia 4 [ácido L-málico]: (5,6 ± 0,6) g L ⁻¹	5,259	5,4 ± 0,3 (RSD _{n=5} = 3,9 %)	2,121
	5,709		
	5,428		
	5,254		
	5,186		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Para evaluar la exactitud del método se han comparado las medias experimentales obtenidas con los valores de referencia de cada vino analizado a través del cálculo del estadístico *t* para contrastes de significación, cuyos valores de *t*_{experimental} determinados se incluyen en la Tabla 28. En todos los casos se ha obtenido un valor de *t*_{exp} inferior al valor crítico *t*_{tab}(4 grados de libertad, *p* = 0,05) = 2,776, indicativo de que no existen diferencias significativas entre los valores determinados con el biosensor de ácido L-málico y los valores de referencia y, por lo tanto, el método no está sujeto a errores sistemáticos. Además, puede

observarse que los valores de RSD obtenidos en las determinaciones son inferiores al 5 %, lo que demuestra la buena reproducibilidad de las medidas realizadas con el biosensor desarrollado.

A la vista de la precisión y la exactitud obtenidas con este biosensor, se puede afirmar que el método propuesto es adecuado para llevar a cabo la determinación de ácido L-málico en muestras de vino, lo cual era el objetivo planteado al abordar dicho desarrollo.

3.3.1.2.1.2. Diseño y desarrollo de un sistema FIA semiautomático

Una vez desarrollado el biosensor de ácido L-málico, se procedió a implementarlo como detector amperométrico en un sistema FIA. El sistema de flujo que se propuso necesitaba el empleo de una válvula manual de inyección para la introducción de patrones y muestras. En el caso de este bioanalizador manual no se integró ningún componente o dispositivo que efectuara una dilución de las muestras antes de que éstas llegaran al detector, por lo que el diseño para este analito consistió en un sistema FIA básico, en contraste con el desarrollo llevado a cabo para la monitorización de alcohol en cerveza (Figura 31 del Apartado 3.3.1.1.2). El esquema se muestra en la **Figura 49**. Dicho sistema consta de una bomba peristáltica, una válvula manual de inyección y la célula de flujo wall-jet de gran volumen, con los electrodos conectados a un detector amperométrico.

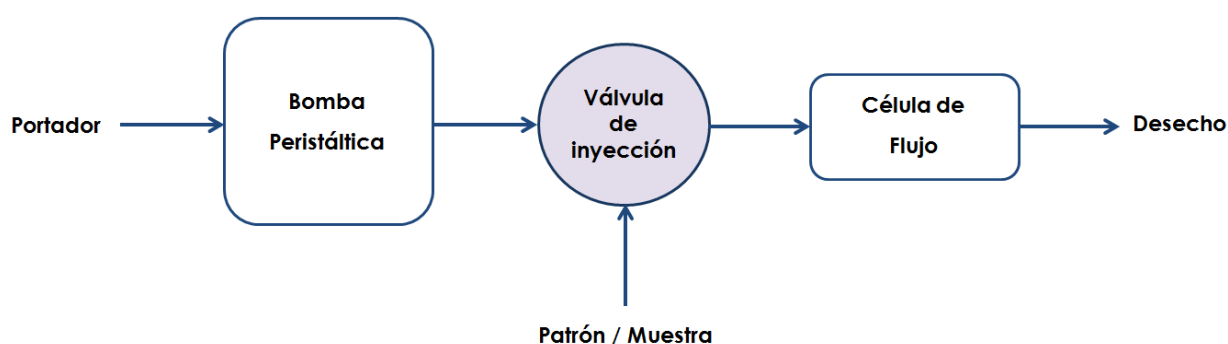


Figura 49. Esquema del sistema FIA para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino.

3.3.1.2.1.2.1. Estudio de las variables hidrodinámicas: caudal y volumen de inyección

Se estudió la influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de corriente y la anchura del pico, con el objetivo de evaluar tanto la sensibilidad como la frecuencia de muestreo proporcionadas por el bioanalizador FIA, dependiendo de las condiciones hidrodinámicas del sistema.

Para realizar este estudio se han registrado las señales amperométricas tras realizar inyecciones de 500 μL de una disolución patrón de ácido L-málico de concentración 0,08 g L^{-1} trabajando a diferentes caudales. Los resultados se muestran en la **Figura 50**. De entre los caudales ensayados, se escogió el máximo permitido por la bomba peristáltica empleada en el sistema FIA desarrollado que era de 3,0 mL min^{-1} , ya que, como se puede observar en la representación del tiempo de registro de pico (tiempo que comprende desde el inicio de la aparición del pico hasta que se vuelve a alcanzar la línea base) a cada caudal, se encontró que para caudales inferiores los picos tardaban demasiado tiempo en salir tras la inyección del patrón (del orden de 6 y 8 minutos para 1,0 y 0,5 mL min^{-1} , respectivamente, frente a los 3,5 minutos trabajando a 3,0 mL min^{-1}) a pesar de tener menos sensibilidad a ese caudal.

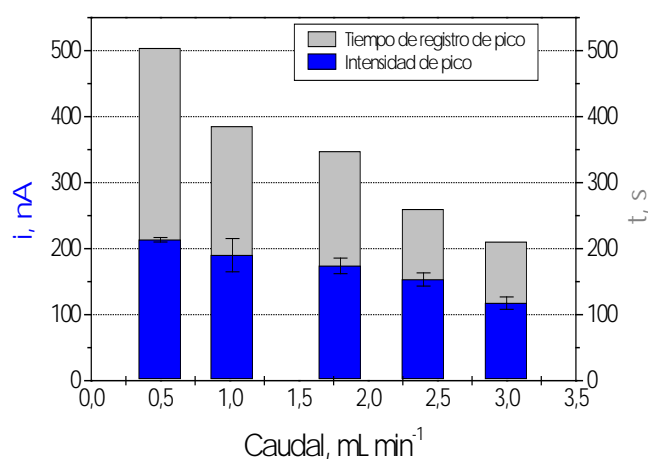


Figura 50. Intensidades de corriente (■) y tiempos de registro de pico (■) obtenidos con un biosensor TTF-MDH-DP-AuE al inyectar 500 μL de disolución patrón de ácido L-málico de concentración 0,08 g L^{-1} trabajando a diferentes caudales para el portador. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Con respecto al volumen de inyección, segundo parámetro característico del sistema FIA, se probó a trabajar con un bucle de menor volumen (100 μL) y a un caudal de 3,0 mL min^{-1} , obteniéndose de manera previsible como se puede ver en la **Figura 51**, que al introducir menos cantidad de sustrato para la enzima, los picos FIA tienen menor intensidad de corriente que los obtenidos con el bucle de 500 μL . Además se observó un ensanchamiento de los mismos, por lo que, al proporcionar una frecuencia de muestreo menor, se decidió continuar empleando un volumen de inyección de 500 μL .

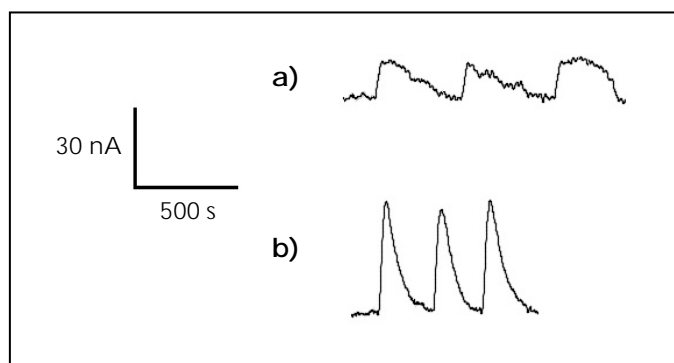


Figura 51. Diagramas registrados al inyectar 100 μL (**a**) y 500 μL (**b**) de disolución patrón de ácido L-málico de concentración $4 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Caudal de trabajo: 3,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

3.3.1.2.2. Estudios de estabilidad

En este apartado se ha estudiado el tiempo de vida del biosensor de ácido L-málico desarrollado empleándolo como detector del bioanalizador FIA manual y se ha evaluado la repetitividad de las señales amperométricas registradas en la medida en flujo de patrones y de muestras de vino.

Para estudiar la repetitividad de los picos amperométricos, en primer lugar, se realizaron 10 inyecciones sucesivas de una disolución patrón de ácido L-málico de concentración 0,02 g L^{-1} (**Figura 52a**) y, en un ensayo diferente en las mismas condiciones experimentales, se llevaron a cabo 30 inyecciones repetidas de un vino rosado con un contenido de ácido L-málico certificado de $5,6 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$, diluido 200 veces en tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 8,0 (**Figura 52b**).

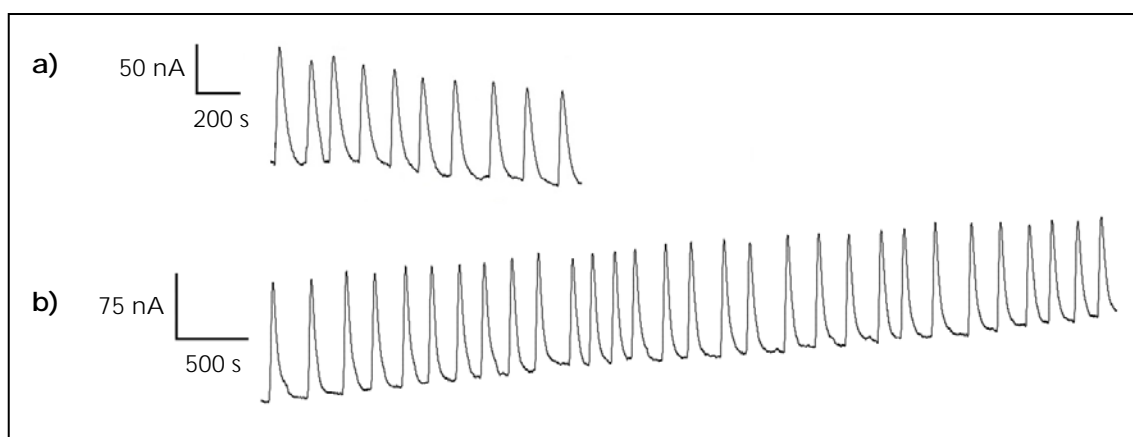


Figura 52. *Diagramas correspondientes a: (a) 10 inyecciones sucesivas de 500 µL de disolución patrón de ácido L-málico de concentración 0,02 g L⁻¹, (b) 30 inyecciones sucesivas de 500 µL de un vino rosado certificado de 5,6 ± 0,6 g L⁻¹ diluido 200 veces. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0 y NAD⁺ 1 mmol L⁻¹. Caudal de trabajo: 3,0 mL min⁻¹. E_{ap} = +0,15 V vs. Ag/AgCl.*

Los valores obtenidos para la desviación estándar de las señales fueron de 2,5 % para los patrones y de 5,2 % para las muestras de vino. En el segundo caso, como se puede apreciar en el diagrama obtenido para las muestras de vino, la intensidad de corriente de pico disminuye con el tiempo, sin embargo, este fenómeno no se da de manera acusada ya que para 30 inyecciones consecutivas se observa una caída de señal que no supera el 10 %. Estos resultados indican una buena reproducibilidad de las señales amperométricas en flujo proporcionadas por el bioanalizador FIA en las condiciones hidrodinámicas establecidas, a pesar de tratarse de una muestra de vino.

En relación a la estabilidad del biosensor con el tiempo, ésta se estudió representando en un gráfico de control las intensidades de corriente de pico medidas con el bioanalizador FIA manual, trabajando en las condiciones seleccionadas, correspondientes al patrón de ácido L-málico de concentración 0,06 g L⁻¹. Durante el estudio el biosensor se almacenó en disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,0 a 4°C. En la **Figura 53** se muestra el gráfico de control construido tomando como valor central la media de 4 medidas sucesivas de patrón 0,06 g L⁻¹ de ácido L-málico, obtenidos el primer día de trabajo del biosensor, y como valor de los límites superior e inferior la media ± 3s (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

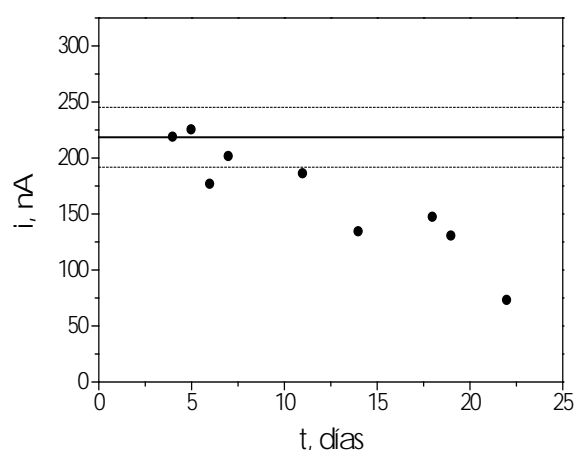


Figura 53. Estabilidad del biosensor de TTF-MDH-DP-AuE. Intensidades de corriente registradas durante 22 días para un mismo biosensor de ácido málico.

Como se puede observar en el gráfico, el biosensor de ácido L-málico va perdiendo señal con el tiempo, de manera que a los pocos días de trabajo ya se encuentra por debajo del límite inferior. No obstante, se puede considerar operativo durante aproximadamente 20 días, a partir de los cuales la señal ha disminuido más de un 40 % y los resultados obtenidos con el biosensor tienen poca reproducibilidad. En ese tiempo se analizaron alrededor de 90 muestras con cada uno de los cinco biosensores empleados para este estudio.

3.3.1.2.3. Curvas de calibrado y características analíticas

En las condiciones experimentales seleccionadas y empleando el biosensor de ácido L-málico desarrollado como detector amperométrico del sistema de análisis por inyección en flujo, se estudió la relación existente entre la señal y la concentración de analito. Para ello, se obtuvieron las curvas de calibrado para el ácido málico en el intervalo de concentración comprendido entre 0 y 0,12 g L⁻¹ resultando que el tipo de ajuste que mejor describe el comportamiento del biosensor es polinómico. El hecho de trabajar con una relación no lineal entre señal y concentración de sustrato ya ha sido descrito en otros trabajos de la bibliografía, en los que se indica que puede ser conveniente emplear un ajuste polinómico de

grado 3 o una relación señal-concentración hiperbólica con biosensores basados en el empleo de MDH [Arif, 2002] [Ruhai, 2012], o un ajuste polinómico de grado 2 para un biosensor basado en el empleo de la MQO [Bucur, 2006] para describir el rango dinámico de concentraciones proporcionado por el biosensor. En la **Figura 54a** se muestra un registro intensidad-tiempo obtenido con el bioanalizador FIA y en la **Figura 54b** se ha representado la dependencia de la intensidad de corriente de pico obtenida con la concentración de ácido L-málico.

La curva de calibrado obtenida que describe el comportamiento del sistema frente a la concentración de sustrato es un **polinomio de tercer grado** de la forma $y = a + bx + cx^2 + dx^3$. Como criterio del grado de ajuste de los puntos del calibrado a dicho polinomio se ha considerado el parámetro R^2 o coeficiente de determinación, siendo considerado un buen ajuste aquel cuyo valor de R^2 sea superior a 0,99 (o al 99 %) [Miller, 2002].

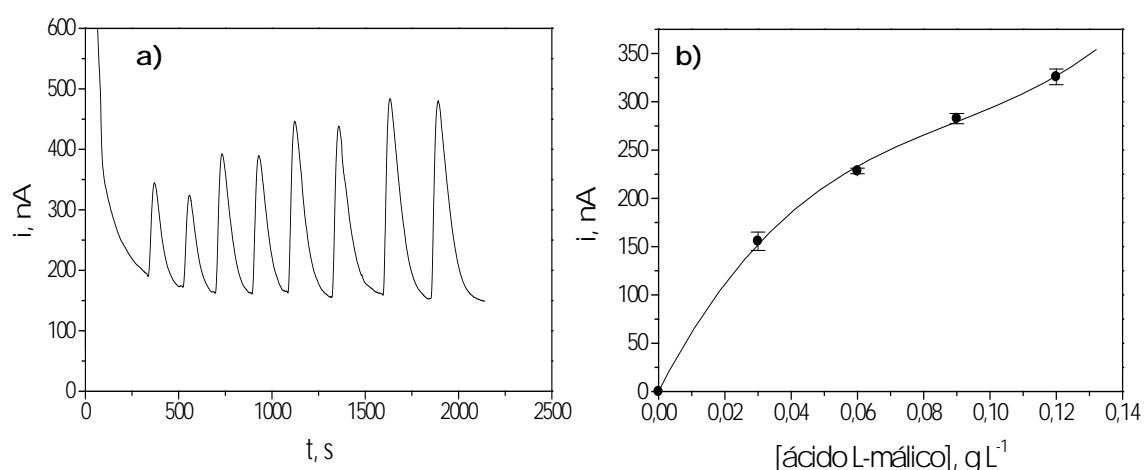


Figura 54. (a) Diagrama obtenido para inyecciones de 500 μL de disoluciones patrón de ácido L-málico de concentraciones crecientes. **(b)** Curva de calibrado obtenida a partir del registro intensidad-tiempo (a). Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Caudal de trabajo: 3,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Como criterios para estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado los sugeridos por la IUPAC [Miller, 2002] $3S_b$ y $10S_b$, respectivamente, donde " S_b " es la desviación estándar del blanco en intensidad de corriente. Se ha tomado como estimador de " S_b " el valor obtenido a partir de la corriente de fondo

proporcionada por el biosensor durante 300 s, una vez alcanzada la estabilidad de la línea base. Los parámetros de la ecuación de la curva de ajuste, junto con los límites de detección y de determinación calculados, se recogen en la **Tabla 29**.

Tabla 29. *Parámetros de la ecuación polinómica de tercer grado $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, coeficientes de cuantificación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a la curva de calibrado de la Figura 54.*

Parámetro "a"	Parámetro "b"	Parámetro "c"	Parámetro "d"	R ²	LD, g L ⁻¹	LC, g L ⁻¹
0,8 ± 6,7	(6,6 ± 0,6)x10 ³	(6 ± 1)x10 ⁴	(2,2 ± 0,7)x10 ⁵	0,9993	3,3x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻³

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

3.3.1.2.4. Análisis de muestras de vino

La aplicabilidad del bioanalizador FIA manual desarrollado para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino se validó llevando a cabo la determinación de este analito en materiales de referencia certificados. En primer lugar se realizó un calibrado para el intervalo de concentración comprendido entre 0,03 y 0,12 g L⁻¹, incluyendo el 0, para ácido L-málico realizando inyecciones de 500 µL de disoluciones patrón de concentración adecuada preparadas en la disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0. Las muestras se prepararon por simple dilución del material de referencia certificado en la disolución tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0, llevando a cabo una dilución apropiada de las muestras con el fin de que las señales de las muestras cayeran entre los tres primeros puntos del calibrado, correspondiente a la región más sensible y que proporciona resultados más reproducibles. La representación de la intensidad de corriente de pico registrada frente a la concentración permite construir la curva de calibrado donde se interpolan las intensidades medidas para las muestras. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de ácido L-málico en materiales de referencia certificados del Centre Œnologique de Bourgogne (Lote 2009) con el bioanalizador FIA desarrollado.

Material de referencia	[ácido L-málico], g L ⁻¹	[ácido L-málico] Promedio, g L ⁻¹	t _{exp}
Vino tinto Referencia 1 [ácido L-málico]: (1,5 ± 0,2) g L ⁻¹	1,598	(1,52 ± 0,06) g L ⁻¹ (RSD _{n=10} = 5,1 %)	0,822
	1,523		
	1,603		
	1,418		
	1,507		
	1,437		
	1,640		
	1,473		
	1,562		
	1,453		
Vino rosado Referencia 4 [ácido L-málico]: (5,6 ± 0,6) g L ⁻¹	5,755	(5,6 ± 0,3) g L ⁻¹ (RSD _{n=10} = 6,9 %)	0,082
	5,282		
	5,695		
	5,844		
	5,809		
	5,967		
	5,733		
	5,964		
5,011			
4,922			

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

La exactitud del método se ha evaluado comparando las medias experimentales obtenidas para el contenido de ácido L-málico en los materiales de referencia con los valores certificados a través del cálculo del estadístico *t*. Como se puede observar a continuación en la Tabla 30, los valores de *t*_{experimental} obtenidos son inferiores al valor tabulado *t*_{tab}(9 grados de libertad, *p* = 0,05) = 2,262. Por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los valores determinados empleando el bioanalizador desarrollado y los conocidos, y se puede concluir que el análisis de los materiales de referencia con el bioanalizador manual se realizó con una exactitud y una precisión adecuadas.

3.3.1.3. Bioanalizador de ácido láctico en cervezas: diseño, desarrollo y optimización de un sistema FIA manual

Con el objetivo de obtener un bioanalizador de ácido láctico que realice el análisis simultáneo, exacto y preciso de sus isómeros D- y L-, se ha llevado a cabo el diseño y desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo que emplea un biosensor de ácido D-láctico y un biosensor de ácido L-láctico para la detección específica de cada isómero. Previamente, se llevó a cabo el desarrollo y optimización del biosensor de ácido D-láctico para su implementación como detector amperométrico en el sistema de flujo. La optimización del biosensor de ácido L-láctico no fue necesaria, ya que se utilizó un electrodo comercial (InBea[®]) ([p. web 15], patente WO 2002012550 A1). Para el diseño final del bioanalizador manual se determinaron sus características analíticas y se evaluaron sus características operacionales y su aplicabilidad para el análisis de ácido láctico total en muestras reales de cerveza.

3.3.1.3.1. Optimización de las variables experimentales

Todos los estudios relacionados con la fabricación y funcionamiento del biosensor de ácido D-láctico se llevaron a cabo mediante amperometría a potencial constante en disoluciones agitadas, empleando ácido D-láctico como sustrato. El desarrollo de un prototipo manual de bioanalizador para el análisis simultáneo de los isómeros D- y L- láctico se llevó a cabo en sistemas de flujo con detección amperométrica.

3.3.1.3.1.1. Selección del biosensor de ácido L-láctico

Como detector amperométrico para el análisis de ácido L-láctico en cerveza se seleccionó un biosensor bienzimático desarrollado por InBea Biosensores S.L, basado en el empleo de una superficie electródica de capa fina de oro depositada sobre un electrodo de acero inoxidable mediante "sputtering" (Figura 33 del Apartado 3.3.1.1.2.1.1) según la metodología indicada en el Apartado 3.2.3.2. Este

biosensor emplea el sistema lactato oxidasa (LOD)/peroxidasa (HRP)/ferroceno (Fc) para determinar la concentración de ácido L-láctico a través de la secuencia de reacciones mostrada en la **Figura 55**, en la que se muestra la oxidación del L-láctico en una reacción catalizada por la LOD para generar piruvato y peróxido de hidrógeno como productos. Se utiliza la reducción del peróxido, catalizada por la HRP, para seguir la oxidación del L-láctico. Finalmente, la señal amperométrica empleada para monitorizar la secuencia global de reacciones es la correspondiente a la reducción electroquímica del ion ferricinio, que actúa como mediador.

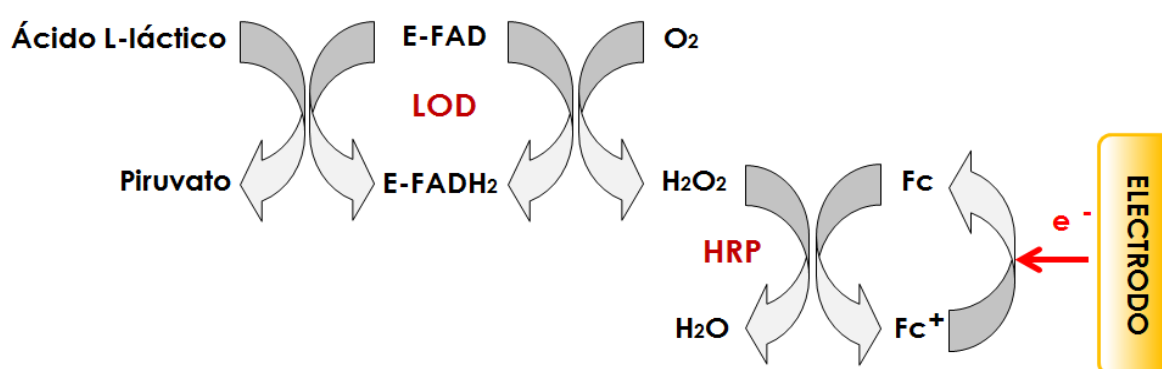


Figura 55. Secuencia de reacciones enzimática y electroquímica implicadas en la detección de ácido L-láctico empleando el biosensor enzimático amperométrico Fc-LOD-HRP-AuE.

Se consideró adecuada la elección de este biosensor como detector en un sistema de análisis en flujo por su funcionamiento validado para el análisis de ácido L-láctico en muestras de vino. Además, se tuvieron en cuenta las ventajas ya comentadas para los biosensores de acero inoxidable con capa de oro en cuanto a los bajos costes de fabricación y sencillez de preparación. Este desarrollo presenta las características que se recogen en la **Tabla 31** como detector trabajando con amperometría a potencial constante en disoluciones agitadas.

Tabla 31. Características analíticas y propiedades del biosensor de capa de oro de LOD-HRP-Fc trabajando en disoluciones agitadas de tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 y empleando ácido L-láctico como sustrato. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl. Datos facilitados por InBea Biosensores S.L.

Potencial de trabajo (vs. Ag/AgCl)	0,0 V
Medio de trabajo	tampón fosfato 0,05 mol L ⁻¹ de pH 7,4
Intervalo lineal	(1,2 – 45)×10 ⁻⁴ g L ⁻¹
Sensibilidad	(6,16 ± 0,05)×10 ⁴ nA g ⁻¹ L
Límite de detección	3,5×10 ⁻⁵ g L ⁻¹
Límite de cuantificación	1,2×10 ⁻⁴ g L ⁻¹
RSD	6,5 %
Tiempo de vida	10 días /30 medidas
Condiciones de almacenamiento	Sumergido en tampón fosfato 0,05 mol L ⁻¹ de pH 7,4 a -15°C
Tiempo de almacenamiento	30 días

3.3.1.3.1.2. Desarrollo del biosensor de ácido D-láctico

El biosensor bienzimático de ácido D-láctico basado en el sistema D-lactato deshidrogenasa (DLDH)/diaforasa (DP)/tetratiafulvaleno (TTF) emplea como sustrato electródico acero inoxidable con una capa fina de oro depositada mediante la técnica de "sputtering" (Figura 33 del Apartado 3.3.1.2.1.1), y su preparación se describe en la metodología del Apartado 3.2.3.2. La concentración de ácido D-láctico es monitorizada a través de la secuencia de reacciones que se muestra en la **Figura 56**. El D-láctico es oxidado produciendo piruvato y NADH (forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido) en una reacción catalizada por la DLDH. El NADH generado se re-oxida por el TTF⁺ en una reacción catalizada por la DP de modo que se evita que la DLDH pierda su actividad enzimática, como ya se indicó para el biosensor de ácido L-málico (Apartado 3.3.1.2.1.1). La reacción electródica que se utiliza para monitorizar la secuencia de reacciones implicadas es la debida a la oxidación amperométrica de la forma reducida del TTF.

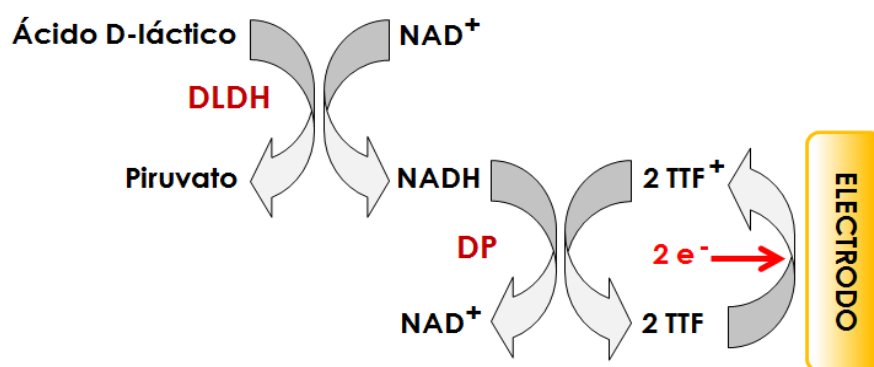


Figura 56. Secuencia de reacciones enzimática y electroquímica implicadas en la detección de ácido D-láctico empleando el biosensor enzimático amperométrico TTF-DLDH-DP-AuE.

3.3.1.3.1.2.1. Composición del biosensor y condiciones de trabajo

Con el objetivo de obtener un desarrollo adecuado para el análisis de ácido D-láctico en cerveza, se han optimizado las variables de la composición del biosensor, así como las diferentes variables experimentales relacionadas con su funcionamiento.

Para la optimización de la composición del biosensor de ácido D-láctico se estudió la cantidad de enzima DLDH a inmovilizar sobre la superficie del electrodo y para ello se fijó la cantidad de DP, considerando las mismas unidades (1,5 U de DP) que las empleadas en el biosensor de ácido L-málico desarrollado en esta Tesis Doctoral (Apartado 5.1.2.1.1.1). Como mediador redox, se utilizó TTF siendo la cantidad depositada (1,5 μmol) la misma que la empleada para el biosensor de ácido L-málico y, como se indicó anteriormente, también en otros desarrollos del Grupo de Investigación que incorporan deshidrogenasas en su composición. Para el estudio se han preparado biosensores de TTF-DLDH-DP-AuE con cantidades de DLDH comprendidas entre 5 y 20 U, y se ha estudiado la variación de las intensidades de corriente en estado estacionario registradas para una concentración de ácido D-láctico de $1,8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ tras la adición de 40 μL de patrón 0,9 g L^{-1} a la célula de medida que contenía 20 mL de tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4 y NAD^+ 5 mmol L^{-1} , aplicando un potencial de +0,10 V. En la **Figura 57** se muestran los resultados obtenidos.

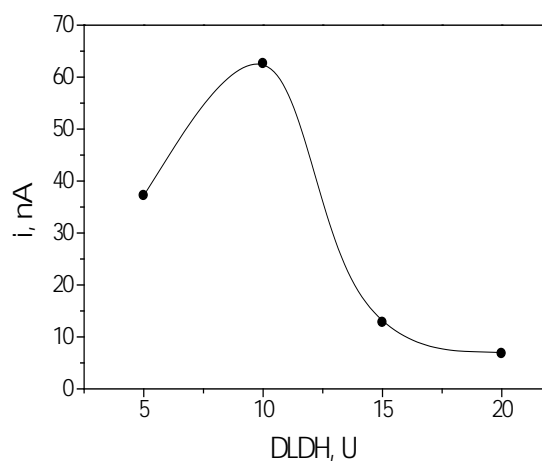


Figura 57. Intensidades de corriente obtenidas con biosensores de TTF-DLDH-DP-AuE que contienen 1,5 U de DP y 5, 10, 15 y 20 U de DLDH en disoluciones agitadas para una concentración de ácido D-láctico de $1,8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. Medio de trabajo: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 5 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,10 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Como se puede observar, el máximo de intensidad de corriente fue obtenido para 10 U de DLDH, valor a partir del cual se observa un descenso drástico de la respuesta, probablemente debido al bloqueo de la superficie del electrodo para mayores cantidades de enzima inmovilizada. A la vista de los resultados, se escogió la composición de (1,5 U) DP/ (10 U) DLDH/ (1,5 μmol) TTF para la preparación del biosensor de ácido D-láctico.

Con respecto a las condiciones de trabajo para el biosensor desarrollado, se realizó el estudio de la influencia del pH del medio de trabajo y del potencial aplicado sobre la intensidad de corriente en estado estacionario.

En primer lugar, para elegir el pH óptimo de trabajo para el biosensor de ácido D-láctico, se midió la señal aplicando al electrodo un potencial de +0,10 V, para una concentración de ácido D-láctico en disolución de $1,0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ en tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ y NAD^+ 1 mmol L^{-1} , variando el pH entre 5,5 y 8,5. Como se puede ver en la **Figura 58a** a pH 7,4 se obtiene la mayor respuesta, observándose un descenso de la actividad enzimática a valores extremos de pH, debido a la inactivación de las enzimas al inducirse su desnaturalización [Badui, 1999].

Se estudió el efecto del potencial aplicado al biosensor sobre la intensidad de corriente en el estado estacionario en el intervalo comprendido entre +0,05 V y

+0,2 V, para una concentración de ácido D-láctico de $1,8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ en tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Como puede observarse en la **Figura 58b**, se obtuvo la señal máxima para un potencial de trabajo de +0,15 V. La disminución de la señal amperométrica observada a partir de +0,15 V está de acuerdo con comportamientos similares reportados para biosensores que utilizan TTF [Campuzano, 2004] como mediador redox. Este comportamiento puede atribuirse a que a potenciales más positivos se produce la oxidación irreversible del TTF^+ a TTF^{2+} , que es soluble en disolución acuosa.

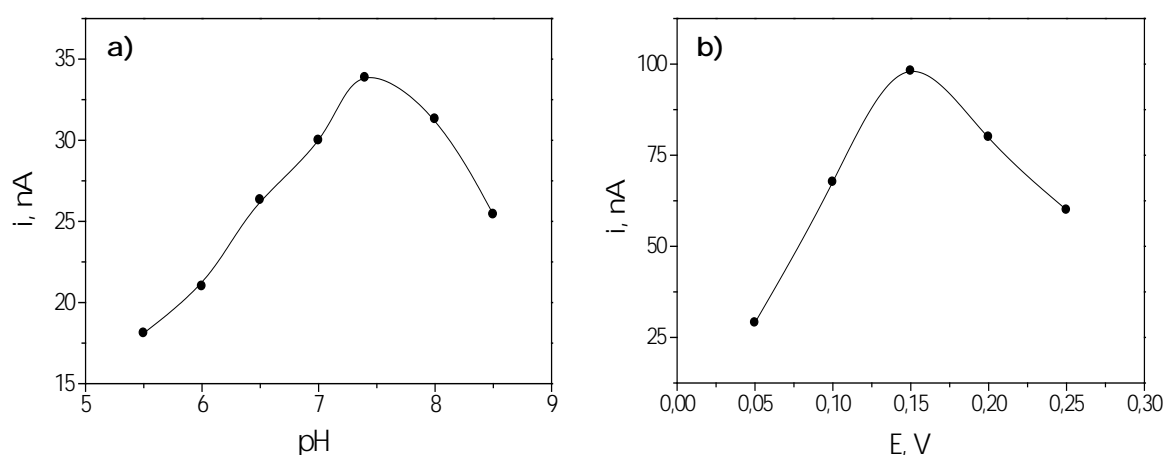


Figura 58. Variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario (a) con el pH de la disolución de trabajo para una concentración de ácido D-láctico $1,0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ($E_{ap} = +0,10 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) y (b) con el potencial aplicado para una concentración de ácido D-láctico $1,8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (pH 7,4). Medio de trabajo: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ que contiene 1 mmol L^{-1} de NAD^+ .

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad posible, se establecieron como condiciones de trabajo óptimas para estudios posteriores un potencial aplicado de +0,15 V y un pH de 7,4 para el medio de trabajo.

Por último, para terminar de caracterizar la composición ideal del medio de trabajo para el biosensor desarrollado, se estudió la influencia de la concentración del cofactor NAD^+ incorporado a la disolución reguladora empleando concentraciones comprendidas en el rango entre $0,05$ y 5 mmol L^{-1} . Como se puede observar en la **Figura 59**, se obtuvo un aumento significativo de la respuesta amperométrica para una concentración de NAD^+ de 1 mmol L^{-1} y a partir de 2,5

mmol L^{-1} se aprecia una disminución acusada de la señal del biosensor. Por lo tanto, se seleccionó 1 mmol L^{-1} de NAD^+ para la composición del medio de trabajo, evitando así un gasto elevado de este reactivo.

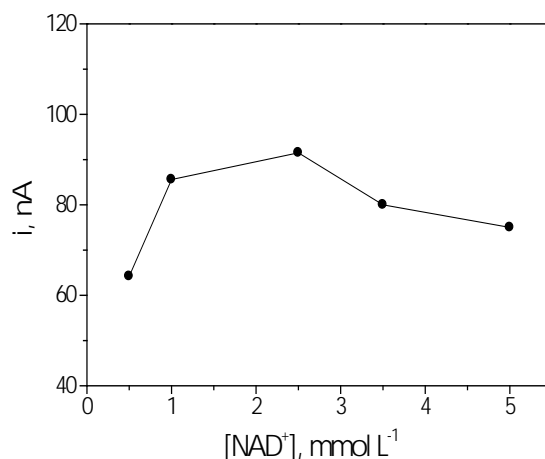


Figura 59. Variación de la intensidad de corriente en el estado estacionario para el biosensor TTF-DLDH-DP-AuE con la concentración de NAD^+ incorporada al tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 para una concentración de ácido D-láctico de $1,8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

3.3.1.3.1.2.2. Estudios de estabilidad

En este apartado se describen los estudios relacionados con la estabilidad del biosensor desarrollado: repetitividad de las señales amperométricas para un mismo biosensor, reproducibilidad de la señal para diferentes medidas obtenidas con diferentes electrodos preparados de la misma manera, y la estabilidad del electrodo con el tiempo.

Para estudiar la repetitividad de las señales amperométricas se realizaron 10 medidas repetidas para disoluciones de ácido D-láctico a un nivel de concentración de $4,5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ (**Figura 60**). Se obtuvo un valor de desviación estándar relativa (RSD) de 4,4 % lo que refleja la buena estabilidad de las medidas analíticas obtenidas con el biosensor.

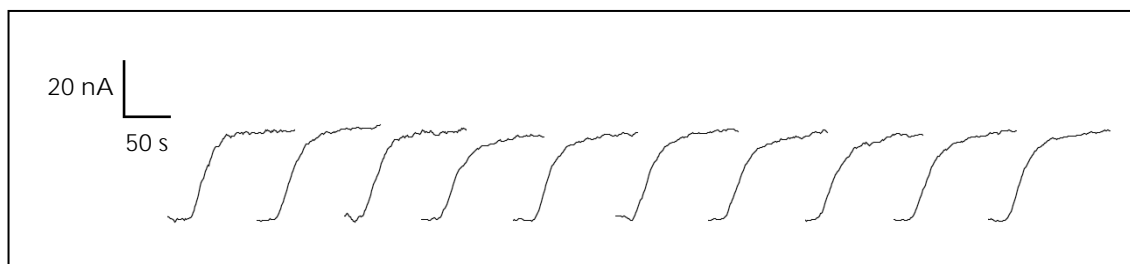


Figura 60. Señales de intensidades de corriente registradas con el biosensor de TTF-DLDH-DP-AuE en disoluciones agitadas para una concentración de ácido D-láctico de $4,5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$. Medio de trabajo: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

La evaluación de la reproducibilidad en la fabricación de los biosensores se ha llevado a cabo comparando los valores de las pendientes de las curvas de calibrado de ácido D-láctico, en el intervalo de concentración comprendido entre $4,5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ y $9 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$, con cinco biosensores diferentes. El valor obtenido para la desviación estándar relativa (**Tabla 32**) es indicativo de una fabricación muy reproducible. Como ya ha sido comentado anteriormente, esta variable no es concluyente ya que antes de proceder a la determinación de ácido D-láctico en la muestra es necesario realizar un calibrado. Por ello, la posible falta de reproducibilidad en la fabricación del biosensor no será un factor determinante si la señal analítica obtenida con cada biosensor es adecuada para la medida del contenido del analito en la muestra.

Tabla 32. Pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación correspondientes a calibrados realizados con 5 biosensores de ácido D-láctico diferentes.

Pendiente, $\text{nA g}^{-1} \text{ L}$	O.o, nA	r	Pendiente _{promedio} , $\text{nA g}^{-1} \text{ L}$	RSD, %
$(4,8 \pm 0,1) \times 10^4$	1 ± 1	0,9997		
$(4,50 \pm 0,04) \times 10^4$	$0,2 \pm 0,5$	0,9999		
$(4,4 \pm 0,1) \times 10^4$	1 ± 1	0,9996	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^4$	4,7
$(4,2 \pm 0,1) \times 10^4$	0 ± 1	0,9997		
$(4,33 \pm 0,06) \times 10^4$	$0,3 \pm 0,7$	0,9999		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Por último, se estudió el tiempo de vida útil del biosensor desarrollado empleándolo como detector amperométrico para el análisis de ácido D-láctico en cervezas. Para ello, se realizaron medidas de intensidad de corriente en estado estacionario en disoluciones agitadas para una concentración de ácido D-láctico de $4,5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$, trabajando sobre tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} y aplicando un potencial de $+0,15 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. El biosensor fue almacenado en disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el tiempo que duró este estudio. En la **Figura 61** se muestra el gráfico de control construido tomando como valor central la media de 4 medidas sucesivas de patrón de ácido D-láctico, obtenidas el primer día de trabajo del biosensor, y como valor de los límites superior e inferior de control la media $\pm 3s$ (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

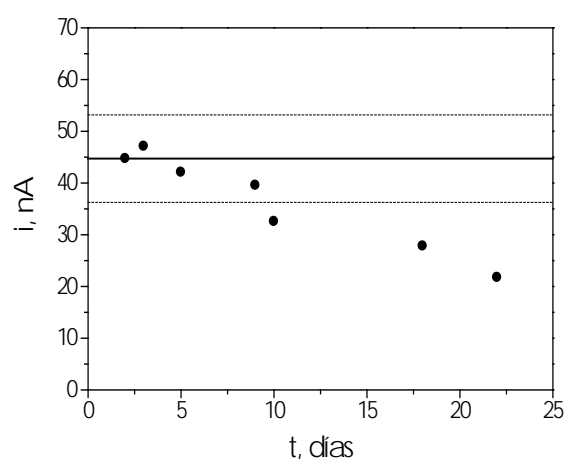


Figura 61. Estabilidad del biosensor de TTF-DLDH-DP-AuE. Intensidades de corriente registradas durante 22 días para un mismo biosensor de ácido D-láctico.

Como se puede observar, la señal dada por el biosensor está por debajo del límite inferior claramente a partir del día 10, cuando ésta ha disminuido hasta un 27 %. Sin embargo, el biosensor de ácido D-láctico se mantiene operativo durante 22 días aproximadamente, tiempo durante el cual proporciona una calibración y unos resultados en la medida de muestras aceptables. Se analizaron alrededor de 30 muestras con cada uno de los cinco biosensores empleados para este estudio.

3.3.1.3.1.2.3. Curvas de calibrado y características analíticas

En las condiciones experimentales seleccionadas y trabajando mediante amperometría en disoluciones agitadas, se obtuvieron las señales del ácido D-láctico en el intervalo de concentración comprendido entre $2,25 \times 10^{-4}$ y $1,0 \times 10^{-2}$ g L⁻¹. A modo de ejemplo, en la **Figura 62a** se muestra un registro intensidad-tiempo obtenido en el intervalo de concentraciones comprendido entre $4,50 \times 10^{-4}$ y $1,35 \times 10^{-3}$ g L⁻¹, y en la **Figura 62b** se ha representado la dependencia de la intensidad de corriente medida en estado estacionario con la concentración de ácido D-láctico en el intervalo de concentraciones estudiado.

Para establecer el intervalo lineal y estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado como criterios los indicados anteriormente en el Apartado 3.3.1.1.3.

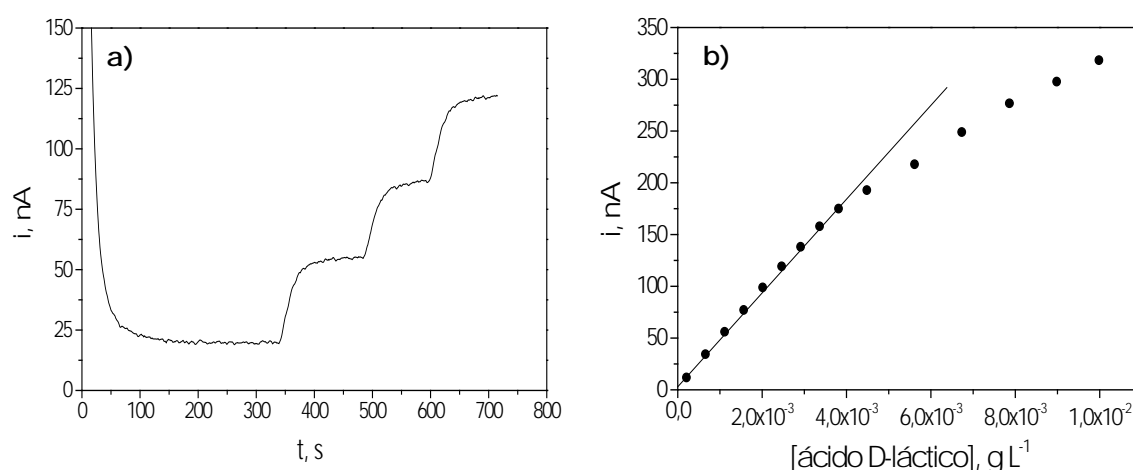


Figura 62. (a) Registro intensidad-tiempo para adiciones sucesivas de ácido D-láctico de concentración 9×10^{-4} g L⁻¹ sobre tampón fosfato $0,05$ mol L⁻¹ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L⁻¹. $E_{ap} = +0,15$ V vs. Ag/AgCl. (b) Curva de calibrado obtenida con un biosensor de ácido D-láctico trabajando en disoluciones agitadas en las condiciones de trabajo establecidas.

En la **Tabla 33** se muestran las características analíticas determinadas a partir de los registros intensidad-tiempo obtenidos en la medida de las curvas de calibrado.

Tabla 33. Intervalo de linealidad, pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a la curva de calibrado de la Figura 62b.

Intervalo lineal, g L ⁻¹	Pendiente, nA g ⁻¹ L	O.o, nA	r	LD, g L ⁻¹	LC, g L ⁻¹
(1,00 – 38,0)×10 ⁻⁴	(4,55 ± 0,06)×10 ⁴	2 ± 3	0,9994	3,1×10 ⁻⁵	1,0×10 ⁻⁴

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Como se puede observar, comparando las características de la Tabla 33 con las de otros biosensores enzimáticos amperométricos encontrados en la bibliografía (Tabla 3 del Apartado 3.1.4.1), se ha obtenido una mayor sensibilidad y un límite de detección más bajo con el biosensor TTF-DLDH-DP-AuE desarrollado en este trabajo ([Arvinte, 2008^B], [Avramescu, 2001], [Avramescu, 2002^A], [Avramescu, 2002^B], [Darie, 2007], [Gros, 2000], [Gros, 2004], [Gué, 2002], [Mazzei, 2007], [PohanKa, 2008], [Smutok, 2014], [Tap, 2000]).

3.3.1.3.1.2.4. Estudio de interferencias

Con el objetivo de comprobar la selectividad del biosensor desarrollado, se evaluó la presencia de sustancias que están normalmente presentes en las cervezas sobre la respuesta amperométrica del biosensor de ácido D-láctico, trabajando en disoluciones agitadas en las condiciones óptimas establecidas. Para el estudio, se han considerado como interferentes potenciales los compuestos que se muestran en la **Tabla 34**, teniendo en cuenta para la monitorización de las señales amperométricas un contenido máximo en muestra de la especie a evaluar y una concentración mínima de ácido D-láctico de 10 mg L⁻¹, muy inferior a los valores típicos entre 100 – 500 mg L⁻¹ encontrados en productos fermentados como el vino [Buglass, 2003].

Tabla 34. Concentraciones máximas de las principales especies presentes en la composición de la cerveza tradicional.

Tipo de compuesto	Especie	Concentración máxima	Referencia
Alcohol	Etanol	5 % (v/v)	[p. web 16]
	Glicerol	3 g L ⁻¹	RD 53/1995
Azúcar	Glucosa Fructosa Arabinosa Galactosa Maltosa	40 g L ⁻¹ (total en azúcares)	[p. web 17]
Ácido orgánico	Ácido cítrico Ácido acético Ácido láctico Ácido succínico Ácido málico	3 g L ⁻¹ (acidez total máxima expresada como ácido láctico)	[p. web 17]
	Ácido ascórbico	40 mg L ⁻¹	[p. web 16]
Compuesto nitrogenado	Glutamina	5 g L ⁻¹	[p. web 17]

En la **Figura 63** se muestran los registros intensidad-tiempo obtenidos tras adicionar a la célula de medida 200 µL de disolución patrón de ácido D-láctico de concentración 10 mg L⁻¹ (**Figura 63(2)**) y de disoluciones patrón de concentración máxima (Tabla 34) de los interferentes estudiados, junto a la señal obtenida para el patrón de ácido D-láctico al nivel de concentración empleado para la calibración (**Figura 63(1)**). Como se puede observar, de todos los compuestos ensayados como interferentes potenciales, sólo el ácido ascórbico dio señal amperométrica en el nivel de concentración monitorizado (**Figura 63(16)**). Para establecer hasta qué punto interfiere esta sustancia, se llevó a cabo la medida de ácido D-láctico en baja concentración (1,0x10⁻⁴ g L⁻¹) en presencia de ácido ascórbico al mismo nivel de concentración al que se observó la aparición de señal (**Figura 63(17)**), dando lugar a una medida amperométrica cuya intensidad no supera en más de un 5 % a la intensidad de la señal individual del ácido D-láctico en ausencia del interferente

(Figura 63(2)). Teniendo en cuenta que se han considerado una alta concentración de interferente y una mínima de analito, este resultado pone de manifiesto la especificidad del biosensor de ácido D-láctico desarrollado, por lo que se puede considerar que la determinación de esta especie en muestras de cerveza está libre de interferencias.

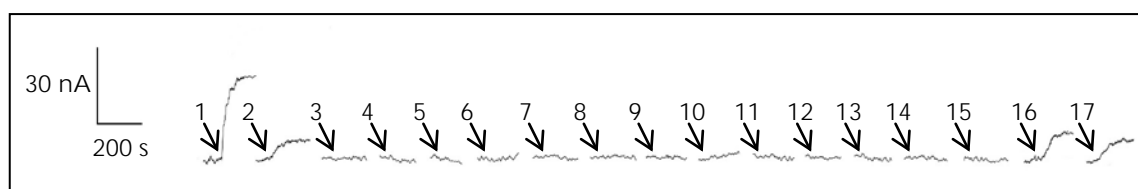


Figura 63. Respuestas amperométricas medidas para: ácido D-láctico $4,5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ (correspondiente al primer punto del calibrado) **(1)**, ácido D-láctico $1,0 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ **(2)**, D-glucosa $0,4 \text{ g L}^{-1}$ **(3)**, D-fructosa $0,4 \text{ g L}^{-1}$ **(4)**, L-arabinosa $0,4 \text{ g L}^{-1}$ **(5)**, D-galactosa $0,4 \text{ g L}^{-1}$ **(6)**, maltosa $0,4 \text{ g L}^{-1}$ **(7)**, ácido cítrico $3,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ **(8)**, ácido acético $3,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ **(9)**, ácido L-málico $3,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ **(10)**, ácido L-láctico $3,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ **(11)**, ácido succínico $3,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ **(12)**, etanol 5 % (v/v) **(13)**, glicerol $3,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ **(14)**, glutamina $5,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ **(15)**, ácido ascórbico $4,0 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ **(16)**, ácido D-láctico $1,0 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ + ácido ascórbico $4,0 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ **(17)**. Medio de trabajo: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

3.3.1.3.1.2.5. Análisis de muestras de cerveza en discontinuo

Con el fin de validar el método para la determinación de ácido D-láctico en muestras de cerveza con el biosensor desarrollado, se llevó a cabo el análisis comparativo empleando un kit enzimático comercial (método UV de R-Biopharm®). Previamente, se evaluó la posible existencia de efecto matriz para cervezas de diferentes tipos en cuanto al grado alcohólico, aplicando el método de la t de Student para comparar las pendientes obtenidas por calibración externa con las pendientes de los calibrados construidos mediante adiciones estándar. En la **Figura 64** se han representado las curvas de calibrado obtenidas por ambos métodos para cada muestra evaluada, y en la **Tabla 35** se recogen los datos de las pendientes, junto con los valores de $t_{\text{experimental}}$ determinados en la comparación de dichas pendientes.

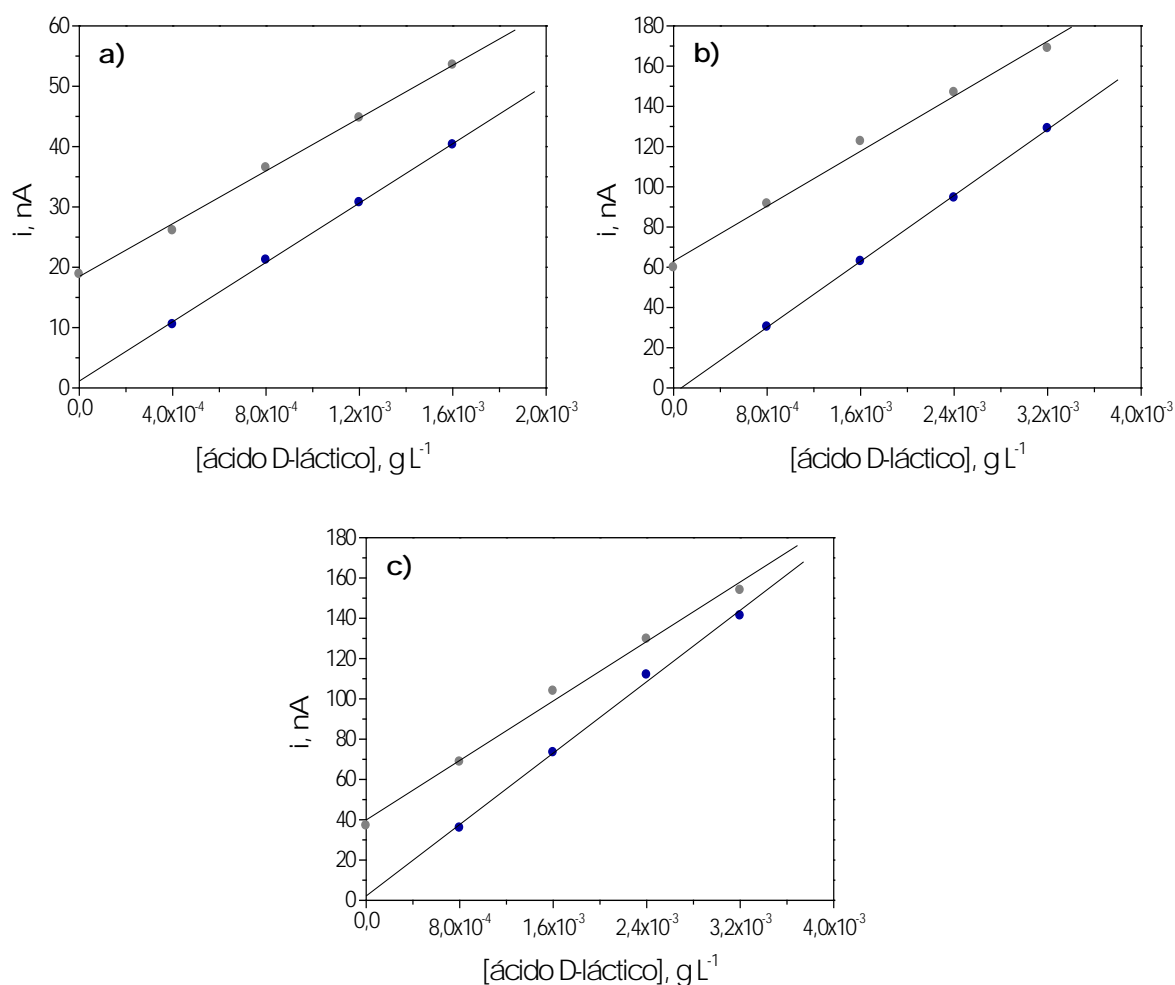


Figura 64. Curvas de calibrado obtenidas mediante calibración externa (●) y calibración por adiciones estándar (●) para una cerveza con alcohol (a), una cerveza "Sin" (b) y una cerveza "0,0" (c), trabajando con el biosensor de ácido D-láctico en amperometría en disoluciones agitadas en las condiciones de trabajo establecidas.

Tabla 35. Pendientes correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 64.

Muestra	Calibrado	Pendiente, $\text{nA g}^{-1} \text{L}$	t_{exp}
(a)	Externo	$(2,47 \pm 0,05) \times 10^4$	0,125
	Adiciones estándar	$(2,20 \pm 0,06) \times 10^4$	
(b)	Externo	$(4,10 \pm 0,05) \times 10^4$	0,159
	Adiciones estándar	$(3,4 \pm 0,2) \times 10^4$	
(c)	Externo	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^4$	0,197
	Adiciones estándar	$(3,7 \pm 0,2) \times 10^4$	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

En todos los casos se ha obtenido un valor de t de Student experimental inferior al valor tabulado t_{tab} (4 grados de libertad, $p = 0,05$) = 2,776, lo que indica que no hay diferencias significativas entre las pendientes y , por lo tanto, no hay efecto matriz en este tipo de muestras. A la vista de estos resultados, la determinación de ácido D-láctico en cervezas se ha llevado a cabo por el método de calibración externa.

Para realizar el análisis empleando el biosensor de D-láctico en amperometría en disoluciones agitadas, en primer lugar se estableció un calibrado para el intervalo de concentración comprendido entre $4,5 \times 10^{-4}$ y $9,0 \times 10^{-4}$ g L⁻¹ para ácido D-láctico realizando adiciones de una disolución patrón de concentración adecuada, preparada en la disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4, a una célula con 20 mL de la disolución reguladora de trabajo que contiene NAD⁺ en una concentración de 1 mmol L⁻¹. La medida de las muestras de cerveza se llevó a cabo adicionando directamente a la célula de medida el volumen adecuado, sin realizar ningún pretratamiento ni dilución previa a las mismas. Los resultados se muestran en la **Tabla 36**, junto con los valores obtenidos con el kit enzimático siguiendo la metodología descrita en las especificaciones del mismo.

Para la validación del método se han comparado estadísticamente las medias experimentales obtenidas con el biosensor de ácido D-láctico con los resultados obtenidos con el kit enzimático a través del cálculo del estadístico t para contrastes de significación, cuyos valores de $t_{\text{experimental}}$ determinados se incluyen en la Tabla 36. Como se puede observar a continuación en dicha tabla, en todos los casos se ha obtenido un valor de t_{exp} inferior al valor crítico t_{tab} (4 grados de libertad, $p = 0,05$) = 2,776, lo que indica que no existen diferencias significativas entre los valores determinados con ambos métodos y , por lo tanto, se puede afirmar que el método desarrollado no está sujeto a errores sistemáticos.

Tabla 36. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de ácido D-láctico en muestras de cerveza empleando el biosensor de ácido D-láctico desarrollado en amperometría en disoluciones agitadas y con el kit enzimático comercial.

Método	Biosensor ácido D-láctico		Kit	t_{exp}
Muestra	[ácido D-láctico], mg L ⁻¹	[ácido D-láctico] _{promedio} , mg L ⁻¹	[ácido D-láctico], mg L ⁻¹	
Cerveza 1	26,844	24 ± 3 RSD _{n=5} = 11,0 %	22,2	2,462
	22,071			
	25,890			
	25,890			
	20,830			
Cerveza 2	69,976	71 ± 2 RSD _{n=5} = 2,3 %	69,8	1,668
	68,224			
	71,973			
	72,181			
	71,451			
Cerveza 3	30,513	29,7 ± 0,8 RSD _{n=5} = 2,3 %	28,8	2,556
	28,791			
	29,834			
	30,192			
	29,379			

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede decir que el método desarrollado con el biosensor de ácido D-láctico propuesto, es adecuado para la determinación de este analito en muestras de cerveza. Dado que el objetivo del presente trabajo es llegar a la medida en continuo del ácido láctico, se procedió a utilizar este biosensor como detector amperométrico en un sistema FIA para el análisis simultáneo de ácido D- y L-láctico.

3.3.1.3.1.3. Selección de la célula electroquímica de flujo

La célula de flujo empleada fue una "wall-jet" doble de gran volumen diseñada por el Grupo de Investigación, que permite mantener los dos biosensores de los ácidos L- y D-láctico y los electrodos auxiliar y de referencia sumergidos en la misma disolución portadora. En este diseño FIA, se debe realizar una división del flujo mediante una "T" para que el bolo de muestra llegue a los dos biosensores al mismo tiempo y puedan ser determinados los dos isómeros simultáneamente. Las entradas de portador, al igual que sucedía con la célula sencilla, inciden perpendicularmente con la superficie de los electrodos de trabajo (Figura 65).

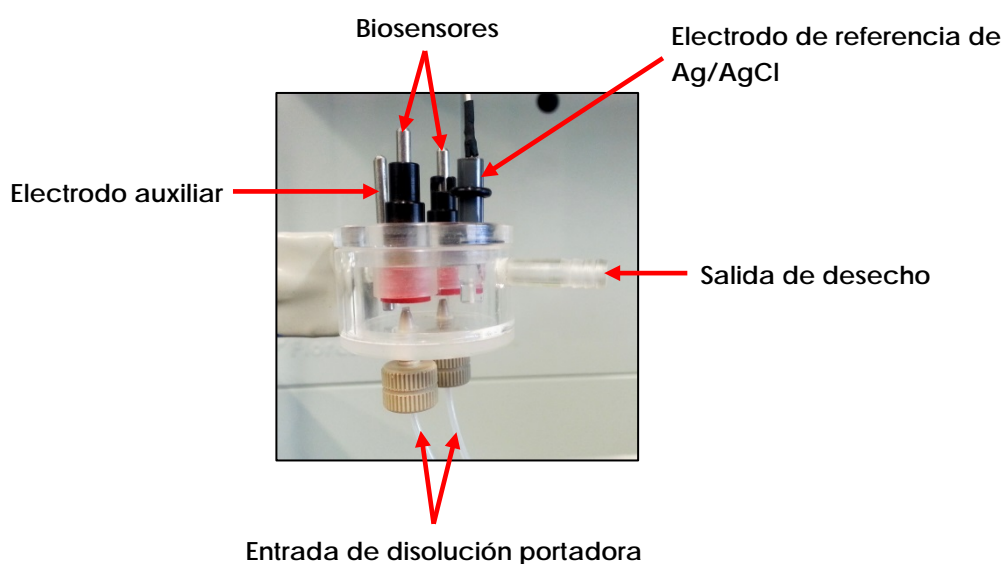


Figura 65. Célula "wall-jet" doble de gran volumen.

3.3.1.3.1.4. Diseño y optimización de un sistema FIA semiautomático

Una vez desarrollado el biosensor de ácido D-láctico se procedió a implementarlo, junto con el biosensor de ácido L-láctico seleccionado, como detector amperométrico en un sistema FIA para el análisis simultáneo de los dos isómeros de ácido láctico. El sistema de flujo propuesto es un sistema FIA que necesita el empleo de una válvula manual de inyección para la introducción de

patrones y muestras, además de un conector de tres vías para la división del flujo de portador dirigido a cada una de las entradas de la célula electroquímica doble, como se muestra en el esquema de la **Figura 66**. Dicho sistema consta de una bomba peristáltica bicanal colocada después del divisor de flujo para que el caudal en ambos canales sea el mismo, una válvula manual de inyección y la célula de flujo wall-jet doble de gran volumen, mostrada anteriormente en el Apartado 5.1.3.1.2, con los electrodos conectados a un detector amperométrico bicanal (InBea[®]).

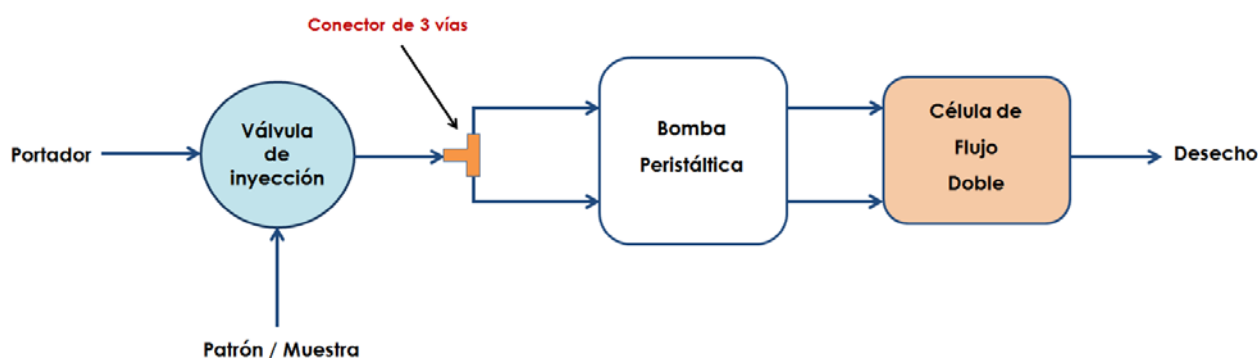


Figura 66. Esquema del sistema FIA para el análisis de ácido láctico en muestras de cerveza.

3.3.1.3.1.4.1. Estudio del efecto del caudal

Utilizando las mismas condiciones de medida optimizadas para el método en discontinuo (composición de la disolución de medida, pH y potencial aplicado al electrodo) se estudió la influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de corriente de pico dada por ambos biosensores con objeto de optimizar la sensibilidad y la frecuencia de muestreo proporcionada por este bioanalizador manual, dependiendo de las condiciones hidrodinámicas del sistema. Para ello, se registraron las intensidades de corriente tras realizar inyecciones de 500 μL de disoluciones patrón de ácido D-láctico y ácido L-láctico de concentraciones comprendidas entre 3×10^{-3} y 9×10^{-3} g L^{-1} , trabajando a diferentes caudales. Los resultados obtenidos con el biosensor de ácido D-láctico y el biosensor de ácido L-láctico se muestran en las **Figuras 67a** y **67b**, respectivamente.

De entre los valores estudiados, se escogió $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, ya que a ese caudal la frecuencia de muestreo es superior con respecto a las proporcionadas a caudales más bajos, sin observar una mejora significativa para ambos biosensores por encima de esa velocidad de flujo, como se muestra en la representación del tiempo de registro de pico obtenido a cada caudal (Figura 67c).

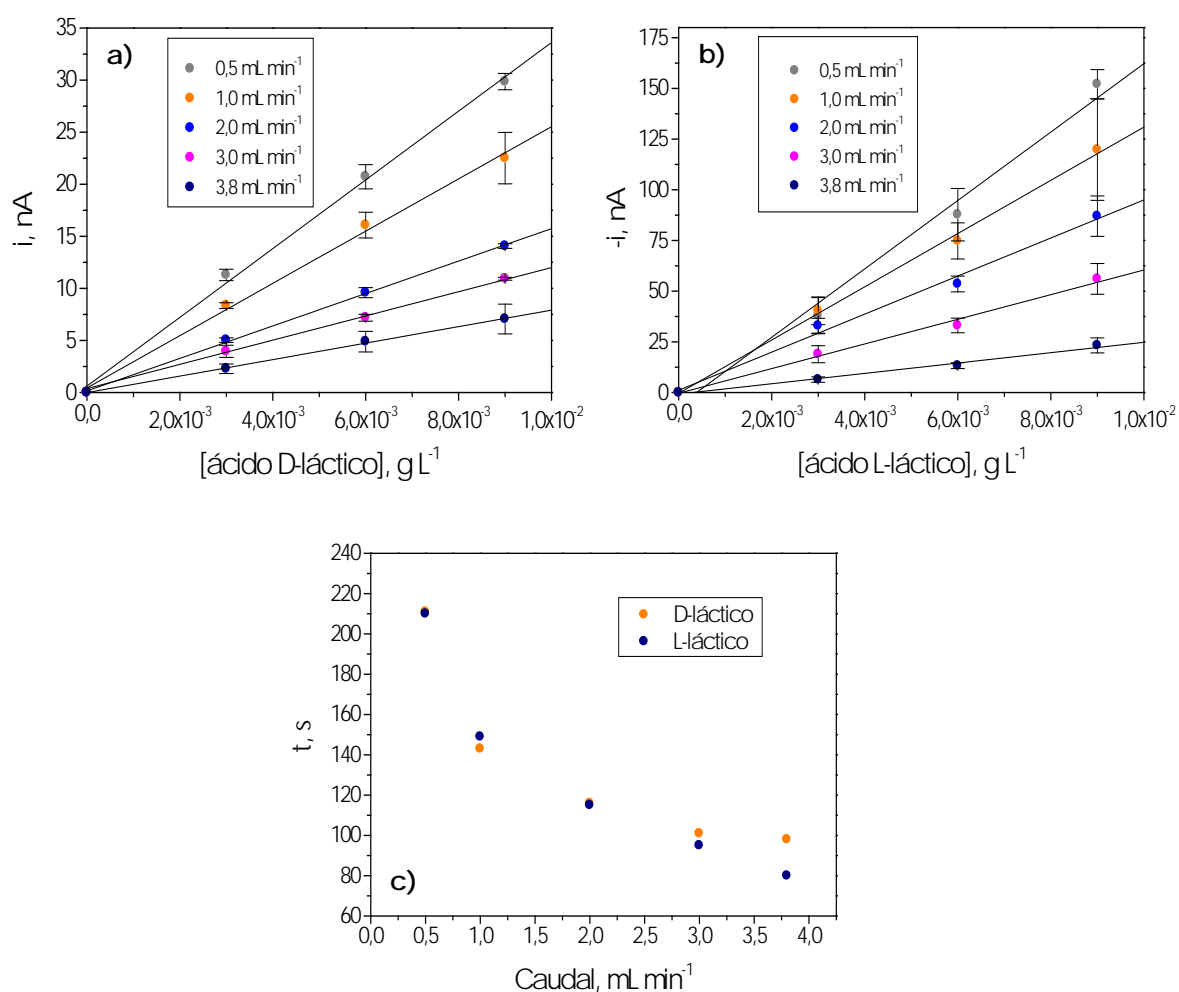


Figura 67. (a, b) Intensidades de corriente registradas al inyectar $500 \mu\text{L}$ de disoluciones patrón de ácido D-láctico (a) y de ácido L-láctico (b) de concentraciones crecientes trabajando con diferentes caudales para el portador. (c) Tiempos de registro de pico para los caudales ensayados en las Figuras (a) y (b). Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . E_{ap} (biosensor ácido D-láctico) = $+0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. E_{ap} (biosensor ácido L-láctico) = $0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Por otro lado, la sensibilidad va siendo menor al aumentar el caudal de trabajo (Tabla 37), pero este fenómeno puede ser compensado teniendo en cuenta

que con una baja sensibilidad se requiere menor grado de dilución de las muestras antes de introducirlas en el sistema FIA, con lo que se reducen los posibles errores sistemáticos en la determinación de las concentraciones de los analitos derivados de la dilución de las muestras.

Tabla 37. Pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 67.

Biosensor	Caudal, mL min ⁻¹	Pendiente, nA g ⁻¹ L	O.o, nA	r
D-láctico	0,5	(3,3 ± 0,1)x10 ³	0,6 ± 0,7	0,9987
	1,0	(2,5 ± 0,1)x10 ³	0,4 ± 0,6	0,9983
	2,0	(1,56 ± 0,03)x10 ³	0,2 ± 0,2	0,9996
	3,0	(1,16 ± 0,05)x10 ³	0,4 ± 0,3	0,9991
	3,8	(7,9 ± 0,2)x10 ²	0,0 ± 0,1	0,9994
L-láctico	0,5	(1,7 ± 0,1)x10 ⁴	-6 ± 8	0,9932
	1,0	(1,31 ± 0,04)x10 ⁴	0 ± 3	0,9988
	2,0	(9,4 ± 0,6)x10 ³	1 ± 3	0,9960
	3,0	(6,1 ± 0,4)x10 ³	0 ± 2	0,9961
	3,8	(2,6 ± 0,2)x10 ³	-1 ± 1	0,9940

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

A la vista de los resultados obtenidos se escogió 3 mL min⁻¹ como caudal de trabajo del sistema FIA para estudios posteriores.

Con respecto al volumen de inyección, segundo parámetro característico del sistema FIA, teniendo en cuenta el caudal alto al que se decidió trabajar y la magnitud de las señales medidas, y con objeto de obtener una sensibilidad suficiente, no se consideró trabajar con un volumen de bucle inferior a 500 µL.

3.3.1.3.2. Estudios de estabilidad

En este apartado se ha estudiado el tiempo de vida de los biosensores de ácido D-láctico y ácido L-láctico empleándolos como detectores en el bioanalizador manual y se ha evaluado la repetitividad de las señales amperométricas registradas en la medida en flujo de patrones.

Para estudiar la repetitividad de los picos FIA se realizaron 20 inyecciones sucesivas de disolución patrón de ácido D-láctico y ácido L-láctico de concentración $8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ para cada especie. Los fiagramas obtenidos en la medida del isómero D- y en la medida del isómero L- se muestran en las **Figuras 68a** y **68b**, respectivamente. Los valores obtenidos para la desviación estándar de las señales fueron de 2,3 % para el biosensor de ácido D-láctico y de 1,6 % para el biosensor de ácido L-láctico. Estos resultados indican una buena repetitividad de las señales amperométricas en flujo para ambos biosensores.

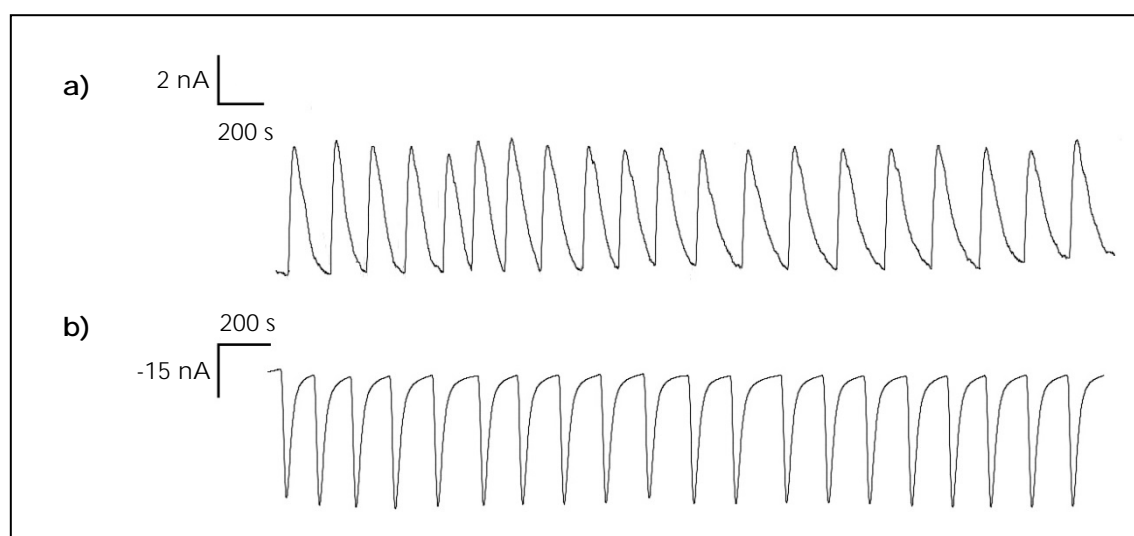


Figura 68. Fiagramas correspondientes a 20 medidas sucesivas registradas al inyectar $500 \mu\text{L}$ de disolución patrón de concentración 8 mg L^{-1} de ácido D-láctico (**a**) y ácido L-láctico (**b**). Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Caudal de trabajo: $3,0 \text{ mL min}^{-1}$.

$$E_{ap}(\text{biosensor ácido D-láctico}) = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl. } E_{ap}(\text{biosensor ácido L-láctico}) = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl.}$$

En cuanto a la estabilidad de los biosensores con el tiempo, se estudió representando en un gráfico de control las intensidades de corriente de pico

medidas con el bioanalizador FIA manual, trabajando en las condiciones establecidas, correspondientes a los patrones $4 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ de ácido D-láctico y $9 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ de ácido L-láctico. Los biosensores se almacenaron en disolución reguladora fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 a 4°C (para el biosensor de ácido D-láctico) y -15°C (para el biosensor de ácido L-láctico) durante el estudio. En la **Figura 69** se muestran los gráficos de control construidos tomando como valor central la media de 4 medidas sucesivas de los patrones de ácido láctico obtenidos el primer día de trabajo de los biosensores, y como valor de los límites superior e inferior de control la media $\pm 3s$ (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

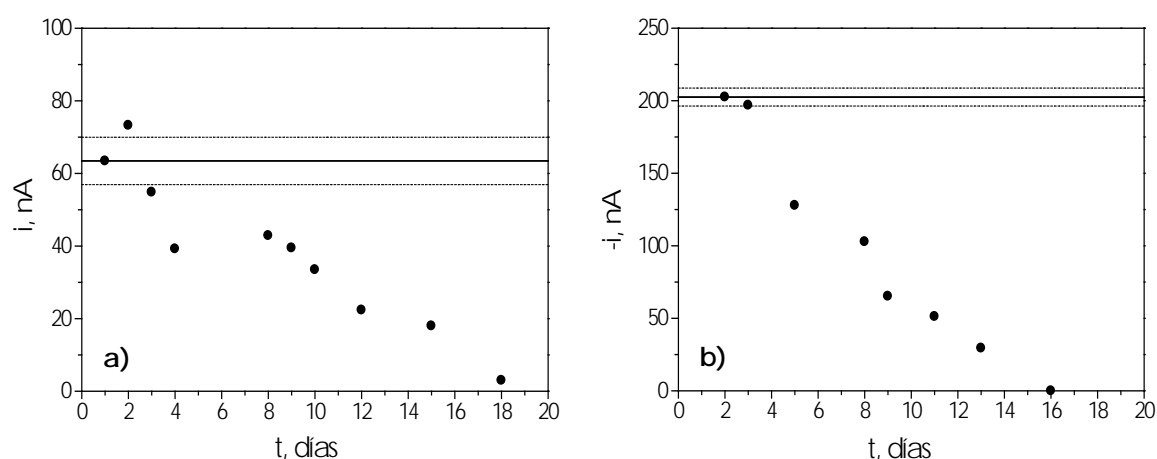


Figura 69. (a) Estabilidad del biosensor de ácido D-láctico. Intensidades de corriente registradas durante 18 días para un mismo biosensor. (b) Estabilidad del biosensor de ácido L-láctico. Intensidades de corriente registradas durante 16 días para un mismo biosensor.

Como se puede observar en los gráficos, los biosensores van perdiendo señal de manera progresiva con los días de trabajo. A pesar de esta disminución se pueden considerar operativos mientras proporcionen resultados reproducibles en los análisis de muestra. Esto ocurre durante aproximadamente 12 días en el caso del biosensor de ácido D-láctico, a partir de los cuales la señal ya había disminuido cerca de un 65 %, y durante 13 días para el biosensor de L-láctico para el que la señal disminuyó hasta en un 85 %. Este comportamiento se promedió para los cinco biosensores, de cada analito, con los que se repitió este estudio. En los tiempos de vida considerados para cada biosensor se analizaron alrededor de 100

muestras y 90 muestras con cada uno de los biosensores de ácido D-láctico y de ácido L-láctico, respectivamente, empleados para este estudio.

3.3.1.3.3. Curvas de calibrado y características analíticas

Trabajando con el bioanalizador manual desarrollado en las condiciones experimentales seleccionadas, se obtuvieron las curvas de calibrado empleando los dos biosensores de los isómeros del ácido láctico. Con el biosensor de ácido D-láctico se estudió la dependencia de la intensidad de corriente con la concentración en el intervalo comprendido entre $1,5 \times 10^{-3}$ y $2,3 \times 10^{-2}$ g L⁻¹ (Figura 70a), y en el caso del biosensor de ácido L-láctico en el intervalo comprendido entre $5,0 \times 10^{-5}$ y $2,5 \times 10^{-2}$ g L⁻¹ (Figura 70b).

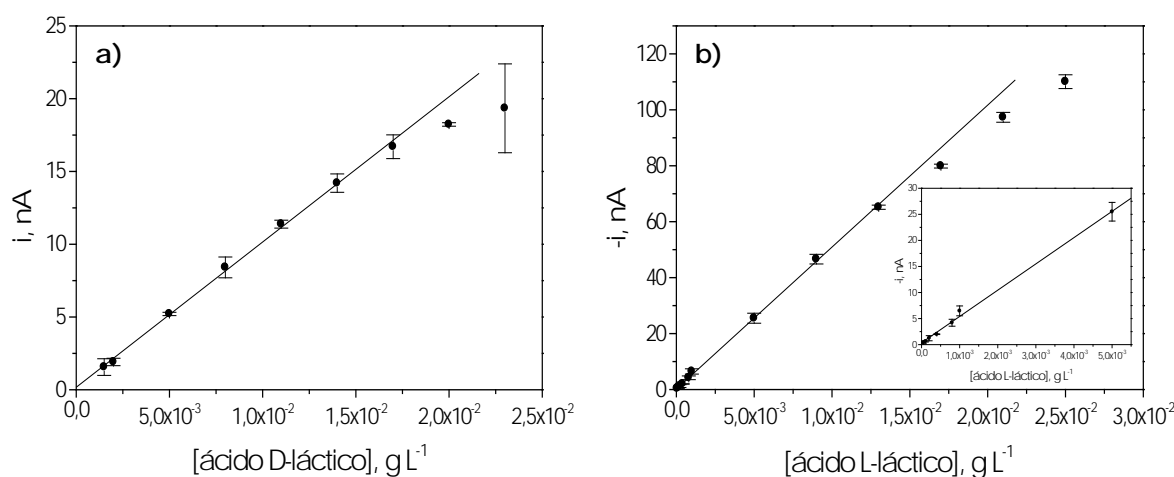


Figura 70. Curvas de calibrado obtenidas a partir de los registros intensidad-tiempo para inyecciones de 500 μ L de disoluciones patrón de ácido D-láctico (a) y ácido L-láctico (b) de concentraciones crecientes. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 y NAD⁺ 1 mmol L⁻¹. Caudal de trabajo: 3,0 mL min⁻¹. E_{ap} (biosensor ácido D-láctico) = +0,15 V vs. Ag/AgCl. E_{ap} (biosensor ácido L-láctico) = 0,0 V vs. Ag/AgCl. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Para establecer el intervalo lineal de los calibrados y estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado como criterios los indicados anteriormente en el Apartado 3.3.1.1.3. En la **Tabla 38** se muestran las características analíticas determinadas para cada biosensor a partir de los diagramas obtenidos para la construcción de las curvas de calibrado.

Tabla 38. Intervalo de linealidad, pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 70.

Biosensor	Intervalo lineal, g L ⁻¹	Pendiente, nA g ⁻¹ L	O.o, nA	r	LD, g L ⁻¹	LC, g L ⁻¹
Ácido D-láctico	(5,00 – 170)×10 ⁻⁴	(9,9 ± 0,2)×10 ²	0,2 ± 0,2	0,9991	1,5×10 ⁻⁴	5,0×10 ⁻⁴
Ácido L-láctico	(3,900 – 1300)×10 ⁻⁵	(5,04 ± 0,05)×10 ³	0,4 ± 0,3	0,9997	1,2×10 ⁻⁵	3,9×10 ⁻⁵

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

3.3.1.3.4. Análisis de muestras de cerveza

La aplicabilidad del bioanalizador FIA manual desarrollado para el análisis simultáneo de ácido D-láctico y ácido L-láctico en muestras de cerveza se validó comparando los resultados obtenidos en la determinación de ambas especies con los medidos paralelamente con un kit enzimático comercial y con la metodología de amperometría en disoluciones agitadas o discontinuo.

Para el análisis con el bioanalizador, en primer lugar se llevó a cabo la calibración en el intervalo de concentraciones comprendido entre 3×10⁻³ y 1,2×10⁻² g L⁻¹ para ambos isómeros del ácido láctico, realizando inyecciones de 500 µL de disoluciones patrón de concentraciones adecuadas preparadas en la disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Las muestras se prepararon por simple dilución 1:10 en la disolución tampón de trabajo. En la **Tabla 39** se muestran los resultados obtenidos con los tres procedimientos mencionados. En el caso del biosensor de ácido L-láctico el método utilizado para el análisis amperométrico en discontinuo es el validado por InBea Biosensores "Bioanalizador de ácido láctico en muestras de cerveza".

Tabla 39. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de ácido láctico en muestras de cerveza empleando el bioanalizador desarrollado, la metodología de amperometría en discontinuo y el kit enzimático comercial.

[analito], mg L ⁻¹						
Método	Discontinuo		Bioanalizador		Kit	
Muestra	D-láctico	L-láctico	D-láctico	L-láctico	D-láctico	L-láctico
Cerveza 1	65 ± 10 (RSD _{n=3} = 6,4 %)	26 ± 4 (RSD _{n=3} = 6,7 %)	67 ± 6 (RSD _{n=5} = 6,9 %)	25 ± 2 (RSD _{n=5} = 7,0 %)	68 ± 7 (RSD _{n=3} = 4,0 %)	26 ± 5 (RSD _{n=3} = 8,0 %)
Cerveza 2	96 ± 11 (RSD _{n=3} = 4,8 %)	94 ± 6 (RSD _{n=3} = 2,8 %)	98 ± 5 (RSD _{n=10} = 6,8 %)	92 ± 3 (RSD _{n=10} = 4,2 %)	99 ± 11 (RSD _{n=3} = 4,4 %)	93 ± 12 (RSD _{n=3} = 5,3 %)
Cerveza 3	84 ± 8 (RSD _{n=3} = 3,4 %)	58 ± 9 (RSD _{n=3} = 6,1 %)	84 ± 10 (RSD _{n=5} = 9,2 %)	58 ± 5 (RSD _{n=5} = 6,9 %)	86 ± 3 (RSD _{n=5} = 3,2 %)	60 ± 4 (RSD _{n=5} = 5,9 %)
Cerveza 4	78 ± 10 (RSD _{n=5} = 9,8 %)	32 ± 4 (RSD _{n=5} = 9,9 %)	78 ± 3 (RSD _{n=10} = 5,8 %)	33 ± 2 (RSD _{n=10} = 9,6 %)	77 ± 8 (RSD _{n=3} = 4,1 %)	30 ± 4 (RSD _{n=3} = 6,0 %)
Cerveza 5	59 ± 7 (RSD _{n=5} = 9,8 %)	51 ± 5 (RSD _{n=5} = 8,4 %)	58 ± 7 (RSD _{n=5} = 9,9 %)	52 ± 6 (RSD _{n=5} = 8,6 %)	59 ± 10 (RSD _{n=3} = 7,1 %)	53 ± 14 (RSD _{n=3} = 8,6 %)

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

La validación de los resultados se ha llevado a cabo comparando las tres metodologías de análisis empleando el método de las rectas de regresión, obteniendo las representaciones mostradas en la **Figura 71**.

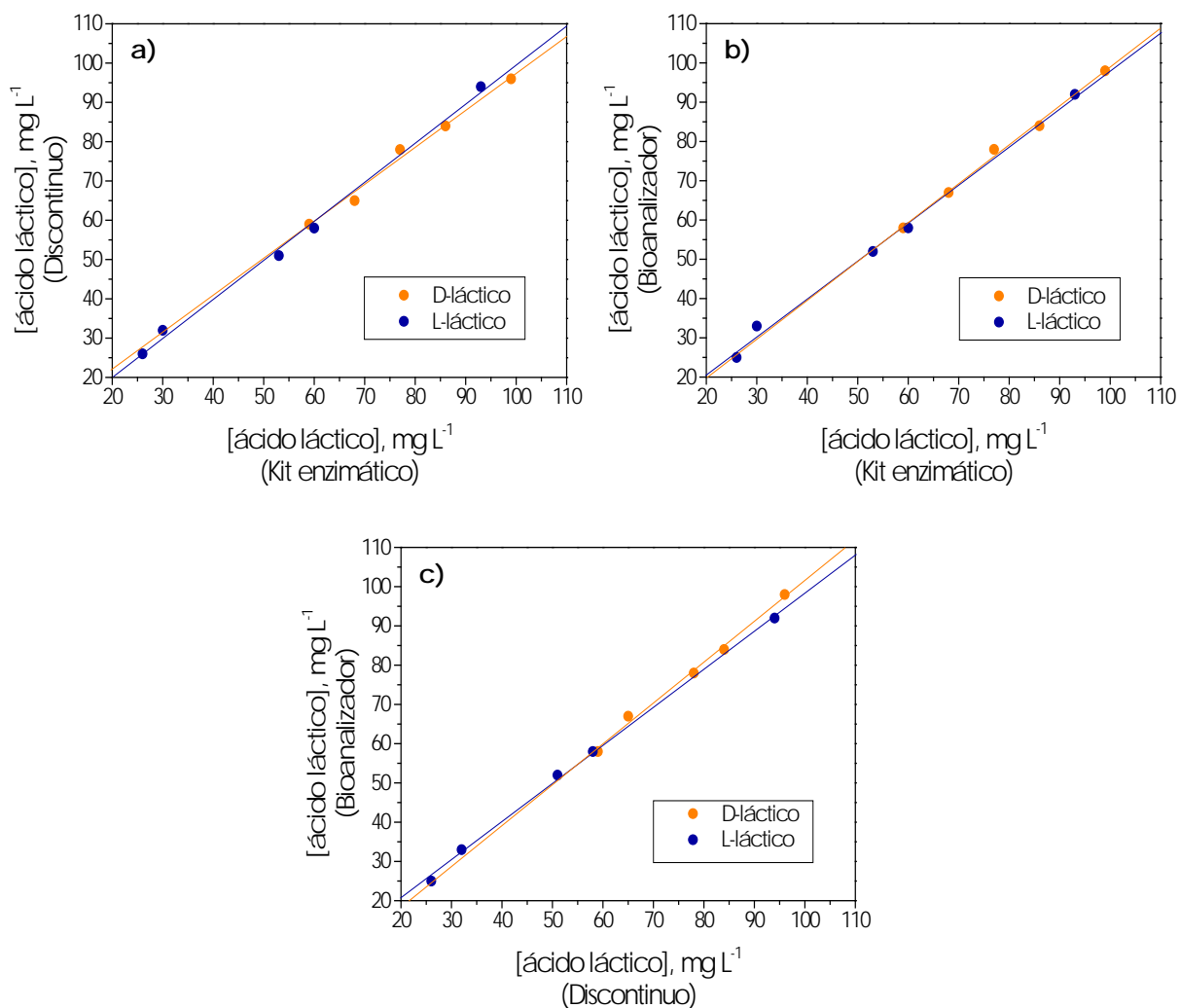


Figura 71. Comparación de los resultados obtenidos para el análisis del contenido de ácido láctico en cervezas: **(a)** empleando el biosensor de ácido D-láctico y el biosensor de ácido L-láctico en amperometría en discontinuo frente a los resultados obtenidos con el kit enzimático comercial, **(b)** empleando el bioanalizador manual desarrollado frente a los resultados obtenidos con el kit enzimático comercial, **(c)** empleando el bioanalizador manual desarrollado frente a los resultados obtenidos con los biosensores trabajando en amperometría en discontinuo.

Asimismo, los valores de la pendiente, la ordenada en el origen y el coeficiente de correlación correspondientes a dichas rectas de regresión se recogen en la **Tabla 40**.

Tabla 40. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de ácido láctico en muestras de cerveza empleando el bioanalizador desarrollado, la metodología de amperometría en discontinuo y el kit enzimático comercial.

Métodos a comparar	Analito	Pendiente	O.o	r
Amperometría en discontinuo vs. Kit enzimático	D-láctico	0,95 ± 0,06	3 ± 5	0,994
	L-láctico	0,99 ± 0,04	0 ± 2	0,998
Bioanalizador vs. Kit enzimático	D-láctico	0,99 ± 0,04	0 ± 3	0,998
	L-láctico	0,97 ± 0,04	1 ± 2	0,998
Bioanalizador vs. Amperometría en discontinuo	D-láctico	1,04 ± 0,05	-2 ± 4	0,997
	L-láctico	0,97 ± 0,03	1 ± 1	0,999

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Como se puede observar en la tabla, en todos los casos los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen incluyen el 1 y el 0, respectivamente, por lo que se puede afirmar que el método desarrollado para la determinación simultánea de los dos isómeros del ácido láctico en muestras de cerveza con el bioanalizador FIA manual es adecuado, además de haber revalidado la metodología de amperometría en disoluciones agitadas para ambos biosensores. Asimismo, los valores del coeficiente r obtenidos son indicativos de la buena correlación de los resultados proporcionados por las tres metodologías empleadas.

Por último, a modo de ejemplo, en la **Figura 72**, se muestran unos diagramas obtenidos en el análisis simultáneo de los dos isómeros del ácido láctico en una muestra de cerveza.

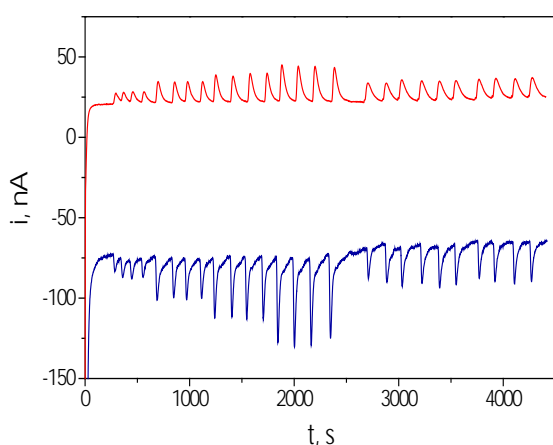


Figura 72. Diagramas obtenidos para la inyección por cuadruplicado de disoluciones patrón de concentraciones $3,0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, $6,0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, $9,0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ y $1,2 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ de ácido D-láctico y ácido L-láctico, y 10 inyecciones sucesivas de una muestra de cerveza diluida 10 veces. (---) Biosensor de ácido D-láctico, (---) Biosensor de ácido L-láctico. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Caudal de trabajo: $3,0 \text{ mL min}^{-1}$. E_{ap} (biosensor ácido D-láctico) = $+0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. E_{ap} (biosensor ácido L-láctico) = $0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

3.3.2. Automatización de los bioanalizadores

3.3.2.1. Bioanalizador automatizado de etanol

En este apartado se describe el desarrollo de un bioanalizador automatizado que permita la monitorización de etanol en cervezas de baja graduación alcohólica ya sea durante el proceso de elaboración o en el producto final. El prototipo se va a diseñar de manera que se pueda configurar como un instrumento analítico tanto para el análisis "on-line", si la monitorización de etanol se va a llevar a cabo en la misma línea de producción, como para el análisis "off-line", si la determinación de la concentración de etanol en muestras de cerveza se va a realizar en el laboratorio. El punto de partida para este desarrollo fueron los sistemas de flujo manuales, tanto en continuo como en el sistema FIA, estudiados anteriormente (Apartado 3.3.1.1). Por lo que respecta al "hardware" y al "software" del Sistema de Control, fue requerida la colaboración del Grupo HCTLab de la Escuela Politécnica Superior de la UAM para el desarrollo de la microelectrónica y de la aplicación informática, necesarias para el funcionamiento y control del bioanalizador automatizado. Por último, para el prototipo desarrollado, se deben estudiar las características operacionales y evaluar su aplicabilidad para la monitorización del contenido de etanol en muestras de cerveza.

En el desarrollo del "software" para el control del bioanalizador "on-line" se aplicaron dos metodologías relacionadas con las que se desarrollaron previamente en los prototipos manuales (Apartado 3.3.1.1), cuyas características eran las siguientes:

- *Monitorización en continuo:* en el sistema de flujo se hace llegar al detector muestra de manera continua, obteniéndose registros de intensidad-tiempo en los que la señal amperométrica alcanza el estado estacionario. Para esta metodología se escogió como detector de etanol el biosensor compuesto de grafito-Teflón.
- *Monitorización en discontinuo o de manera periódica:* el sistema de flujo proporciona al detector volúmenes exactos de muestra, diseñando, por tanto, un sistema FIA automatizado. En este caso, el detector de etanol

seleccionado fue el biosensor de acero inoxidable con capa delgada de oro depositada por "sputtering" debido a su mayor sensibilidad.

3.3.2.1.1. Diseño del prototipo automatizado

En este apartado se llevó a cabo la sustitución de los componentes empleados en los bioanalizadores manuales por aquellos que posibilitaban un control automático de los mismos mediante una aplicación informática, además de sustituir algún dispositivo no controlable, como es el caso de la célula de flujo.

El proceso de desarrollo del bioanalizador automatizado ha comprendido los diseños mecánico y electrónico, así como el desarrollo de las diferentes aplicaciones informáticas para el control y la toma de decisiones adecuados para la monitorización de etanol en muestras de cervezas. A continuación se describirá dicho proceso.

3.3.2.1.1.1. Diseño mecánico del instrumento

En primer lugar, se hizo necesario rediseñar el sistema de flujo y estudiar la distribución de todos los componentes de modo que fuera posible integrar tanto la fluidica como la electrónica del instrumento en un dispositivo único.

Con respecto a los **componentes del sistema de flujo**, se sustituyeron algunos de los que componían los bioanalizadores manuales por nuevos desarrollos y componentes comerciales cuyas características dimensionales y electrónicas permitían implementarlos en un sistema de flujo automático.

Célula electroquímica de flujo: con el objetivo de facilitar la integración de este elemento en el interior de un equipo analítico, se llevó a cabo el desarrollo de una nueva célula de flujo. Así, el nuevo diseño, mostrado en la **Figura 73**, se trata de una célula de flujo cilíndrica de pequeño volumen (μL) en la que tanto el biosensor como los electrodos auxiliar y de referencia están en contacto con la misma disolución portadora. Sin embargo, en este nuevo diseño, el electrodo auxiliar es el canal de salida del desecho de la célula (acero inoxidable) y la disolución portadora

se introduce en ésta a través de un tubo de Teflón, llegando a la superficie del biosensor a través de un pequeño canal integrado en la célula. Este diseño de célula electroquímica resulta ventajoso frente al de la célula "wall-jet" de gran volumen ya que posibilita: el desplazamiento por gravedad de las posibles burbujas generadas en el sistema de flujo que alcanzan la superficie del biosensor y su evacuación fuera de la célula junto con el desecho por arrastre del flujo portador, evitando de este modo que permanezcan estáticas en la superficie del biosensor y puedan provocar irreproducibilidad en las medidas analíticas; disminuir las dimensiones del instrumento donde se quiere implementar, ya que no necesita estar suspendido en altura debido a la orientación de la entrada de la disolución portadora, al contrario de lo que sucedía con el diseño "wall-jet" de gran volumen; y la fácil inserción del biosensor en la célula, ya que la colocación del mismo viene prefijada por el diseño de la célula y no va a depender, por lo tanto, de la pericia del operador.

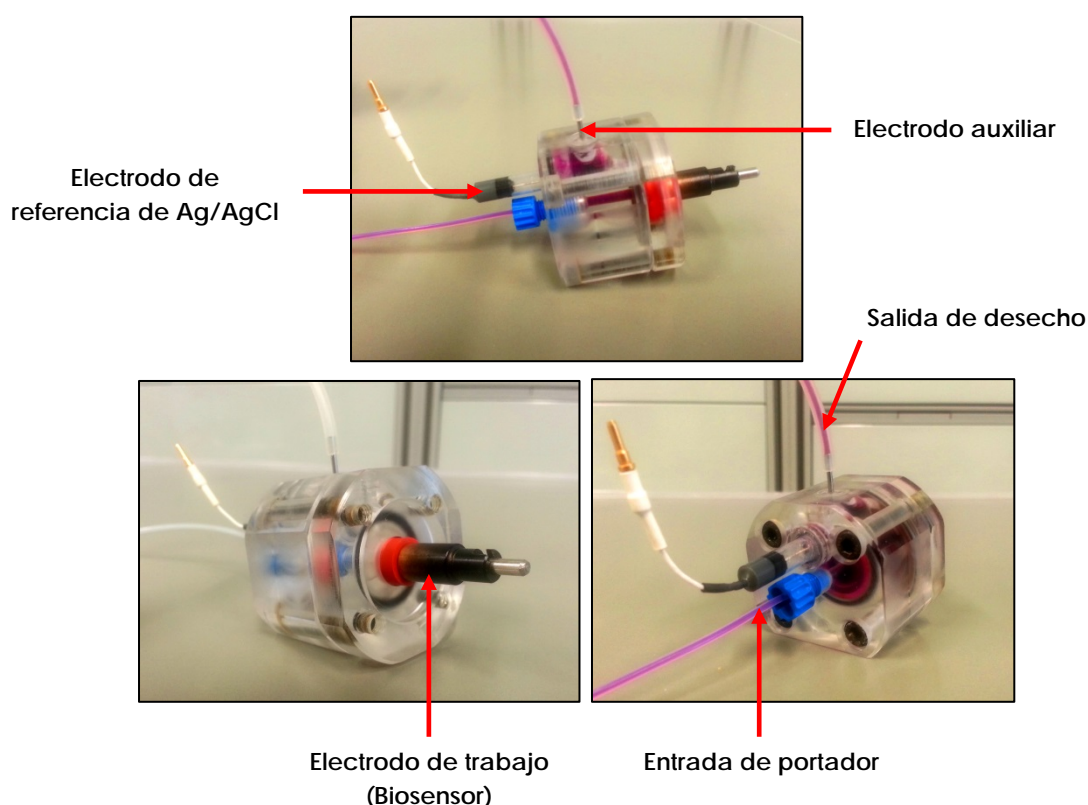


Figura 73. Célula cilíndrica de pequeño volumen.

Válvulas: para posibilitar el control automático de las válvulas y, por lo tanto, del sistema de flujo, se hizo necesario sustituir las válvulas manuales de tres vías con llave por electroválvulas de tres vías (**Figura 74**) que serán controladas electrónicamente (X-Valve 8 mm switching solenoid valves, X112LFB model, SensorTechnics).

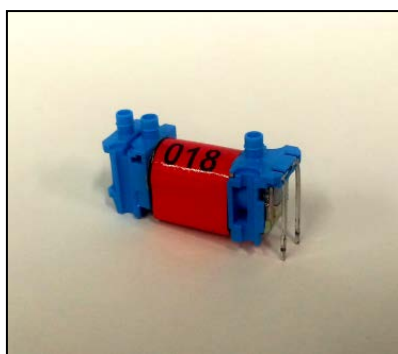


Figura 74. Electroválvula de dos entradas y una salida.

Bombas peristálticas: como componente propulsor de las disoluciones y muestras en el sistema de flujo se emplearon bombas peristálticas del modelo presentado en la **Figura 75**, por ser el que mejor funcionamiento demostró entre los modelos de bombas miniaturizadas ensayadas que posibilitaban su integración en un dispositivo compacto. Al igual que las válvulas, estos dispositivos serán controlados electrónicamente.

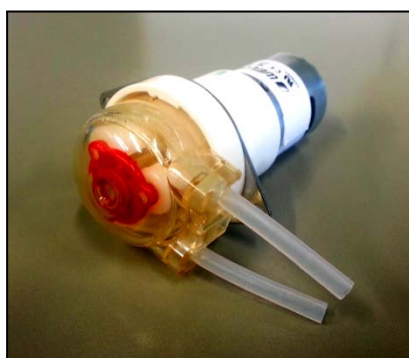


Figura 75. Bomba peristáltica modelo WPM de Welco.

Sistema de inyección: la válvula de inyección de seis vías manual se sustituyó por el sistema de inyección que se muestra en la **Figura 76**, el cual está formado por tres electroválvulas de tres vías y un bucle de volumen variable. Además, es necesario el empleo de dos bombas peristálticas en dicho sistema: una "Bomba peristáltica A", que trabaja de manera intermitente, para llenar el bucle con patrón o muestra, y una "Bomba peristáltica B", que se mantiene activa de manera continua para llevar la disolución portadora o el volumen contenido en el bucle hacia el detector. Dicha configuración está basada en técnicas de rutado mediante matrices de conmutación, aunque de una forma muy simplificada. Esta técnica, a otro nivel, se corresponde con la metodología aplicada en el enrutamiento de las llamadas a través de las redes telefónicas.

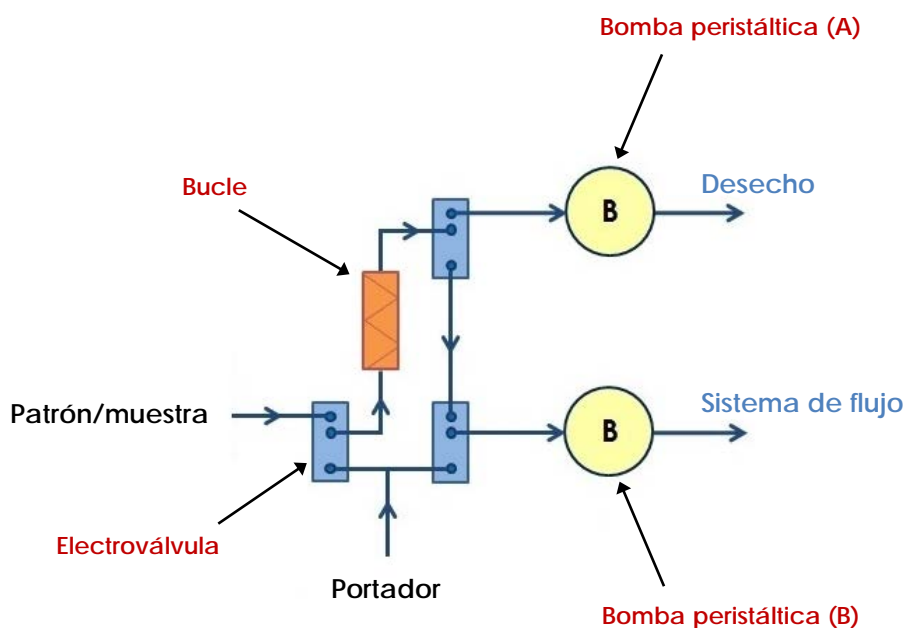


Figura 76. Sistema de inyección implementado en el prototipo de bioanalizador automatizado.

Por lo tanto, con respecto a los componentes que constituyen el sistema de flujo, de los prototipos manuales se conservaron el dispositivo desgasificador y la unidad muestreadora, ambos diseños con diferentes dimensiones.

En referencia al **sistema de flujo**, se diseñó una única configuración de válvulas, bombas y circuito de flujo con objeto de que el mismo prototipo pudiera

ser empleado para monitorizar el etanol en cerveza trabajando tanto como sistema de flujo en continuo (introduciendo patrones y muestras de manera ininterrumpida) como sistema FIA (introduciendo volúmenes discretos de patrones y muestras). Lógicamente, dependiendo del tipo de monitorización de etanol con la que se trabaje se utilizarán distintos componentes, activados y desactivados en el orden correspondiente, para obtener las respuestas analíticas adecuadas. En la **Figura 77a** se muestra el esquema general del prototipo de bioanalizador, y en la **Figura 77b** la disposición física de los componentes del sistema de flujo empleada dentro del prototipo automatizado.

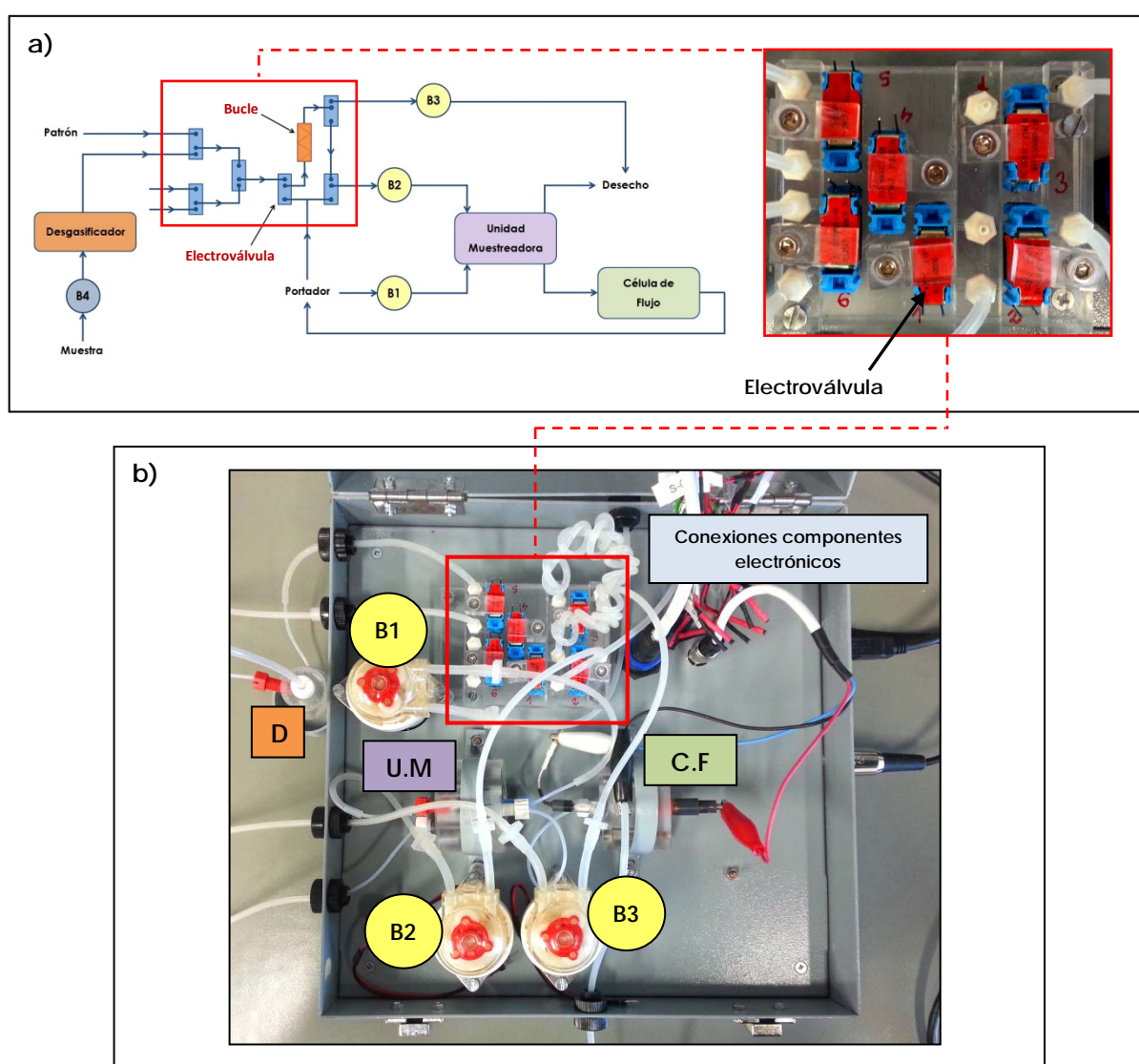


Figura 77. (a) Esquema del sistema de flujo del prototipo automatizado y placa de metacrilato con las válvulas para la gestión de la hidrofluídica. **(b)** Vista superior del bioanalizador de etanol automatizado. **Abreviaturas:** D: Desgasificador. B: Bomba peristáltica. UM: Unidad muestreadora. CF: Célula de flujo.

Para llevar a cabo la instalación de dichos componentes, se tuvieron que tener en cuenta las dimensiones y la función de cada uno para adecuar su ubicación en el bioanalizador durante el proceso de mecanizado, además de considerar la existencia de canales de entrada y de salida de flujo de cara a la construcción del instrumento.

Como se puede observar en la Figura 77a, el conjunto de conductos y válvulas que constituyen el gestor de flujo del sistema fue integrado en un dispositivo compacto de metacrilato en el que se implementaron todas las electroválvulas y conectores necesarios para el acoplamiento del sistema de tuberías. Este dispositivo fue diseñado con nueve entradas de flujo, las cuales se configuran como entradas o salidas de disolución en función del modo de trabajo del instrumento. El control del sistema de flujo se posibilita a través de la conexión de los componentes electrónicos (válvulas y bombas) al sistema gestor del bioanalizador, de modo que la activación y desactivación de estos componentes se dé de manera automática.

En la **Figura 78a** se muestra el esquema correspondiente al **bioanalizador automatizado "on-line" en continuo**, mientras que en la **Figura 78b** se muestra el esquema del **bioanalizador "on-line" FIA**. En dichos esquemas, las flechas de color azul indican las partes del bioanalizador general que se utilizan en cada una de las aplicaciones, mientras que las flechas de color gris indican las partes del bioanalizador general no empleadas en cada aplicación.

Por otro lado, se ha incluido en los esquemas de flujo una cuarta bomba peristáltica empleada para la alimentación del dispositivo desburbujeador (Figura 75). Esta bomba no sería necesaria al implementar el bioanalizador automatizado en la línea de producción de la fábrica para la monitorización "on-line". Por ello, la bomba B4 no fue incluida en el sistema de flujo del instrumento desarrollado y, por lo tanto, no fue considerada como componente a ser controlado de manera automática.

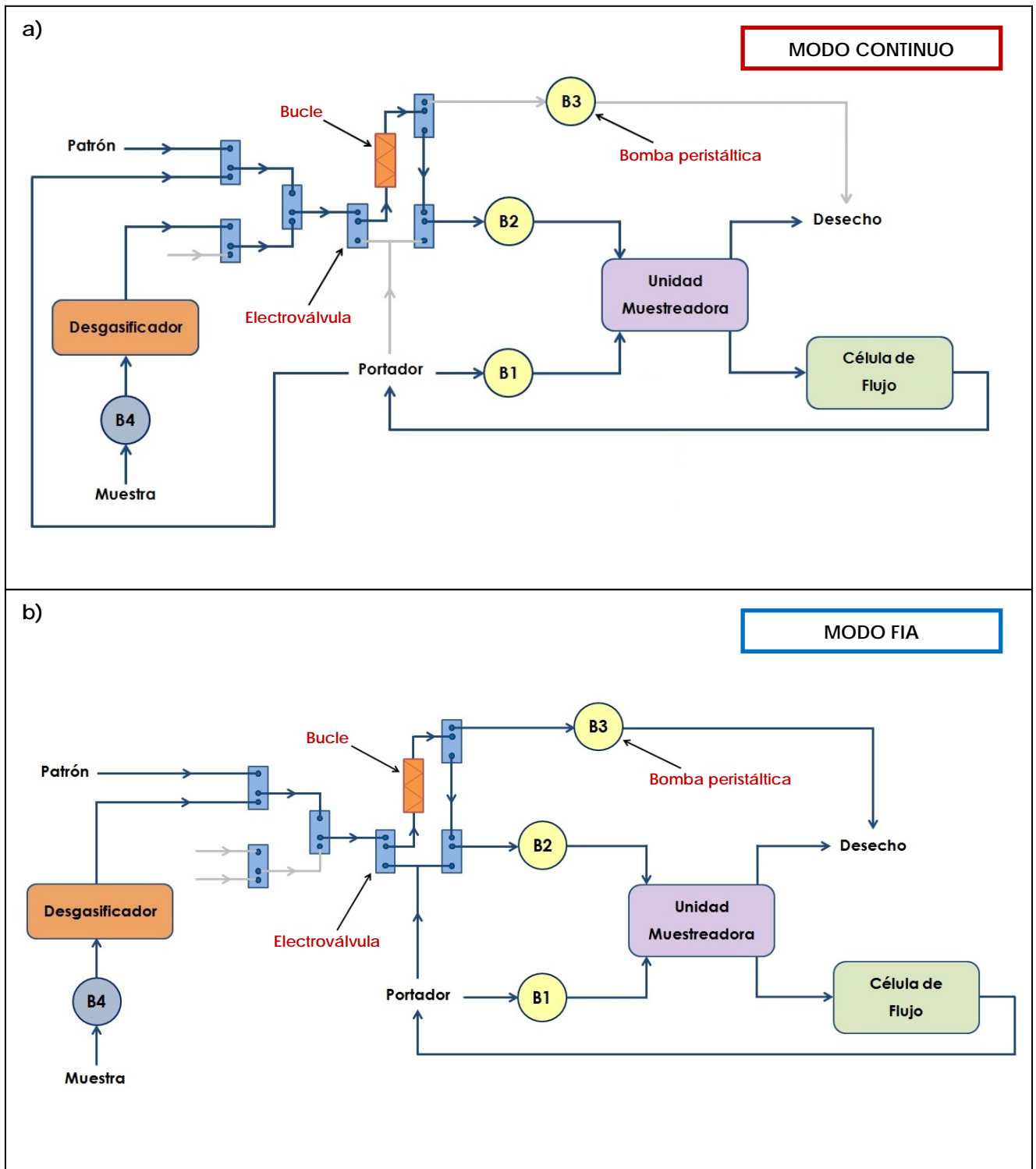


Figura 78. Esquemas del sistema de flujo del bioanalizador automatizado para la monitorización "on-line" de etanol en cerveza trabajando en modo continuo (a) y trabajando en modo FIA (b). Canales activos (—) y canales inactivos (---) configurados para cada modo de trabajo.

Por último, en el caso de la monitorización "off-line", para la que se estableció que sólo se aplicara al análisis por inyección en flujo (modo FIA de medida), el bioanalizador permite establecer, con respecto al sistema de válvulas, varias entradas de disolución patrón o de cerveza, una entrada de portador y dos salidas de flujo, como se muestra en el esquema de la **Figura 79**. Por lo tanto, en la realización de un análisis "off-line", empleando el bioanalizador automatizado, el módulo de válvulas realiza la labor de un selector de muestras.

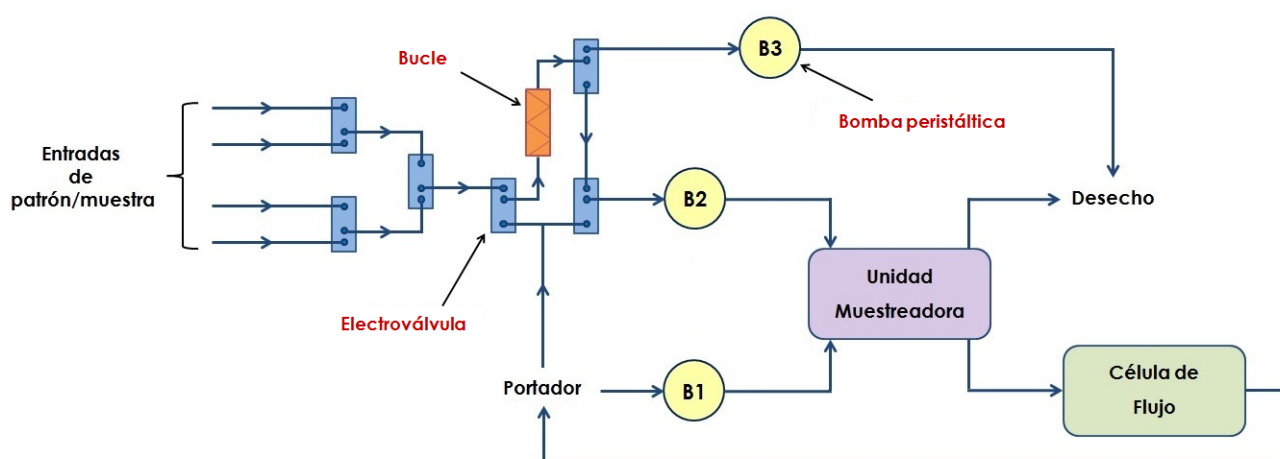


Figura 79. Esquema del sistema de flujo del bioanalizador automatizado para la monitorización "off-line" de etanol en cerveza trabajando en modo FIA.

3.3.2.1.1.2. Diseño electrónico del instrumento

Dos son las partes del bioanalizador que es necesario controlar de forma automatizada (**Figura 80**). Por un lado el **detector amperométrico**, que proporciona el potencial de medida y adquiere los valores de intensidad de corriente generada en el biosensor, y por otro lado una **interfase activa** o gestor del instrumento, que permite llevar a cabo el control de los componentes electrónicamente activos del sistema de flujo del bioanalizador (válvulas y bombas).

Asimismo, se tiene una **conexión ordenador-detector amperométrico**, que posibilita el control de las diferentes variables experimentales a aplicar por el detector amperométrico y el registro de los datos de intensidad de corriente

generados; una **conexión ordenador-interfase activa**, que posibilita el control del gestor para que actúe sobre los diferentes componentes electrónicos del bioanalizador; y finalmente un **ordenador**, para realizar la adquisición y tratamiento de los datos transmitidos por el bioanalizador, así como el control del detector amperométrico y de la interfase activa. Además, aparte de configurarse como el controlador del sistema de retroalimentación, necesario en un instrumento automatizado para la toma de decisiones dependiendo de las señales amperométricas obtenidas, el ordenador es la parte del instrumento que permite al operador la interacción con el bioanalizador y la visualización en tiempo real de la información obtenida durante el proceso de monitorización del parámetro objeto de estudio.

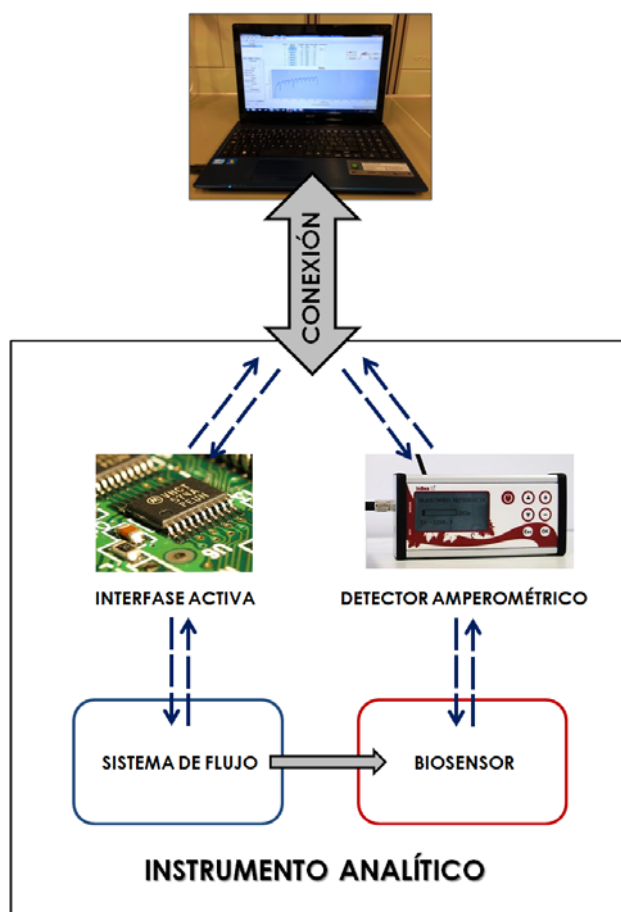


Figura 80. Esquema de los componentes a controlar del bioanalizador para la automatización del instrumento.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los elementos que debían constituir el sistema de control del bioanalizador, se llevó a cabo la instalación en el equipo de los componentes necesarios para el funcionamiento de manera automatizada del prototipo. Como se puede apreciar en la **Figura 81a**, en el interior del instrumento se sitúa el detector amperométrico y la placa de circuito impreso del gestor que controlará las electroválvulas y las bombas peristálticas. En el exterior (**Figura 81b**) se sitúan las conexiones y el encendido del instrumento. La conexión al ordenador se realiza con un conector tipo USB. Por último, el equipo se alimenta con una tensión de 24 V.

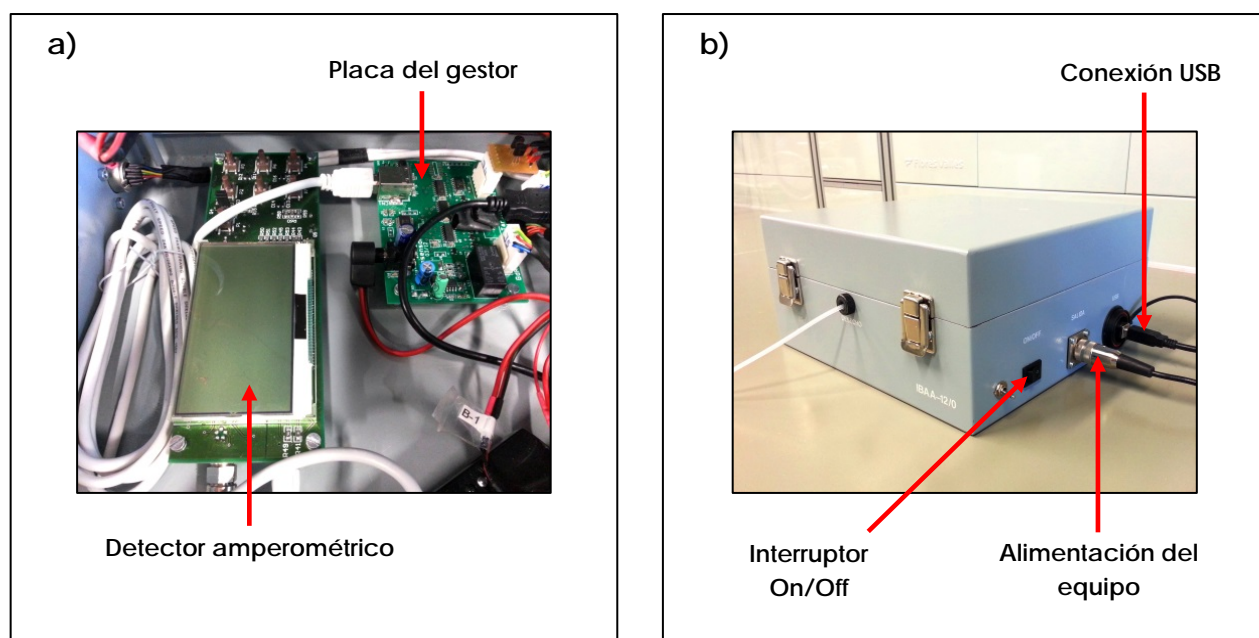


Figura 81. (a) Instalación electrónica del bioanalizador. (b) Aspecto exterior del instrumento analítico desarrollado.

3.3.2.1.1.3. Diseño y desarrollo de los “softwares” de control del instrumento

Para el funcionamiento de manera automatizada del bioanalizador fue necesario el desarrollo de aplicaciones informáticas que permitan obtener un sistema real de “feedback” con respecto a la información registrada. Así, con objeto de poder emplear el mismo prototipo tanto en un análisis “on-line” como “off-line”

conservando en todos los casos la metodología de la calibración unipuntual utilizada en los bioanalizadores manuales, se llevó a cabo el desarrollo de dos "softwares". A continuación se explican las características y los fundamentos sobre el funcionamiento de cada aplicación para cada modo de análisis.

3.3.2.1.1.3.1. Análisis "on-line"

Considerando en primer lugar los elementos de la **interfaz de usuario**, que debían facilitar información al operador durante la monitorización de etanol en cerveza, se decidió que el programa proporcionara la información que se muestra en la **Figura 82**. De este modo, durante el análisis, el operador tiene acceso a la siguiente información:

- Parámetros de registro: en este bloque se muestran las variables experimentales que se están aplicando, como son el potencial de trabajo, el intervalo de tiempo para la captura de un dato de corriente amperométrica o el tiempo de duración del análisis.
- Indicador de proceso: en este bloque se muestra un diagrama simplificado del sistema de flujo que permite hacer un seguimiento de qué disolución está llegando al sensor en todo momento o qué tipo de medida se va a realizar.
- Bloque gráfico: sección de la pantalla donde se va representando en tiempo real el registro intensidad-tiempo que se va obteniendo.
- Concentración de etanol en cerveza: ventana donde van apareciendo las medidas de concentración determinadas en la muestra según van siendo registradas.
- Concentración de patrón: ventana donde se configura la concentración de la disolución patrón que se emplea como referencia para el cálculo de la concentración de etanol en la muestra.

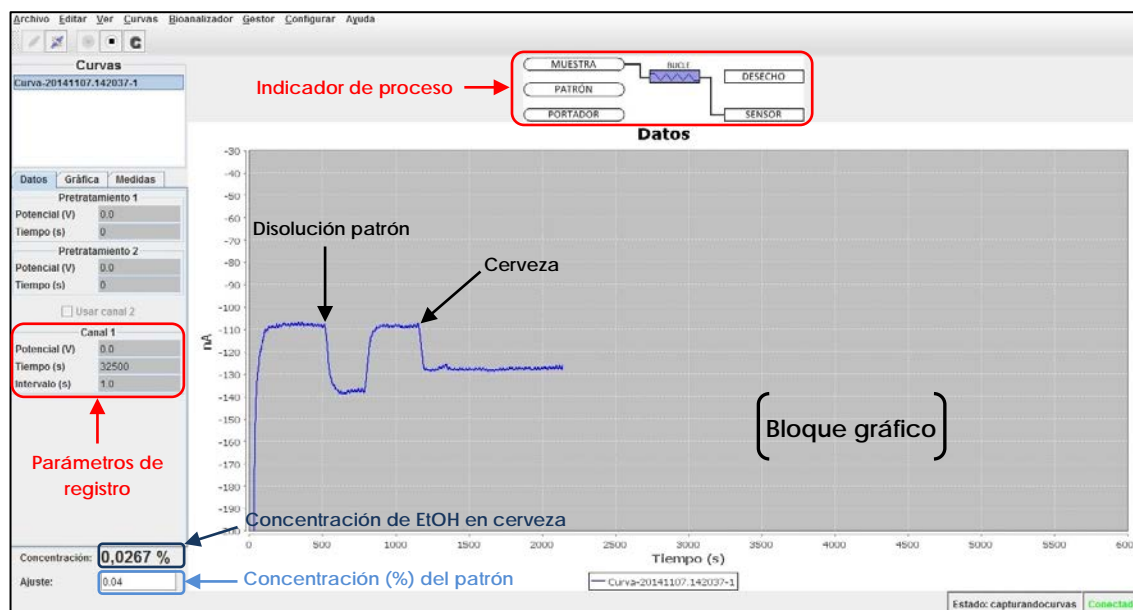


Figura 82. Aspecto de la interfaz de usuario del "software" de control del bioanalizador automatizado para el análisis "on-line" de etanol en cerveza.

Para el control de la aplicación desarrollada fue necesario establecer una serie de **parámetros de configuración**, parametrizables desde un fichero anexo al "software" (Figura 83), a partir de los cuales se posibilite programar un método de análisis y funcionamiento para el bioanalizador y, de este modo, el análisis y la toma de decisiones por parte del sistema se desarrollen en unas condiciones preestablecidas.

```

Archivo Edición Formato Ver Ayuda
T_S_AUTO_CALIB 3600
T_S_REPOSO 60
P_DESVIACION 10
P_NIVEL 0.05
T_S_REINICIO 32500
T_N_ESPERA 1.25
T_N_ESPERA_MUESTRA 1.25
N_MEDIDAS 5
T_S_BETA 120
T_S_CLEAN 3
N_N_MEDIDA 10
P_ALCOHOL_MAX 0.04
T_S_CEBADO 25
T_S_CEBADO_MUESTRA 25
D_VARIANZA 20
T_S_MARGEN_ALCOHOL 1000
T_M_FASE1 5
T_M_FASE2 5
T_M_FASE3 5
P_TOLERANCIA_PATRON 10
N_CAMBIO_PENDIENTE 2
    
```

Figura 83. Fichero con los parámetros de configuración del "software" de control del bioanalizador automatizado.

Así, en función de los resultados que se vayan registrando, y basándose en los parámetros introducidos desde el fichero de configuración de la aplicación, el ordenador mandará órdenes a la interfase activa para que realice las operaciones que en cada momento sean necesarias. En la **Tabla 41** se recoge el compendio de funciones que desempeñan los parámetros de configuración y el modo de trabajo en el que tiene funcionalidad cada uno.

Tabla 41. Funciones de los parámetros de configuración del "software" de control del bioanalizador automatizado mostrados en la Figura 83.

Parámetro	Modo de trabajo	Función
T_S_AUTO_CALIB	Continuo	Tiempo en segundos tras los cuales el sistema realizará automáticamente un recalibrado.
T_S_REPOSO	Continuo/FIA	Tiempo en segundos que se emplean para medir la intensidad de corriente correspondiente a la disolución portadora para verificar la estabilidad de la línea base.
P_DESVIACION	Continuo/ FIA	Porcentaje de desviación de la lectura de la muestra máximo permitido entre 2 medidas consecutivas antes de forzar un recalibrado.
P_NIVEL	Continuo/ FIA	Máxima pendiente de la curva en valor absoluto que se tolera para considerar que la intensidad de corriente correspondiente a la línea base es estable.
T_S_REINICIO	Continuo/ FIA	Factor de tiempo aplicado entre reinicios del bioanalizador.
T_N_ESPERA	Continuo/ FIA	Factor de tiempo empleado para la estabilización de la línea base para que el sistema comience a verificar la estabilización de la intensidad de corriente, antes de la introducción de disolución patrón o de muestra.
T_N_ESPERA_MUESTRA	Continuo	Factor de tiempo empleado desde que el sistema ha realizado un cambio en las válvulas para la introducción de patrón o de muestra hasta que comienza a verificar la estabilización de la intensidad de corriente registrada (y en el caso de la muestra, comienza la lectura de la concentración de etanol).
N_MEDIDAS	FIA	Nº de medidas de muestra a realizar antes de recalibrar con disolución patrón.

Tabla 41. Continuación.

Parámetro	Modo de trabajo	Función
T_S_BETA	FIA	Tiempo en segundos durante el cual se busca el valor extremo del pico amperométrico.
T_S_CLEAN/T_M_FASE	Continuo/ FIA	Tiempo empleado en la limpieza de las diferentes entradas del sistema de flujo en cada fase del programa de limpieza.
N_N_MEDIDA	FIA	Nº de medidas a realizar de la muestra en cada iteración.
P_ALCOHOL_MAX	Continuo/ FIA	Porcentaje máximo de etanol permitido en la medida de concentración de una muestra.
T_S_CEBADO/T_S_CEBADO MUESTRA	FIA	Tiempo en segundos empleado para llenar el bucle de patrón o de muestra.
D_VARIANZA	Continuo/ FIA	Porcentaje de desviación del valor de la intensidad de corriente máximo permitido durante la estabilización de la línea base sin considerar que se debe cambiar el sensor.
T_S_MARGEN_ALCOHOL	Continuo	Tiempo en segundos durante el cual se evalúa si el nivel de etanol ha superado el valor permitido. Transcurrido este tiempo, si supera el valor de concentración de etanol establecido, se fuerza un recalibrado.
P_TOLERANCIA_PATRON	Continuo/ FIA	Porcentaje de desviación de la señal máximo permitido entre 2 medidas consecutivas de patrón antes de forzar un recalibrado.
T_S_CAMBIO_PENDIENTE	Continuo/ FIA	Tiempo en segundos que se emplean para verificar la estabilidad de la línea base (correspondiente a la disolución portadora), durante los cuales se mide la pendiente actual de la curva, y considerar que el cambio de pendiente es suficiente para empezar con la lectura de la medida.
N_CAMBIO_PENDIENTE	Continuo/ FIA	Factor aplicado en el cálculo de la pendiente de la curva amperométrica para considerar que puede dar comienzo la lectura de la medida.

Como se puede deducir de la Tabla 41, existen parámetros que por su función van a ser considerados durante el análisis y otros que tienen una función

activa una vez finalizado el mismo. Estos últimos son los relacionados con la limpieza post-análisis del sistema de flujo, en los cuales se establece el tiempo para llevar a cabo dicha limpieza, dividida en tres fases: una primera fase de limpieza con $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$; una segunda fase en la que se hace pasar agua por todo el sistema; y una tercera fase de secado con aire.

Con respecto a los parámetros con función activa durante el análisis, éstos serán considerados por el sistema en primer lugar en función del modo de trabajo, como se ha indicado en la Tabla 41, y en segundo lugar en función de la etapa del análisis en que se esté desarrollando la acción. De este modo, para el registro de una medida amperométrica se establecieron dos fases bien diferenciadas, correspondientes a la estabilización de la línea base y a la medida propiamente dicha (**Figura 84**), con objeto de designar los parámetros necesarios en cada fase y configurarlos de manera que el registro de una medida amperométrica se diera adecuadamente.

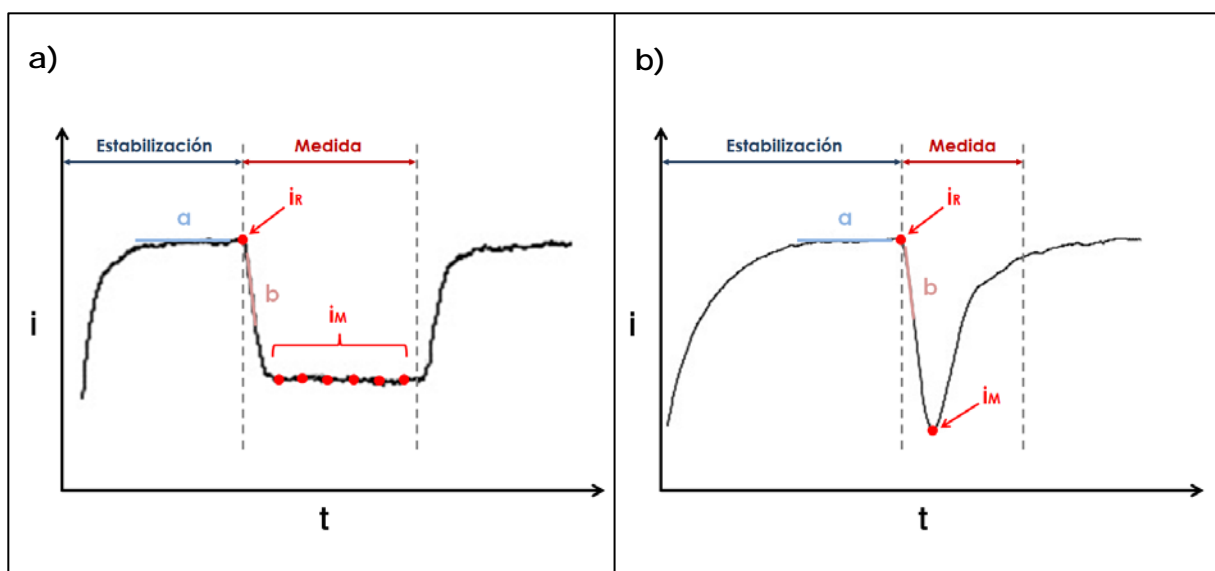


Figura 84. Parámetros involucrados en el registro de una señal amperométrica trabajando en el modo continuo (a) y en el modo FIA (b).

En una primera fase de **estabilización** de la corriente amperométrica, se establece la línea base para emplearla como referencia para el cálculo de la

magnitud de una señal analítica. En esta fase, los parámetros que se deben considerar son T_S_REPOSO, P_NIVEL y T_N_ESPERA, independientemente del tipo de señal a monitorizar (una señal en estado estacionario (**Figura 84a**) o un pico FIA (**Figura 84b**). Los valores introducidos para estos parámetros en el fichero de configuración del "software" deben ser coherentes con el comportamiento de los biosensores, de modo que la estabilización de la corriente y la separación de las señales se den de un modo eficaz y así se posibilite la obtención de medidas analíticas con una reproducibilidad y exactitud adecuadas.

Cuando el sistema considera que la intensidad de corriente correspondiente a la medida de la disolución portadora es estable, éste pasa a llevar a cabo la estimación de " i_R ", que es el valor de la intensidad de corriente en la línea base necesario para la medida exacta de la señal amperométrica. Para que el sistema fije un valor de " i_R " veraz debe apreciar de manera sensible un cambio en la pendiente de la curva amperométrica, ya que puede resultar no válido el valor de intensidad medido durante la estabilización de la señal (puede ocurrir que la pendiente "a" no sea perfectamente horizontal y constante en el tiempo antes del registro de una medida). Esa variación entre la pendiente "a" (pendiente de la línea base en el momento de considerarse estable) y la pendiente "b" (pendiente actual de la curva en el momento de registrarla) se verifica, como se ha indicado anteriormente en la Tabla 41, durante el tiempo establecido en el parámetro T_S_CAMBIO_PENDIENTE, tiempo en el que el sistema busca un valor de N_CAMBIO_PENDIENTE determinado. En el instante en el que se cumpla la condición introducida en el fichero de configuración para estos parámetros, el sistema considerará el valor de intensidad de corriente de la línea base " i_R " y, a partir de ese momento, la corriente registrada ya pertenecerá a la medida de una señal analítica (de patrón o de muestra), con lo que comienza la fase de **medida**. En esta segunda fase, en función del modo de trabajo para la monitorización de la señal, el sistema debe considerar unos parámetros determinados:

- En el *modo continuo* (Figura 81a) el periodo de medida comienza cuando el sistema ha confirmado que la intensidad de corriente registrada correspondiente a la muestra ha alcanzado el estado estacionario, tras un tiempo de verificación establecido dependiente de los parámetros

T_S_REPOSO y de T_N_ESPERA_MUESTRA. A partir de ese instante se realiza el cálculo de la concentración de etanol en la muestra cada segundo para cada valor de " i_M ", medido durante un tiempo establecido a través del parámetro T_S_AUTO_CALIB. Este tiempo es agotado en su totalidad a menos que el sistema registre algún evento que derive en la necesidad de recalibrar, como son los debidos a desviaciones en las señales registradas o a la superación del límite de concentración de etanol en muestra estipulado (Tabla 41).

- En el *modo FIA* (Figura 81b) el periodo de medida transcurre con una duración que depende de los datos introducidos para los parámetros T_S_CEBADO y T_S_BETA. Durante este tiempo el sistema busca el valor máximo del pico amperométrico " i_M " y, una vez consumido ese tiempo, realiza el cálculo de la concentración de etanol. Para establecer los valores correspondientes a esos parámetros de tiempo se debe tomar en consideración que el tiempo necesario para registrar el máximo del pico depende de las dimensiones del sistema de flujo y del caudal de trabajo. Por ello, se determinó que el tiempo aplicado para el llenado del bucle con patrón o con muestra sea considerado para la estimación de ese valor máximo de la curva " i_M ", y así se asegure que en el sistema de flujo se ha llevado a cabo el arrastre del contenido del bucle por parte del portador de manera completa.

Finalizada la etapa de medida, el sistema lleva a cabo los cambios pertinentes en el módulo de válvulas, de modo que se vuelve a iniciar la etapa de estabilización para realizar la siguiente medida una vez alcanzada de nuevo la línea base. En función del método de análisis y de los parámetros de configuración establecidos, ésta corresponderá a la medida de disolución patrón o de muestra. A continuación, a modo de ejemplo, se muestran una serie de imágenes de captura de pantalla para diferentes análisis de cervezas con bajo contenido alcohólico. Así, en primer lugar para el *modo continuo*, en la **Figura 85** se muestra la monitorización de una cerveza "0,0" durante una hora aproximadamente, y el posterior recalibrado para volver a llevar a cabo la medida de muestra. Y en la **Figura 86** se muestra cómo durante el análisis de una cerveza "Sin" se ha detectado un aumento en la concentración de

etanol registrada de modo que se ha superado el límite de concentración de etanol especificado desde el fichero de configuración del "software" (1,0 % (v/v) para el parámetro P_ALCOHOL_MAX), evaluado durante un tiempo corto establecido para T_S_MARGEN_ALCOHOL, por lo que el sistema fuerza un recalibrado.

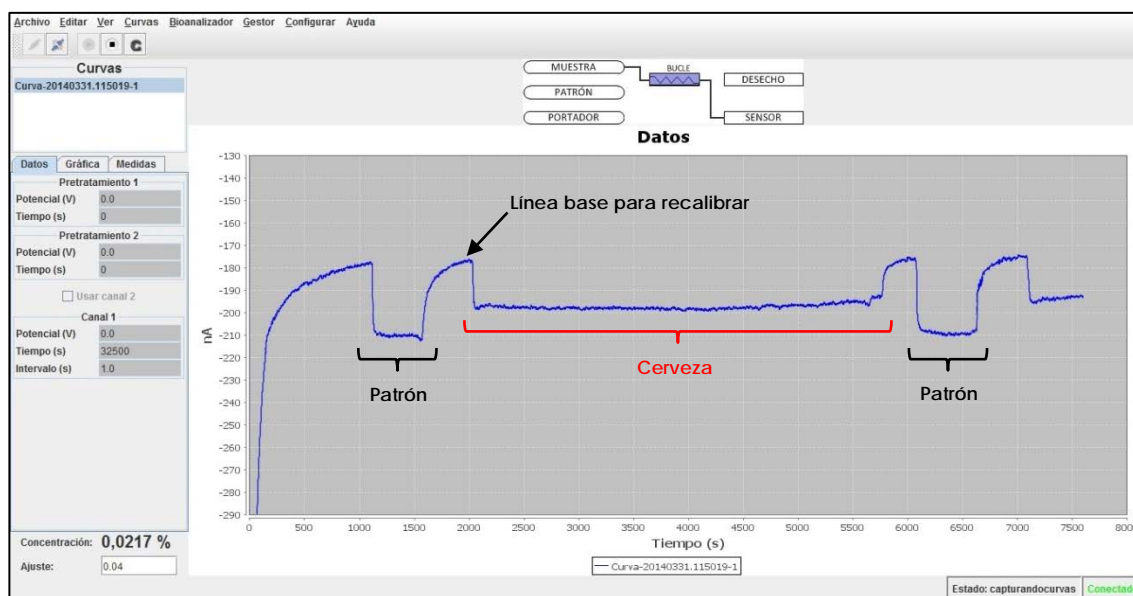


Figura 85. Ejemplo de registro obtenido con el bioanalyzer automatizado en el análisis "on-line" de etanol en una cerveza "0,0" trabajando en el modo continuo.

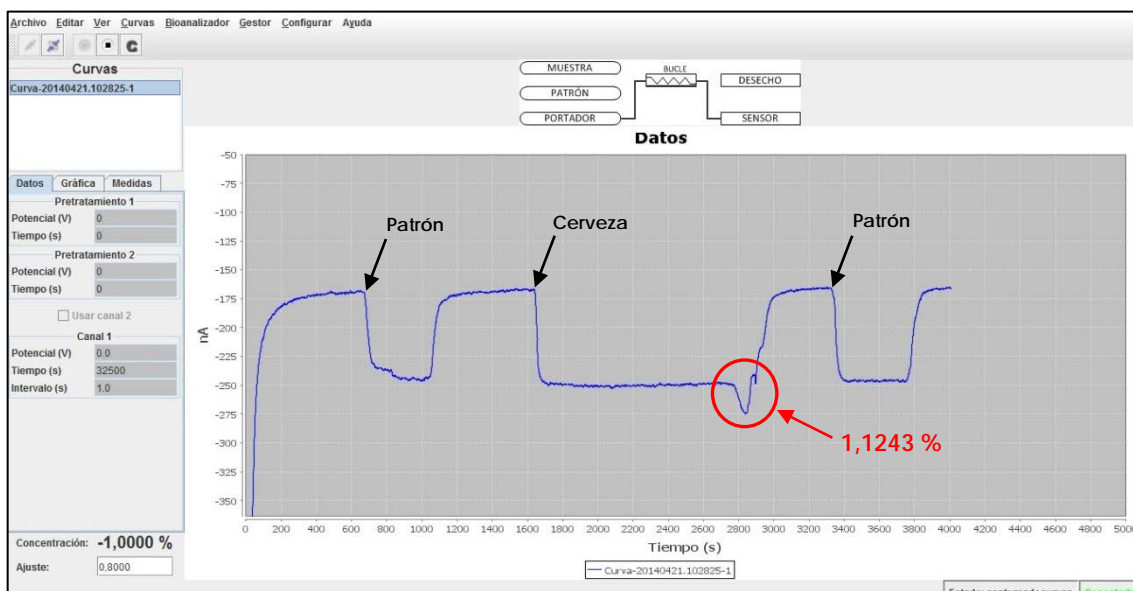


Figura 86. Ejemplo de registro obtenido con el bioanalyzer automatizado en el análisis "on-line" de etanol en una cerveza "Sin" trabajando en el modo continuo.

Asimismo, para el *modo FIA* se muestra en la **Figura 87** un ejemplo de análisis de una cerveza "0,0", en el que se ha establecido, a través del fichero de configuración del programa, un método de análisis en el que el sistema realice una recalibración cada cinco medidas de muestra.

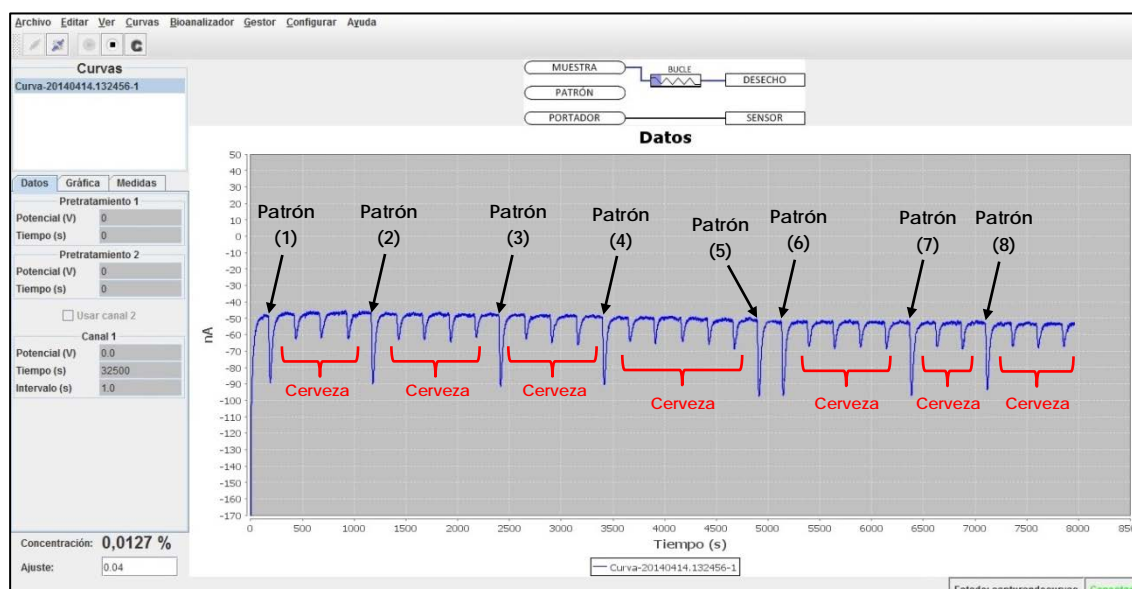


Figura 87. Ejemplo de registro obtenido con el bioanalizador automatizado en el análisis "on-line" de etanol en una cerveza "0,0" trabajando en el modo FIA. Patrones correspondientes al método de análisis (1 y 5). Patrones correspondientes a la recalibración forzada por desviación en la medida de la muestra (2, 3, 4, 7 y 8) y en la medida del patrón (6).

Como se puede observar en la Figura 87, el sistema ha forzado la recalibración en las ocasiones en las que se ha superado el 10 % de desviación máxima permitido entre medidas registradas (correspondiente a los parámetros P_DESVIACION y P_TOLERANCIA_PATRON).

Por último, en la **Figura 88**, se muestra un ejemplo de análisis de una cerveza "Sin" trabajando en el *modo FIA* en el que se puede observar cómo el sistema ha recalibrado al considerar, además de las desviaciones atribuidas a los parámetros P_DESVIACION y P_TOLERANCIA_PATRON, el parámetro P_ALCOHOL_MAX con un valor límite de concentración establecido del 1,0 % (v/v) de etanol en muestra.

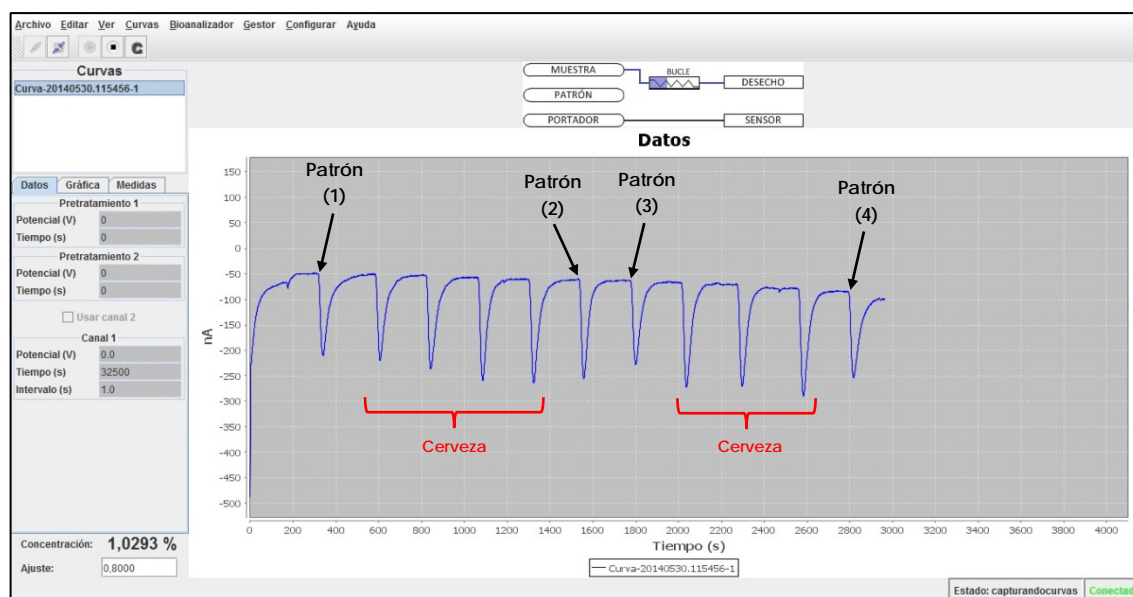


Figura 88. Ejemplo de registro obtenido con el bioanalizador automatizado en el análisis "on-line" de etanol en una cerveza "Sin" trabajando en el modo FIA. Patrón correspondiente al método de análisis (1). Patrones correspondientes a la recalibración forzada por desviación en la medida de la muestra (2 y 4) y en la medida del patrón (3).

Con respecto a la **adquisición y tratamiento de datos** obtenidos por el sistema, se determinó que dicha información sea almacenada en ficheros de medidas. Así, toda la información correspondiente al análisis, aparte de que las medidas de muestra vayan apareciendo en la interfaz de usuario de la aplicación, es compilada en un único archivo, el cual proporciona diferente información en función del modo de monitorización de las señales analíticas. A continuación, en la **Figura 89** se muestra un fichero de medidas para el *modo continuo*, en el que se puede ver cómo las medidas de muestra son registradas cada segundo, junto con el dato de concentración de etanol en % (v/v) determinado.

Archivo	Edición	Formato	Ver	Ayuda
2014/03/31 12:25:11			0.0257	
2014/03/31 12:25:12			0.0259	
2014/03/31 12:25:13			0.0263	
2014/03/31 12:25:14			0.0263	
2014/03/31 12:25:15			0.0258	
2014/03/31 12:25:16			0.0257	
2014/03/31 12:25:17			0.0259	
2014/03/31 12:25:18			0.0255	
2014/03/31 12:25:19			0.0263	
2014/03/31 12:25:20			0.0266	
2014/03/31 12:25:21			0.0269	
2014/03/31 12:25:22			0.0265	
2014/03/31 12:25:23			0.0264	
2014/03/31 12:25:24			0.0268	
2014/03/31 12:25:25			0.0262	
2014/03/31 12:25:26			0.0260	
2014/03/31 12:25:27			0.0262	
2014/03/31 12:25:28			0.0264	
2014/03/31 12:25:29			0.0266	
2014/03/31 12:25:30			0.0267	
2014/03/31 12:25:31			0.0264	
2014/03/31 12:25:32			0.0264	
2014/03/31 12:25:33			0.0269	
2014/03/31 12:25:34			0.0268	
2014/03/31 12:25:35			0.0266	
2014/03/31 12:25:36			0.0269	
2014/03/31 12:25:37			0.0268	
2014/03/31 12:25:38			0.0269	
2014/03/31 12:25:39			0.0270	
2014/03/31 12:25:40			0.0269	

Fecha y hora de registro Concentración, % (v/v)

Figura 89. Información contenida en el fichero de medidas proporcionado por el "software" de control del bioanalizador automatizado obtenido en el análisis "on-line" de etanol en una cerveza "0,0" mostrado en la Figura 85.

En el modo FIA, como se puede observar en las Figuras 90 y 91, el fichero de medidas proporciona para cada medida la fecha y la hora de cada registro, la concentración de etanol en % (v/v) obtenida, la intensidad de corriente del pico amperométrico en valor absoluto y el tipo de medida al que pertenece cada dato (es decir, si se trata de la medida de disolución patrón o de cerveza y, para esta última, a qué replica corresponde).

Archivo	Edición	Formato	Ver	Ayuda
2014/04/14 13:29:53		40,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 13:34:01		15,0000	na	0,0150 % muestra medida 1
2014/04/14 13:38:08		15,0000	na	0,0150 % muestra medida 2
2014/04/14 13:42:29		17,0000	na	0,0170 % muestra medida 3
2014/04/14 13:46:26		43,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 13:50:35		15,0000	na	0,0140 % muestra medida 1
2014/04/14 13:54:44		15,0000	na	0,0140 % muestra medida 2
2014/04/14 13:58:58		16,0000	na	0,0149 % muestra medida 3
2014/04/14 14:03:03		14,0000	na	0,0130 % muestra medida 4
2014/04/14 14:06:59		44,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 14:11:09		15,0000	na	0,0136 % muestra medida 1
2014/04/14 14:15:14		16,0000	na	0,0145 % muestra medida 2
2014/04/14 14:19:27		18,0000	na	0,0164 % muestra medida 3
2014/04/14 14:23:41		41,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 14:27:49		14,0000	na	0,0137 % muestra medida 1
2014/04/14 14:31:59		14,0000	na	0,0137 % muestra medida 2
2014/04/14 14:36:17		14,0000	na	0,0137 % muestra medida 3
2014/04/14 14:40:42		15,0000	na	0,0146 % muestra medida 4
2014/04/14 14:44:48		17,0000	na	0,0166 % muestra medida 5
2014/04/14 14:48:44		46,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 14:52:42		44,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 14:56:48		15,0000	na	0,0136 % muestra medida 1
2014/04/14 15:00:54		16,0000	na	0,0145 % muestra medida 2
2014/04/14 15:05:10		15,0000	na	0,0136 % muestra medida 3
2014/04/14 15:09:16		17,0000	na	0,0155 % muestra medida 4
2014/04/14 15:13:20		44,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 15:17:26		14,0000	na	0,0127 % muestra medida 1
2014/04/14 15:21:34		16,0000	na	0,0145 % muestra medida 2
2014/04/14 15:25:31		41,0000	na	0,0400 % Patrón
2014/04/14 15:29:37		15,0000	na	0,0146 % muestra medida 1
2014/04/14 15:33:44		14,0000	na	0,0137 % muestra medida 2
2014/04/14 15:37:50		13,0000	na	0,0127 % muestra medida 3

Fecha y hora de registro Intensidad de pico Tipo de medida

Figura 90. Información contenida en el fichero de medidas proporcionado por el "software" de control del bioanalizador automatizado obtenido en el análisis "on-line" de etanol en una cerveza "0,0" mostrado en la Figura 87.

Archivo	Edición	Formato	Ver	Ayuda				
2014/05/30	12:01:06		161,0000	na	0,8000	%	Patrón	
2014/05/30	12:06:03		169,0000	na	0,8398	%	muestra medida 1	
2014/05/30	12:10:12		184,0000	na	0,9143	%	muestra medida 2	
2014/05/30	12:15:08		201,0000	na	0,9988	%	muestra medida 3	
2014/05/30	12:20:16		204,0000	na	1,0137	%	muestra medida 4	
2014/05/30	12:24:44		195,0000	na	0,8000	%	Patrón	
2014/05/30	12:28:51		164,0000	na	0,8000	%	Patrón	
2014/05/30	12:34:23		204,0000	na	0,9951	%	muestra medida 1	
2014/05/30	12:38:28		199,0000	na	0,9707	%	muestra medida 2	
2014/05/30	12:42:22		211,0000	na	1,0293	%	muestra medida 3	
2014/05/30	12:46:49		168,0000	na	0,8000	%	Patrón	

Figura 91. Información contenida en el fichero de medidas proporcionado por el "software" de control del bioanalizador automatizado obtenido en el análisis "on-line" de etanol en una cerveza "Sin" mostrado en la Figura 88.

3.3.2.1.1.3.2. Análisis "off-line"

Para este modo de análisis, la **interfaz de usuario**, además de contener los elementos que se indicaron en el Apartado 3.3.2.1.1.3.1 del análisis "on-line" (parámetros de registro, un indicador de proceso, el bloque gráfico y las concentraciones de etanol de la disolución patrón y en la muestra) se incluyó un *panel de control* desde el que se configura a qué disolución (patrón o cerveza) se destina cada entrada del módulo de válvulas correspondiente a la parte del selector de muestras, el número de réplicas a medir de cada muestra y el número de medidas de muestra a realizar antes de que el sistema ordene recalibrar el bioanalizador (**Figura 92**). Como se indica en el panel de control de entradas de la imagen, la aplicación se desarrolló genéricamente para un selector de muestras de ocho entradas, aunque el prototipo fabricado contenga sólo cuatro.

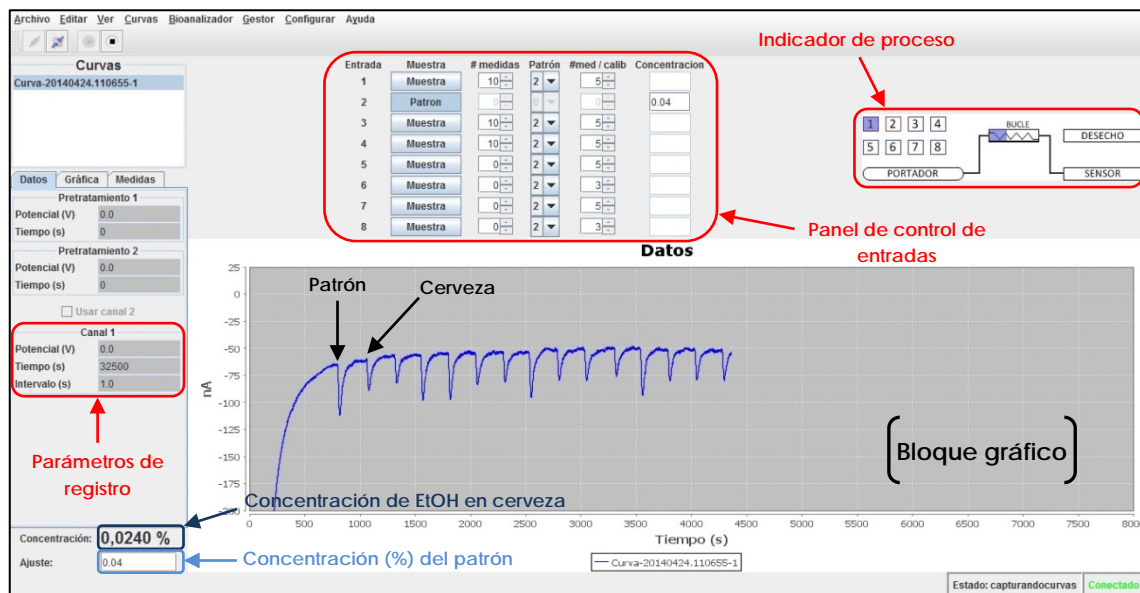


Figura 92. Aspecto e información contenida en la interfaz de usuario del "software" de control del bioanalizador automatizado para el análisis "off-line".

La modificación a introducir en el sistema de flujo para obtener un bioanalizador con ocho entradas de muestra consistiría en el duplicado del patrón de distribución de las válvulas de tres vías, tal y como se muestra en la Figura 93, con lo que se tendrían que controlar otras cuatro electroválvulas adicionales.

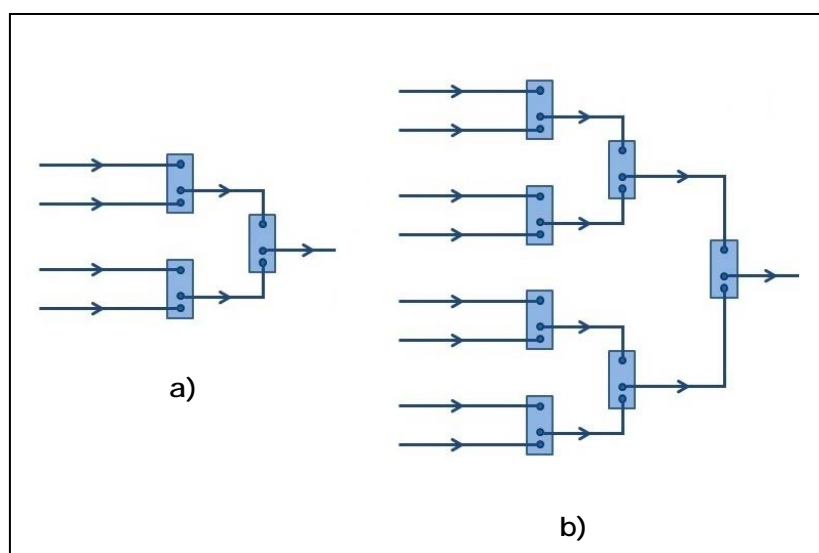
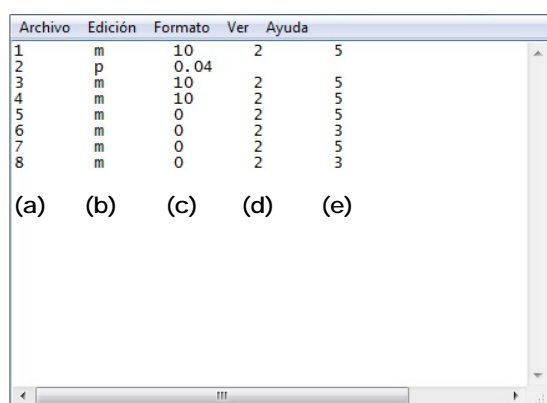


Figura 93. Esquemas de distribución a partir de las electroválvulas de tres vías para la composición del selector de muestras de cuatro entradas (a) y de ocho entradas (b) en el bioanalizador automatizado para el análisis "off-line".

Para el control de esta aplicación, además de considerar los **parámetros de configuración** relativos a la estabilización y medida que se explicaron anteriormente para la aplicación "on-line" (Tabla 41), fue necesario añadir un fichero de configuración específico para esta modalidad de análisis, desde el que se establece el método a llevar a cabo. Dicho fichero, mostrado en la **Figura 94**, contiene cinco columnas, de las cuales cuatro posibilitan configurar lo que a continuación se indica:



Archivo	Edición	Formato	Ver	Ayuda
1	m	10	2	5
2	p	0.04		
3	m	10	2	5
4	m	10	2	5
5	m	0	2	5
6	m	0	2	5
7	m	0	2	5
8	m	0	2	5

(a) (b) (c) (d) (e)

Figura 94. Fichero con los parámetros de configuración del "software" de control del bioanalizador automatizado para el análisis "off-line".

- Columna **(a)**: cada número corresponde a una entrada del selector de muestras. En el caso del prototipo desarrollado sólo tienen funcionalidad las entradas 1, 2, 3 y 4.
- Columna **(b)**: parte del fichero donde se define si una entrada del selector de muestras se va a destinar a la introducción de disolución patrón, indicado con una "p", o a la introducción de una muestra de cerveza, en este caso introduciendo el carácter "m".
- Columna **(c)**: en el caso de que una entrada del selector de muestras se haya definido como entrada de patrón, en esta columna se introduce el valor de concentración de etanol de dicho patrón expresado en % (v/v). Si bien la entrada se ha destinado a la introducción de una muestra de cerveza, en esta parte del fichero se establece entonces el número de réplicas que debe realizar el sistema en la medida de cada muestra.
- Columna **(d)**: donde se define el número de entrada del selector de muestras en el que está dispuesto el patrón de calibración que se empleará como referencia para una muestra determinada. De este modo, se posibilita llevar

a cabo un análisis empleando un patrón de etanol específico para cada cerveza.

- Columna **(e)**: parte del fichero donde se introduce el número de medidas que debe realizar el sistema para cada muestra antes de llevar a cabo una recalibración.

De este modo, los datos que se introduzcan en este fichero de configuración son los que aparecerán en el panel de control de entradas de la interfaz de la aplicación.

A continuación, a modo de ejemplo, se muestra en la **Figura 95** la captura de pantalla perteneciente al análisis de una cerveza "0,0" trabajando con la aplicación informática para análisis "off-line". En este caso, se programó como método la recalibración del bioanalizador cada cinco muestras registradas. Como se puede observar en la imagen, el sistema ha forzado la recalibración en cada ocasión en que se ha superado el 10 % de desviación máximo permitido entre medidas registradas, porcentaje establecido desde el fichero de configuración para los parámetros P_DESVIACION y P_TOLERANCIA_PATRON.

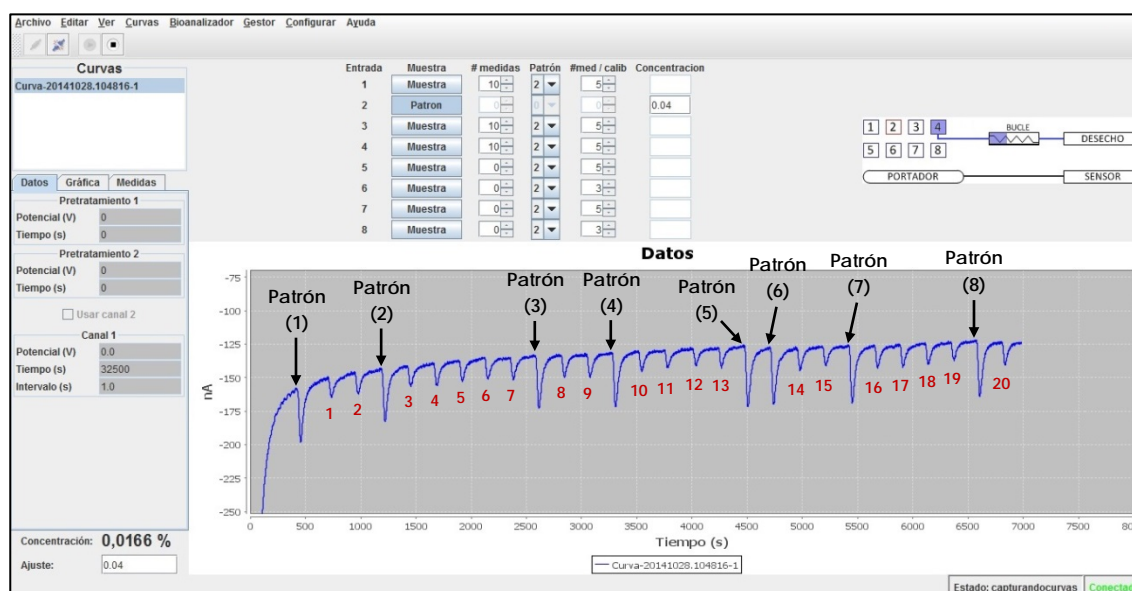


Figura 95. Ejemplo de registro obtenido con el bioanalizador automatizado en el análisis "off-line" de etanol en cerveza "0,0". Patrones correspondientes al método de análisis (1 y 3). Patrones correspondientes a la recalibración forzada por desviación en la medida de la muestra (2, 4, 5, 7 y 8) y en la medida del patrón (6). Medidas pertenecientes a la muestra colocada en la entrada 1 (1–10) y a la muestra colocada en la entrada 3 (11–20).

Por último, con respecto a la **adquisición y tratamiento de datos** obtenidos por el sistema, además de que las concentraciones de etanol en cerveza calculadas vayan apareciendo en la interfaz según van siendo registradas, para esta aplicación también se almacenan los datos obtenidos en un archivo de medidas. No obstante, a diferencia del programa para el análisis "on-line", se ha incluido en el fichero de medidas la estadística correspondiente al análisis de cada muestra. Así, en la **Figura 96** se puede ver cómo para cada muestra, además de la información que se detalló para el fichero de medidas del modo "on-line", aparecen también la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa de los resultados.

Archivo	Edición	Formato	Ver	Ayuda			
2014/10/28	10:57:07	37,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	11:01:49	13,0000	na	0,0141	%	muestra 1, medida 1	
2014/10/28	11:05:53	15,0000	na	0,0162	%	muestra 1, medida 2	
2014/10/28	11:09:51	39,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	11:13:42	15,0000	na	0,0154	%	muestra 1, medida 3	
2014/10/28	11:17:39	16,0000	na	0,0164	%	muestra 1, medida 4	
2014/10/28	11:21:30	16,0000	na	0,0164	%	muestra 1, medida 5	
2014/10/28	11:25:21	15,0000	na	0,0154	%	muestra 1, medida 6	
2014/10/28	11:29:14	16,0000	na	0,0164	%	muestra 1, medida 7	
2014/10/28	11:33:04	40,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	11:36:56	15,0000	na	0,0150	%	muestra 1, medida 8	
2014/10/28	11:40:47	17,0000	na	0,0170	%	muestra 1, medida 9	
2014/10/28	11:44:39	39,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	11:48:36	14,0000	na	0,0144	%	muestra 1, medida 10	
2014/10/28	11:48:36	15,2000	na	0,0157	%	Medias muestra 1	
2014/10/28	11:48:36	1,0770	na	0,0009	%	Desviación estándar muestra 1	
2014/10/28	11:48:36	7,0857	na	5,9388	%	RSD muestra 1	
2014/10/28	11:52:36	11,0000	na	0,0113	%	muestra 3, medida 1	
2014/10/28	11:56:51	12,0000	na	0,0123	%	muestra 3, medida 2	
2014/10/28	12:00:47	14,0000	na	0,0144	%	muestra 3, medida 3	
2014/10/28	12:04:40	45,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	12:08:37	41,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	12:12:34	17,0000	na	0,0166	%	muestra 3, medida 4	
2014/10/28	12:16:26	14,0000	na	0,0137	%	muestra 3, medida 5	
2014/10/28	12:20:23	42,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	12:24:14	17,0000	na	0,0162	%	muestra 3, medida 6	
2014/10/28	12:28:05	16,0000	na	0,0152	%	muestra 3, medida 7	
2014/10/28	12:31:57	15,0000	na	0,0143	%	muestra 3, medida 8	
2014/10/28	12:35:48	13,0000	na	0,0124	%	muestra 3, medida 9	
2014/10/28	12:39:39	41,0000	na	0,0400	%	Patrón 2	
2014/10/28	12:43:35	17,0000	na	0,0166	%	muestra 3, medida 10	
2014/10/28	12:43:35	14,6000	na	0,0143	%	Medias muestra 3	
2014/10/28	12:43:35	2,0591	na	0,0018	%	Desviación estándar muestra 3	
2014/10/28	12:43:35	14,1036	na	12,5349	%	RSD muestra 3	

Figura 96. Información contenida en el fichero de medidas proporcionado por el "software" de control del bioanalizador automatizado obtenido en el análisis "off-line" de etanol en una cerveza "0,0" mostrado en la Figura 95.

3.3.2.1.2. Características operacionales del bioanalizador automatizado

En este apartado se han evaluado, en las condiciones experimentales en las que trabaja el instrumento desarrollado, las características que definen las prestaciones que muestra el bioanalizador automatizado. De cara a los estudios a llevar a cabo, se tuvo que tener en cuenta que las condiciones de trabajo se vieron modificadas con respecto a los desarrollos manuales, debido a los requerimientos de funcionamiento de los dispositivos electrónicos empleados en el mecanizado (electroválvulas y bombas peristálticas). Así, para el buen funcionamiento de los componentes electrónicos del instrumento, fue necesario emplear una alimentación de 24 V. Esto implicó que el caudal de trabajo de las bombas peristálticas fuera muy superior al que se empleó en los estudios de los bioanalizadores manuales, siendo este nuevo caudal de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$, y se tradujo, por lo tanto, en un gasto de volumen de portador y en una generación de volumen de desecho altos por parte del bioanalizador. Por ello, con objeto de reducir tales volúmenes, se decidió introducir una recirculación en el sistema que consistió en retornar a la disolución portadora el desecho saliente de la célula de flujo, como se mostró anteriormente en los esquemas de las Figuras 78 y 79 del Apartado 3.3.2.1.1. La consecuencia de dicha recirculación es que el portador se va a ir enriqueciendo con el etanol que traspasa la membrana de la unidad muestreadora y llegue al detector. Por lo tanto, con el fin de evaluar el funcionamiento del bioanalizador automatizado en las nuevas condiciones hidrodinámicas y el efecto del aumento gradual del nivel de etanol en la disolución portadora, se han estudiado la precisión de las medidas, el tiempo de respuesta, las características analíticas y la estabilidad de los biosensores empleados como detectores amperométricos.

3.3.2.1.2.1. Curvas de calibrado y características analíticas

Se construyeron las curvas de calibrado para el bioanalizador desarrollado trabajando en el *modo continuo*, con el biosensor compuesto de grafito-Teflón, y en el *modo FIA*, con el biosensor de acero inoxidable con capa de oro depositada por "sputtering", obtenidas en las condiciones experimentales establecidas para el

instrumento automatizado. Equipando el prototipo con la unidad muestreadora de 20 mm los calibrados se construyeron a niveles de concentración de etanol en el intervalo comprendido entre 0,02 y 0,1 % (v/v) (Figuras 97a y 97c para los modos continuo y FIA, respectivamente), y en el caso de la unidad muestreadora de 14 mm este intervalo fue de entre 0,25 y 1,25 % (v/v) (Figura 97b para el modo continuo y Figura 97d para el modo FIA).

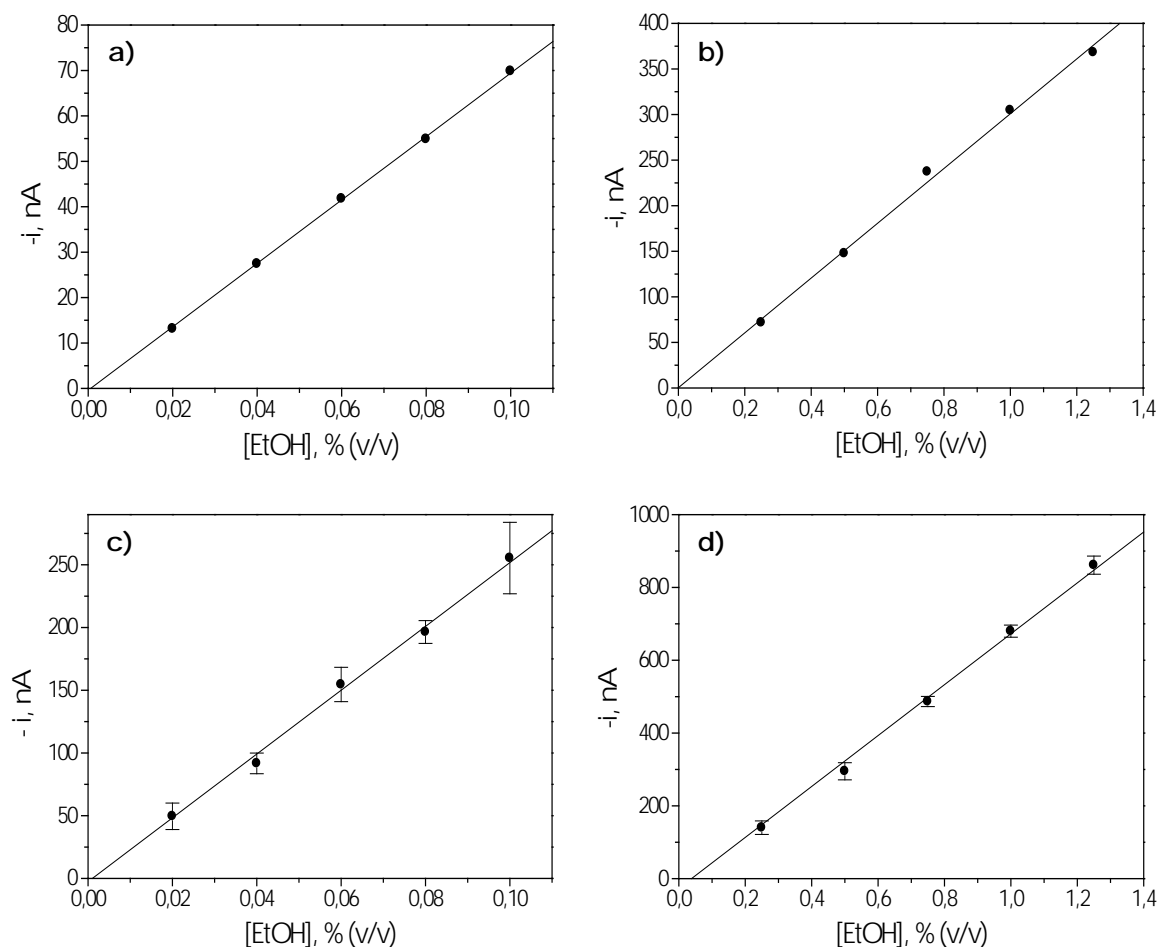


Figura 97. Curvas de calibrado obtenidas a partir de los registros intensidad-tiempo para disoluciones patrón de etanol de concentraciones crecientes. Unidad doble de muestreo de 20 mm (a y c) y de 14 mm (b y d) de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4, con recirculación del desecho de célula. Volumen de bucle: 500 μL . Caudal de trabajo: 4,0 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Para establecer el intervalo lineal de los calibrados y estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado como criterios los indicados

anteriormente en el Apartado 3.3.1.1.3. En la **Tabla 42** se muestran las características analíticas determinadas a partir de las intensidades de corriente de las señales medidas en los correspondientes registros i-t.

Tabla 42. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 97.

Modo	Muestreador	Pendiente, nA % ⁻¹	O.o, nA	r	LD, %	LC, %
Continuo	20 mm	$(6,98 \pm 0,06) \times 10^2$	$-0,4 \pm 0,4$	0,9999	$1,8 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-3}$
	14 mm	$(3,00 \pm 0,07) \times 10^2$	0 ± 6	0,9988	$2,3 \times 10^{-2}$	$7,8 \times 10^{-2}$
FIA	20 mm	$(2,54 \pm 0,06) \times 10^3$	-3 ± 4	0,9987	$7,9 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-3}$
	14 mm	$(7,0 \pm 0,2) \times 10^2$	-26 ± 28	0,9982	$8,9 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Si se comparan las características analíticas obtenidas para el bioanalizador automatizado (Tabla 42) con las que se obtuvieron para los desarrollos manuales (Tabla 15 del Apartado 3.3.1.1.3 y Tabla 23 del Apartado 3.3.1.1.2.3), en el caso del prototipo automatizado los biosensores proporcionan una menor sensibilidad. No obstante, esto es coherente con el hecho de que el sistema automatizado trabaja a un caudal bastante mayor que para los desarrollos manuales, por lo que el rendimiento con que se da el proceso de difusión a través de la membrana PTFE de la unidad muestreadora será diferente, siendo éste menor al ir aumentando el caudal de trabajo. Para la monitorización en cervezas "0,0" con una concentración de etanol muy baja, la sensibilidad podría verse comprometida, de modo que la cuantificación en sí no pudiera llevarse a cabo satisfactoriamente. Sin embargo, de cara a la monitorización del nivel de alcohol en una línea de producción, esto no resultaría problemático, ya que para el objetivo de la aplicación, que es poder controlar en tiempo real que el grado de alcohol no supere el límite máximo que permite la legislación (0,04 % (v/v) para las cervezas "0,0") las características proporcionadas por el bioanalizador permitirían llevarlo a cabo de manera adecuada.

3.3.2.1.2.2. Precisión instrumental y tiempo de respuesta

En primer lugar se evaluó la repetitividad de las medidas amperométricas trabajando en las condiciones experimentales establecidas para el bioanalizador automatizado. En el caso de la monitorización en *continuo*, se llevó a cabo la medida de 10 disoluciones patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v), utilizando el bioanalizador equipado con la unidad muestreadora de 20 mm de diámetro, y 0,8 % (v/v) utilizando el bioanalizador equipado con la unidad muestreadora de 14 mm de diámetro (**Figura 98**). Los valores de desviación estándar relativa obtenidos fueron de 4,9 % y 3,4 %, respectivamente.

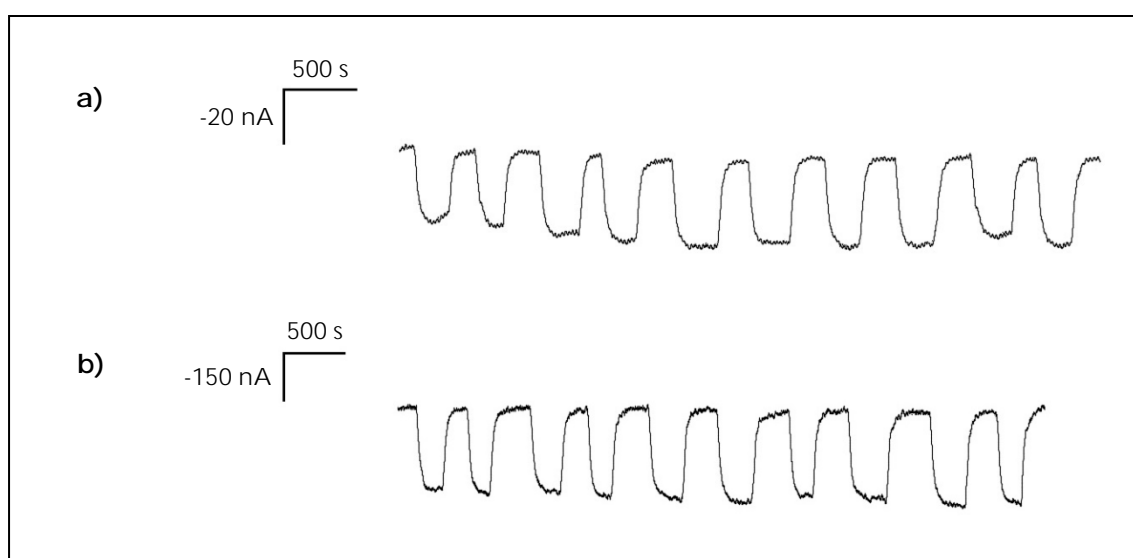


Figura 98. Señales amperométricas correspondientes a 10 medidas sucesivas registradas para una disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v) **(a)** y 0,8 % (v/v) **(b)** trabajando con el bioanalizador automatizado en modo continuo. Unidad doble de muestreo de 20 mm **(a)** y 14 mm **(b)** de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4, con recirculación del desecho de célula. Caudal de trabajo: 4,0 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Para el *modo FIA* se realizaron 20 medidas sucesivas de disoluciones patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v) y 0,8 % (v/v), de nuevo en función de la unidad muestreadora equipada en el bioanalizador automatizado (**Figura 99**). Los valores de desviación estándar relativa obtenidos fueron de 2,5 % cuando se trabaja

con el dispositivo muestreador de 20 mm de diámetro y de 3,1 % con el dispositivo de 14 mm.

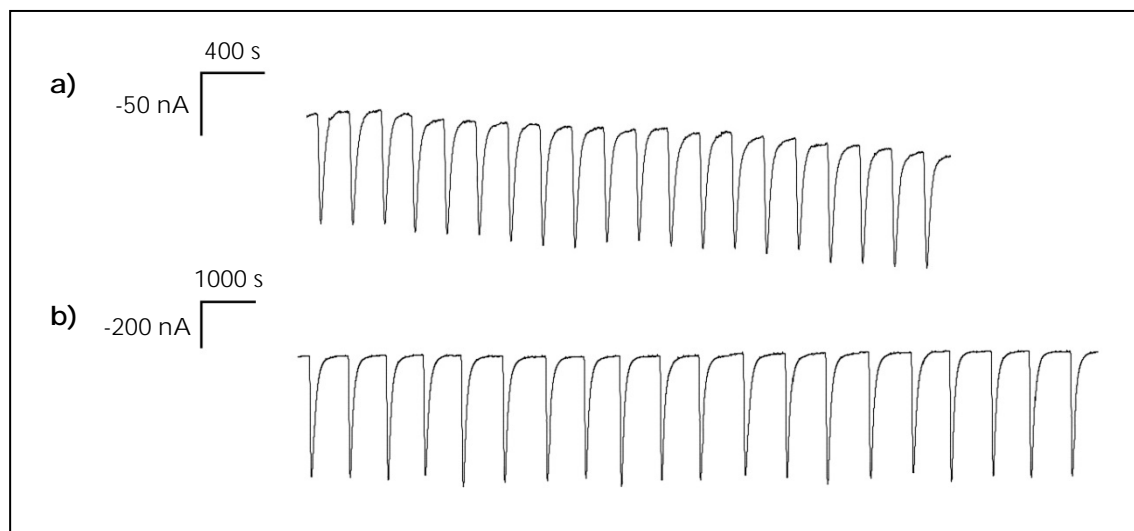


Figura 99. *Diagramas correspondientes a 20 medidas sucesivas registradas para una disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v) (a) y 0,8 % (v/v) (b) trabajando con el bioanalizador automatizado en modo FIA. Unidad doble de muestreo de 20 mm (a) y 14 mm (b) de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4, con recirculación del desecho de célula. Volumen de bucle: 500 μL . Caudal de trabajo: 4,0 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.*

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que, independientemente del modo de trabajo (continuo o FIA), el empleo de las nuevas condiciones hidrodinámicas y la presencia de etanol en el portador no influyen en que la detección amperométrica y el proceso de dilución en la unidad muestreadora se den de manera reproducible en el sistema automatizado.

Para evaluar la precisión con que el bioanalizador automatizado registra las señales analíticas, medidas a partir de la curva amperométrica, y realiza los cálculos para la determinación del contenido de etanol en cerveza, se han comparado los valores obtenidos en los ficheros de resultados de cada aplicación con los que se obtienen si se realiza la cuantificación de esas señales de manera manual, es decir, midiéndolas directamente sobre los registros intensidad-tiempo obtenidos. Considerando en primer lugar el *modo continuo* de la aplicación "on-line", se

tomaron 10 medidas de muestra correspondientes a un mismo intervalo de tiempo de monitorización de una cerveza "0,0" sobre el registro intensidad-tiempo, cuyos datos se recogen en la **Tabla 43**. La comparación estadística de los resultados obtenidos por ambos procedimientos se ha llevado a cabo mediante el cálculo de la t de Student. El valor de $t_{\text{experimental}}$ obtenido, mostrado en la Tabla 43, es inferior al valor crítico tabulado t_{tab} (18 grados de libertad, $p = 0,05$) = 2,101, por lo que se puede deducir que no existen diferencias significativas y, por lo tanto, la aplicación informática realiza satisfactoriamente el registro de las medidas en la monitorización en modo continuo del etanol en cerveza.

Tabla 43. Resultados obtenidos en el análisis "on-line" del contenido de etanol en una cerveza "0,0" trabajando con el bioanalizador automatizado en modo continuo y realizando la medida de las señales amperométricas de manera manual.

Automático		Manual		t_{exp}
[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} , %	[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} , %	
0,0257	0,0260 ± 0,0002 (RSD $n=10$ = 1,2 %)	0,0272	0,0264 ± 0,0006 (RSD $n=10$ = 3,1 %)	1,354
0,0259		0,0269		
0,0263		0,0270		
0,0263		0,0263		
0,0258		0,0253		
0,0257		0,0250		
0,0259		0,0255		
0,0255		0,0264		
0,0263		0,0272		
0,0263		0,0266		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Para el *modo FIA*, se ha llevado a cabo la comparación de los datos compilados en los ficheros de medidas con los obtenidos mediante la medida manual de los picos FIA en el análisis "on-line" de cervezas "0,0" y "Sin", cuyos datos se recogen en las **Tablas 44** y **45**, respectivamente, y en el análisis "off-line" de dos cervezas "0,0", mostrando los resultados en la **Tabla 46**.

Tabla 44. Resultados obtenidos en el análisis "on-line" del contenido de etanol en una cerveza "0,0" trabajando con el bioanalizador automatizado en modo FIA y realizando la medida de los picos FIA de manera manual.

Muestra	Automático	Manual	E _r , %
	[EtOH], %	[EtOH], %	
1	0,0150	0,0144	+4,1
2	0,0150	0,0149	+1,0
3	0,0170	0,0165	+2,9
4	0,0140	0,0135	+3,7
5	0,0140	0,0139	+0,7
6	0,0149	0,0159	-6,2
7	0,0130	0,0129	+0,9
8	0,0136	0,0138	-1,6
9	0,0145	0,0152	-4,5
10	0,0164	0,0155	+6,1
11	0,0137	0,0146	-6,2
12	0,0137	0,0150	-8,6
13	0,0137	0,0133	+3,2
14	0,0146	0,0151	-3,5
15	0,0166	0,0168	-1,0
16	0,0136	0,0137	-1,0
17	0,0145	0,0145	0
18	0,0136	0,0132	+3,0
19	0,0155	0,0143	+8,1
20	0,0127	0,0126	+0,6
21	0,0145	0,0147	-1,1
22	0,0146	0,0144	+1,1
23	0,0137	0,0141	-3,0
24	0,0127	0,0129	-1,8
Promedio:	0,0144 ± 0,0005 (RSD _{n=24} = 7,9 %)	0,0144 ± 0,0005 (RSD _{n=24} = 7,6 %)	0 ± 2

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 45. Resultados obtenidos en el análisis "on-line" del contenido de etanol en una cerveza "Sin" trabajando con el bioanalizador automatizado en modo FIA y realizando la medida de los picos FIA de manera manual.

Muestra	Automático	Manual	E _r , %
	[EtOH], %	[EtOH], %	
1	0,8398	0,8639	+2,8
2	0,9143	0,9410	-2,8
3	0,9988	1,0288	-2,9
4	1,0137	1,0396	-2,5
5	0,9951	0,9970	-0,2
6	0,9707	0,9744	-0,4
7	1,0293	1,0266	+0,3
Promedio:	0,97 ± 0,06 (RSD _{n=7} = 6,9 %)	0,98 ± 0,06 (RSD _{n=7} = 6,4 %)	-1 ± 2

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 46. Resultados obtenidos en el análisis "off-line" del contenido de etanol en una cerveza "0,0" trabajando con el bioanalizador automatizado en modo FIA y realizando la medida de los picos FIA de manera manual.

Muestra	Medida	Automático		Manual		Error relativo	
		[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} , %	[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} , %	E _r , %	E _r promedio, %
1	1	0,0141	0,0157 ± 0,0006 (s = 0,0009 %) (RSD _{n=10} = 5,9 %)	0,0147	0,0155 ± 0,0007 (s = 0,0009 %) (RSD _{n=10} = 6,0 %)	-3,9	+1 ± 3
	2	0,0162		0,0157		+3,4	
	3	0,0154		0,0148		+4,0	
	4	0,0164		0,0162		+1,1	
	5	0,0164		0,0153		+7,0	
	6	0,0154		0,0156		-1,5	
	7	0,0164		0,0162		+1,2	
	8	0,0150		0,0164		-8,4	
	9	0,0170		0,0164		+3,8	
	10	0,0144		0,0135		+6,5	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 46. Continuación.

Muestra	Medida	Automático		Manual		Error relativo	
		[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} , %	[EtOH], %	[EtOH] _{promedio} , %	E _r , %	E _r promedio, %
2	1	0,0113	0,014 ± 0,001 (s = 0,0018 %) (RSD _{n=10} = 12,5 %)	0,0121	0,014 ± 0,001 (s = 0,0016 %) (RSD _{n=10} = 11,5 %)	-6,5	+1 ± 3
	2	0,0123		0,0125		-1,4	
	3	0,0144		0,0142		+1,5	
	4	0,0166		0,0158		+5,1	
	5	0,0137		0,0131		+4,5	
	6	0,0162		0,0158		+2,4	
	7	0,0152		0,0154		-1,4	
	8	0,0143		0,0146		-2,3	
	9	0,0124		0,0120		+3,7	
	10	0,0166		0,0160		+3,5	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Como se puede observar en las Tablas 44, 45 y 46, se obtuvieron por ambos procedimientos resultados que no difieren significativamente entre sí, como se puede deducir de los valores de error relativo "E_r" calculados tomando como referencia el dato medido directamente sobre el registro intensidad-tiempo. En todos los casos se ha obtenido un error relativo promedio menor al 4 %, por lo que se puede afirmar de nuevo que la aplicación informática realiza adecuadamente el registro de las medidas de etanol en cervezas de bajo contenido alcohólico trabajando, en este caso, con el bioanalizador automatizado en el modo FIA.

Por último, se han evaluado el tiempo de respuesta y la frecuencia de muestreo que proporciona el bioanalizador automatizado desarrollado. Con respecto al tiempo empleado en el registro de una señal analítica, en el caso de la aplicación "on-line" para el *modo continuo*, una vez se ha calibrado el sistema, la lectura de la concentración de etanol en la cerveza se da cada segundo, independientemente del tipo de cerveza a analizar. Para este modo de trabajo sólo se puede modificar el tiempo durante el que se realiza la monitorización de la muestra de manera ininterrumpida. Sin embargo, si se realiza el análisis trabajando en el *modo FIA*, ya sea a través de la aplicación "on-line" u "off-line", el tiempo de

respuesta proporcionado por el equipo es un parámetro que va a depender de la configuración establecida desde el "software" y, por lo tanto, va a ser posible disminuirlo o aumentarlo en pos de los requerimientos necesarios para la monitorización. Así, en el caso del análisis "on-line" la rapidez de respuesta del sistema va a ser muy importante, ya que la detección en tiempo real de un aumento del nivel alcohólico en la línea de producción podría suponer la detención de dicha línea, mientras que en un análisis "off-line" obtener una frecuencia de muestreo alta no resulta tan crítico. En cualquier caso, para que el registro de las medidas por parte del sistema se dé adecuadamente, se debe programar un método de análisis que respete los tiempos necesarios para la recuperación de la línea base por parte del biosensor.

En referencia a la frecuencia de muestreo (entendido como la frecuencia con que se ha llevado a cabo la medida de muestra en un análisis, considerando todas las etapas del mismo: estabilización, registro de medida y recalibraciones) cabe decir que es un parámetro que, teniendo en cuenta el factor químico, dependerá de cómo esté trabajando el biosensor, ya que si éste presenta una señal amperométrica con bastante ruido, el sistema tardará más tiempo en establecer un valor constante de intensidad de corriente y en verificar el criterio de estabilidad y, por lo tanto, las etapas comprendidas en el registro de una medida se verán ralentizadas y con ello el tiempo de análisis. Otro factor a considerar es el informático, es decir, el método de análisis y criterios establecidos desde el fichero de configuración para que el sistema realice un recalibrado, ya que un recalibrado más supone una medida de muestra menos. Con respecto al método de análisis, se determinó que se llevara a cabo una recalibración cada 5 medidas de muestra para posibilitar que se vaya corrigiendo durante el transcurso de un análisis la pérdida paulatina de señal por parte del biosensor, de modo que la cuantificación de la concentración de etanol se dé de manera efectiva y veraz, tal y como se ha estudiado en el apartado de estabilidad.

A continuación, en las **Tablas 47 y 48** se muestran, a modo de ejemplo, los datos pertenecientes a unos análisis de cerveza "0,0" y "Sin", respectivamente,

trabajando con el sistema "on-line", para diferentes métodos de análisis que presentan distintos valores para los parámetros que se han incluido en las tablas.

Tabla 47. Datos introducidos como parámetros de configuración de dos métodos de análisis para la monitorización "on-line" de cerveza "0,0", tiempos promediados sobre 20 medidas para la lectura de una medida y frecuencias de muestreo para cada método de análisis trabajando con el bioanalizador automatizado en modo FIA.

Parámetro	Método 1	Método 2
T_S_REPOSO	60	60
P_DESVIACION	10	10
P_NIVEL	0,05	0,05
T_N_ESPERA	1,25	5,0
N_MEDIDAS	5	5
T_S_BETA	120	360
P_ALCOHOL_MAX	0,04	0,04
T_S_CEBADO	20	40
T_S_CEBADO_MUESTRA	20	40
P_TOLERANCIA_PATRON	10	10
T_S_CAMBIO_PENDIENTE	2	2
N_CAMBIO_PENDIENTE	2	2
t_{respuesta promedio}, min (N = 20)	4,1 ± 0,1	11,7 ± 0,3
Frecuencia muestreo	1 muestra/6 min	1 muestra/16 min

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Los métodos expuestos en la Tabla 47 sólo difieren en el tiempo que debe emplear el sistema para buscar el máximo del pico amperométrico (T_S_BETA), siendo éste muy superior en el caso del método 2 con respecto al del método 1. Como se puede observar, se obtuvieron tiempos de respuesta y frecuencias de muestreo muy dispares entre ambos métodos, resultando mucho más favorable para un análisis "on-line" los obtenidos para el método 1 vs. al método 2.

Tabla 48. Datos introducidos como parámetros de configuración de dos métodos de análisis para la monitorización "on-line" de cerveza "Sin", tiempos promediados sobre 20 medidas para la lectura de una medida y frecuencias de muestreo para cada método de análisis trabajando con el bioanalizador automatizado en modo FIA.

Parámetro	Método 1	Método 2
T_S_REPOSO	60	60
P_DESVIACION	10	10
P_NIVEL	0,05	0,05
T_N_ESPERA	1,25	1,25
N_MEDIDAS	5	5
T_S_BETA	120	120
P_ALCOHOL_MAX	1,0	1,0
T_S_CEBADO	20	40
T_S_CEBADO_MUESTRA	20	40
P_TOLERANCIA_PATRON	10	10
T_S_CAMBIO_PENDIENTE	2	2
N_CAMBIO_PENDIENTE	2	2
t_{respuesta promedio}, min (N = 20)	5,0 ± 0,5	6,9 ± 0,7
Frecuencia muestreo	1 muestra/6 min	1 muestra/9 min

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Por otro lado, los métodos expuestos en la Tabla 48 sólo difieren en el tiempo empleado por el sistema para el llenado del bucle con patrón o con cerveza (T_S_CEBADO/T_S_CEBADO_MUESTRA). Habiendo estipulado que este tiempo sea considerado dentro del tiempo para la medida de una muestra, como se comentó en el Apartado 3.3.2.1.1.3.1, la diferencia entre los valores establecidos para estos parámetros es suficiente como para traducirse en distintos tiempos de respuesta y frecuencias de muestreo. En este ejemplo, de nuevo, es el método 1 el que proporcionó mejores resultados para un análisis "on-line".

Por lo tanto, como se puede observar en los datos de las tablas, es posible modificar significativamente el tiempo de respuesta y la frecuencia de muestreo proporcionados por el bioanalizador automatizado en función de los parámetros de

configuración establecidos, siendo los valores que se muestran para los métodos 1 los valores que proporcionaron los mejores resultados entre los métodos ensayados, permitiendo que todas las fases que comprende un análisis (llenado del bucle con patrón o cerveza, estabilización de la señal amperométrica y medida de la misma), se den de manera efectiva.

3.3.2.1.2.3. Estabilidad

Debido al hecho de que el bioanalizador automatizado trabaja en unas condiciones para la disolución portadora diferentes a las que se emplearon en los desarrollos manuales, en referencia al caudal (que ha aumentado hasta un valor de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$) y al establecimiento de la recirculación del desecho de la célula de flujo, en este apartado se estudiará el tiempo de vida útil de los dos tipos de biosensores de alcohol empleados como detectores del bioanalizador automatizado desarrollado. Con respecto a la recirculación del desecho de célula, se debe tener en cuenta que la disolución portadora se va a ir enriqueciendo en el etanol que llega a dicho dispositivo, y el modo de monitorización en el que la disolución portadora es más susceptible de adquirir una mayor concentración de etanol es el continuo, ya que durante determinados intervalos amplios de tiempo pasa etanol procedente de la disolución patrón o de la cerveza al portador, a través de la unidad muestreadora. Así, considerando un volumen inicial de disolución portadora de 1 L, se encontró que, tras analizar la concentración de etanol en la misma al cabo de 24 h de análisis con el bioanalizador automatizado y reponer el recipiente del portador con disolución limpia cada 12 h aproximadamente, en el caso de analizar cerveza "Sin" el nivel de etanol adquirido fue del $1,60 \times 10^{-2} \%$ (v/v) y en el análisis de una cerveza "0,0" se detectó del orden del $2,20 \times 10^{-3} \%$ (v/v). Estos valores de concentración resultaron ser no significativos de cara a la estabilidad del biosensor compuesto de grafito-Teflón, ya que durante el estudio del tiempo de vida útil del mismo, en las condiciones experimentales en las que trabaja el instrumento automatizado, no se observó caída de la línea base, por lo que la deriva y la fluctuación de la señal se pudo atribuir a la pérdida de estabilidad del biosensor en sí.

En la **Figura 97** se muestran los registros i - t para uno de los biosensores compósitos de grafito-Teflón ensayados en el análisis de una cerveza "0,0" con el bioanalizador automatizado a través de la aplicación "on-line", trabajando en *modo continuo*, con intervalos de monitorización de muestra de 1 h y recalibraciones unipuntuales con disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v). Dichos registros corresponden al inicio y al final del tiempo de vida del biosensor (**Figura 100a** y **Figura 100b**, respectivamente). Como se puede observar en la Figura 100b, a partir de las 60 h aproximadamente de trabajo, ya no se pudo llevar a cabo la recuperación de manera efectiva de la línea base tras calibrar con patrón, y además se acusó la falta de sensibilidad con respecto a la medida de la muestra.

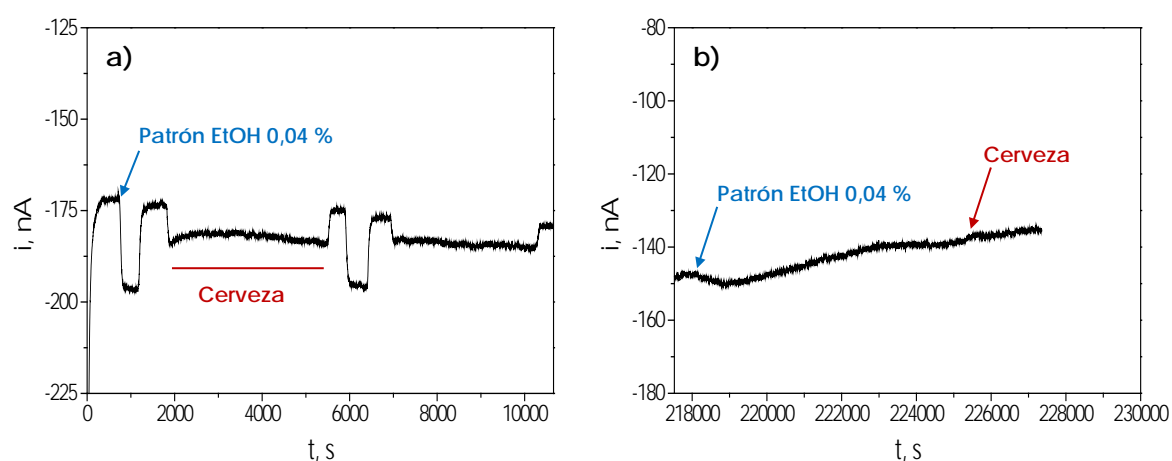


Figura 100. Registros amperométricos correspondientes al inicio (a) y a las 60 h (b) de análisis en la monitorización "on-line" de una cerveza "0,0" trabajando con el bioanalizador automatizado en modo continuo. Señales correspondientes al calibrado con disolución patrón de etanol 0,04 % (v/v) y medida continua de la muestra. Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4, con recirculación del desecho de célula. Caudal de trabajo: 4,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

En la **Figura 101** se muestran valores de intensidad de corriente correspondientes a la medida de disolución patrón en recalibraciones registrados durante el análisis que pertenece a la Figura 100. Como se puede ver, el biosensor fue perdiendo señal gradualmente. En este análisis se observó que a las 54 h aproximadamente de trabajo el biosensor todavía era capaz de recuperar la línea

base de manera efectiva y de proporcionar medidas reales de concentración de etanol en la cerveza.

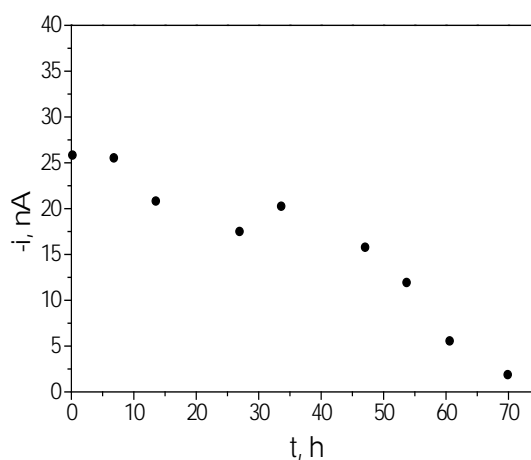


Figura 101. Gráfico de control para evaluar la estabilidad de un biosensor compuesto de grafito-Teflón de alcohol durante un análisis "on-line" trabajando en modo continuo. Intensidades de corriente correspondientes a disolución patrón de etanol de 0,04 % (v/v). Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4, con recirculación del desecho de célula. Caudal de trabajo: 4,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

El tiempo de vida promediado para el biosensor compuesto, trabajando en las condiciones experimentales establecidas para el bioanalizador automatizado, fue de 50 h, tiempo significativamente menor que las 80 h que se promediaron empleando este biosensor en el bioanalizador manual. Habiendo observado un buen funcionamiento promedio durante 50 h para este tipo de biosensor de alcohol, la pérdida de señal pudo ser atribuida al desgaste del biosensor y, teniendo en cuenta que se parte de unas condiciones de menor sensibilidad debido al alto caudal al que trabaja el bioanalizador automatizado, es razonable que se acuse antes este desgaste.

En el caso del *modo FIA*, como se ha indicado antes, al trabajar con volúmenes discretos de muestra, el flujo saliente como desecho de la célula de flujo va a contener menor cantidad de etanol y, por lo tanto, la disolución portadora se va a enriquecer en menor grado en etanol frente al modo continuo. Además de estudiar la influencia de la recirculación introducida en el sistema en el funcionamiento del bioanalizador trabajando como sistema FIA, se ha evaluado

también el efecto del alto caudal establecido en el tiempo de vida del biosensor de alcohol de acero inoxidable con capa delgada de oro. Considerando en primer lugar un análisis trabajando con la aplicación "on-line", para el que se programó un método de recalibración unipuntual cada cinco muestras o por una desviación superior al 10 % entre medidas, en la **Figura 102a** se han representado las intensidades de corriente de pico registradas en las medidas de disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v) durante el análisis de una cerveza "0,0", y en la **Figura 102b** se recogen todas las medidas de concentración de etanol en muestra registradas en dicho análisis.

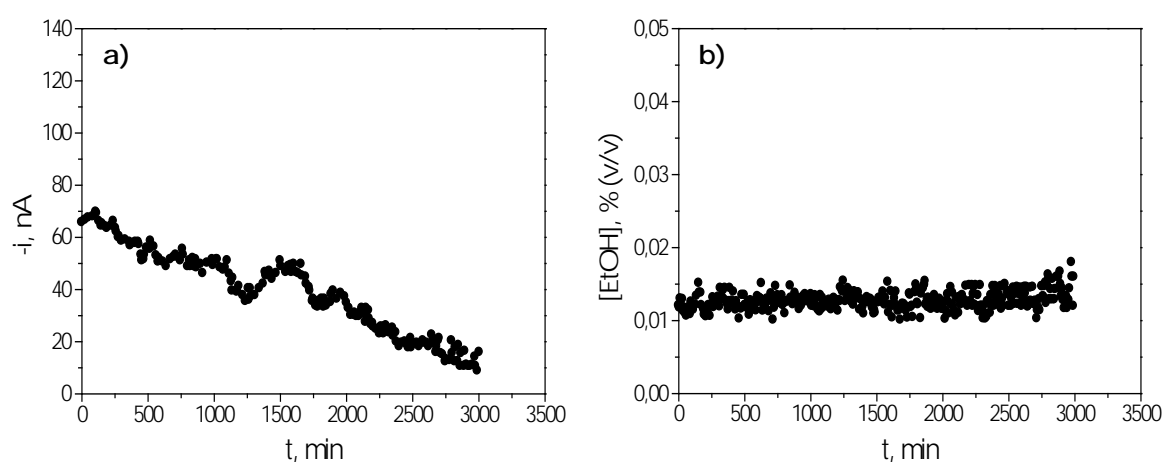


Figura 102. (a) Gráfico de control para evaluar la estabilidad de un biosensor Fc-AOD-HRP-AuE durante un análisis "on-line" trabajando en modo FIA. Intensidades de corriente correspondientes a disolución patrón de etanol de 0,04 % (v/v). (b) Concentraciones de etanol determinadas en una cerveza "0,0". Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4, con recirculación del desecho de célula. Volumen de bucle: 500 μL . Caudal de trabajo: 4,0 mL min⁻¹. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl.

Como se puede observar en la Figura 102a, el biosensor pierde señal paulatinamente con el tiempo de análisis. En el ejemplo mostrado, el biosensor presentó un tiempo de vida útil trabajando de manera ininterrumpida de 46 h aproximadamente (2780 min de análisis), tras el cual empezó a presentar una relación señal/ruido bastante baja y, por lo tanto, una mayor irreproducibilidad en las medidas registradas por el bioanalizador automatizado. Con respecto a la medida de muestra, en la Figura 102b se puede ver cómo con la aplicación de la recalibración cada cinco muestras la pérdida de señal por parte del biosensor se fue

corrigiendo de manera efectiva, de modo que las determinaciones de la concentración de etanol en la cerveza se fueron dando adecuadamente. A partir de los 2790 min aproximadamente de análisis, se observó un aumento considerable de la irreproducibilidad con que se determinaron las concentraciones de etanol en la cerveza.

Por último, la estabilidad del biosensor de alcohol de acero inoxidable con capa delgada de oro empleado como detector en el bioanalizador automatizado para el análisis "off-line" de cervezas de baja graduación, trabajando en las condiciones experimentales del desarrollo automatizado, se evaluó registrando medidas diarias de intensidad de corriente correspondientes a 500 μL de disolución patrón de etanol de concentración 0,04 % (v/v). Durante este estudio el biosensor se almacenó en humedad a 4°C. En la **Figura 103** se muestra el gráfico de control construido para un biosensor Fc-AOD-HRP-AuE tomando como valor central la media de 4 medidas sucesivas de patrón de etanol, obtenidas el primer día de trabajo del biosensor, y como valor de los límites superior e inferior de control la media $\pm 3s$ (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

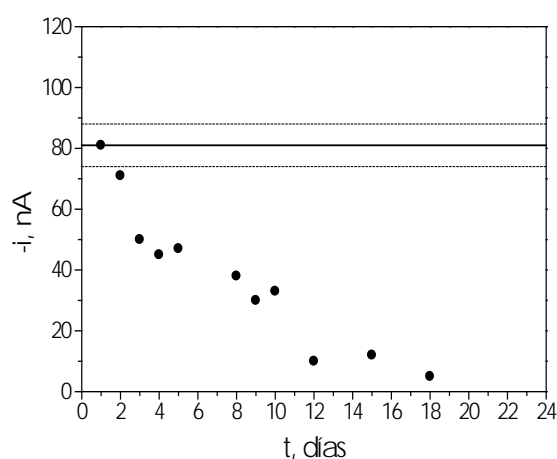


Figura 103. Gráfico de control para evaluar la estabilidad de un biosensor Fc-AOD-HRP-AuE en el análisis "off-line" trabajando en modo FIA. Intensidades de corriente correspondientes a disolución patrón de etanol de 0,04 % (v/v). Unidad doble de muestreo de 20 mm de diámetro de superficie de contacto con una membrana PTFE de 0,45 μm de diámetro de poro. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L^{-1} de pH 7,4, con recirculación del desecho de célula. Volumen de bucle: 500 μL . Caudal de trabajo: 4,0 mL min^{-1} . $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Como se puede observar en el gráfico, el biosensor va perdiendo señal progresivamente con los días de uso, encontrándose que aproximadamente a los 8 días de vida el biosensor ya no era capaz de detectar el etanol en cervezas con un contenido inferior al 0,003% (v/v), además de una disminución de la relación señal/ruido que hacía prácticamente inutilizable el biosensor como detector en el sistema FIA. Este tiempo es menor que los 13 días promediados para el tiempo de vida útil de este biosensor trabajando en el desarrollo manual, pero se debe tener en cuenta que se parte de una situación de menor sensibilidad con respecto al caudal de trabajo del sistema de flujo y, por lo tanto, la pérdida de señal con el uso se acusa antes. Este estudio se repitió cinco veces, concluyéndose que el biosensor se puede considerar operativo durante un periodo promedio de 10 días, durante el cual tiene la suficiente sensibilidad como para poder detectar el contenido de etanol por debajo de 0,04 % que es el límite máximo permitido para las cervezas "0,0". En ese tiempo se realizaron alrededor de 360 medidas de muestra con cada uno de los biosensores empleados para este estudio.

3.3.2.1.3. Validación del prototipo automatizado: análisis de muestras de cerveza

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en el análisis de diferentes muestras de cerveza de baja graduación empleando el bioanalizador automatizado desarrollado, trabajando con las aplicaciones "on-line" (en el modo continuo y FIA) y "off-line" para el control del instrumento, y equipando el prototipo con la unidad muestreadora de 20 mm para el análisis de cervezas "0,0" y con la unidad de 14 mm para el análisis de cervezas "Sin". En los análisis "on-line" todas las muestras fueron analizadas a 4°C y sin ser sometidas a ningún tratamiento o dilución previos al mismo. En el caso de la monitorización "off-line" se analizaron muestras a 0°C y a temperatura ambiente, siendo en todos los casos desgasificadas previamente mediante agitación con varilla de vidrio. Para la determinación de etanol en cada muestra, tal y como ya se estableció para los desarrollos manuales, se realizó un calibrado unipuntual con la disolución patrón de etanol de 0,04 % (v/v) para el análisis de cerveza "0,0" y de 0,8 % (v/v) para el análisis de cerveza "Sin".

Así, en las **Tablas 49 y 50** se recogen los valores de concentración de etanol para cada tipo de cerveza obtenidos con el bioanalizador automatizado trabajando a través de la aplicación "on-line" en los modos de monitorización continuo y FIA, respectivamente, junto con los resultados obtenidos por el método amperométrico en discontinuo validado por InBea.

Tabla 49. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de etanol en muestras de cerveza con bajo contenido alcohólico empleando el bioanalizador automatizado en modo continuo y el método validado de InBea Biosensores S.L.

Método	Bioanalizador automatizado	InBea	t_{exp}
Muestra	[EtOH] promedior %	[EtOH] promedior %	
Cerveza "0,0" - 1	0,0070 ± 0,0009 (RSD $n=3$ = 5,0 %)	0,0069 ± 0,0008 (RSD $n=3$ = 4,9 %)	1,999
Cerveza "0,0" - 2	0,011 ± 0,002 (RSD $n=3$ = 6,7 %)	0,0093 ± 0,0008 (RSD $n=3$ = 3,6 %)	
Cerveza "0,0" - 3	0,030 ± 0,001 (RSD $n=3$ = 2,0 %)	0,027 ± 0,001 (RSD $n=3$ = 2,0 %)	
Cerveza "0,0" - 4	0,015 ± 0,003 (RSD $n=3$ = 9,0 %)	0,0135 ± 0,0003 (RSD $n=3$ = 0,8 %)	
Cerveza "Sin" - 1	0,82 ± 0,02 (RSD $n=3$ = 0,9 %)	0,80 ± 0,07 (RSD $n=3$ = 3,7 %)	
Cerveza "Sin" - 2	0,96 ± 0,02 (RSD $n=3$ = 0,9 %)	0,91 ± 0,08 (RSD $n=3$ = 3,3 %)	
Cerveza "Sin" - 3	0,89 ± 0,02 (RSD $n=3$ = 0,7 %)	0,87 ± 0,05 (RSD $n=3$ = 2,2 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

La metodología empleada para la validación de los resultados obtenidos con el bioanalizador automatizado trabajando en modo continuo ha sido el ensayo de hipótesis utilizando el método de la t de Student para datos pareados. Como se puede observar en la Tabla 49, el valor de $t_{experimental}$ calculado ha resultado ser menor que el valor crítico $t_{tabulada}$ (6 grados de libertad, $p = 0,05$) = 2,447, por lo que se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los métodos empleados al nivel de significación estudiado.

Tabla 50. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de etanol en muestras de cerveza con bajo contenido alcohólico empleando el bioanalizador automatizado en modo FIA y el método validado de InBea Biosensores S.L.

Método	Bioanalizador automatizado	InBea
Muestra	[EtOH] _{promedio} %	[EtOH] _{promedio} %
Cerveza "0,0" - a	0,0109 ± 0,0006 (RSD _{n=22} = 12,5 %)	0,011 ± 0,001 (RSD _{n=3} = 5,3 %)
Cerveza "0,0" - b	0,0133 ± 0,0006 (RSD _{n=45} = 16,1 %)	0,0135 ± 0,0007 (RSD _{n=5} = 4,0 %)
Cerveza "0,0" - c	0,013 ± 0,001 (RSD _{n=19} = 16,3 %)	0,0128 ± 0,0005 (RSD _{n=5} = 3,2 %)
Cerveza "0,0" - d	0,0122 ± 0,0009 (RSD _{n=21} = 16,8 %)	0,0122 ± 0,0003 (RSD _{n=3} = 1,0 %)
Cerveza "0,0" - e	0,0038 ± 0,0004 (RSD _{n=38} = 19,1 %)	0,0036 ± 0,0008 (RSD _{n=3} = 9,1 %)
Cerveza "0,0" - f	0,0262 ± 0,0006 (RSD _{n=49} = 7,4 %)	0,025 ± 0,002 (RSD _{n=5} = 6,3 %)
Cerveza "Sin" - a	0,88 ± 0,05 (RSD _{n=18} = 11,8 %)	0,92 ± 0,03 (RSD _{n=5} = 2,7 %)
Cerveza "Sin" - b	0,93 ± 0,03 (RSD _{n=72} = 13,0 %)	0,91 ± 0,04 (RSD _{n=5} = 3,9 %)

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Los resultados obtenidos con el bioanalizador automatizado trabajando en modo FIA a través de la aplicación "on-line", mostrados en la Tabla 50, se han validado empleando el método de las rectas de regresión para la comparación con la metodología desarrollada por InBea. La recta de regresión obtenida, representada en la **Figura 104**, tiene un valor de la pendiente de $(0,99 \pm 0,02)$ y de la ordenada en el origen de $(0,0004 \pm 0,007)$, por lo tanto los intervalos de confianza de cada parámetro incluyen el 1 y el 0, respectivamente, lo que pone de manifiesto que la metodología desarrollada para la determinación de etanol en cervezas de baja graduación con el bioanalizador automatizado es adecuado. Además el valor del coeficiente r es de 0,9992, lo que indica una buena correlación de los resultados de grado alcohólico obtenidos con el bioanalizador y el método validado.

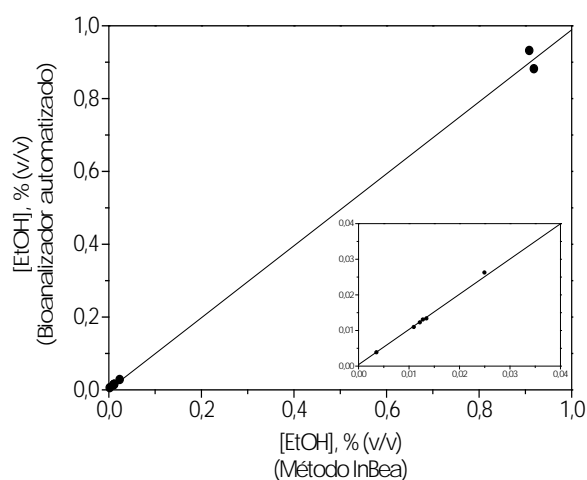


Figura 104. Comparación de los resultados obtenidos para el análisis del contenido de etanol en cervezas empleando el bioanalizador automatizado en modo FIA, con la aplicación “on-line”, frente a los resultados obtenidos con el método de InBea.

Asimismo, en la **Tabla 51** se muestran los resultados obtenidos con el bioanalizador trabajando a través de la aplicación “off-line” en el laboratorio de I+D de una empresa cervecera junto con los obtenidos mediante cromatografía de gases.

Tabla 51. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de etanol en muestras de cerveza con bajo contenido alcohólico empleando el bioanalizador automatizado en modo FIA y el método cromatográfico.

Método	Bioanalizador automatizado		Cromatografía gases	$t_{exp} (1)$	$t_{exp} (2)$
Muestra	T ^a de muestra	[EtOH] promedior %	[EtOH], %		
Cerveza “0,0” - α	ambiente	0,005 ± 0,001 (RSD $n=4$ = 12,3 %)	0,005	0,472	1,272
	0° C	0,006 ± 0,001 (RSD $n=4$ = 13,0 %)		2,067	
Cerveza “0,0” - β	ambiente	0,0038 ± 0,0008 (RSD $n=4$ = 13,5 %)	0,004	0,577	0,590
	0° C	0,0037 ± 0,0004 (RSD $n=4$ = 7,8 %)		2,263	
Cerveza “0,0” - γ	0° C	0,031 ± 0,002 (RSD $n=5$ = 4,6 %)	0,030	1,118	-

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Leyenda de la Tabla 51:

(1): valor experimental del estadístico t a un nivel de significación del 0,05 para la comparación de la media obtenida con el bioanalizador automatizado con el valor obtenido por cromatografía de gases.

(2): valor experimental del estadístico t a un nivel de significación del 0,05 para la comparación de las medias obtenidas en el análisis de una misma muestra a diferentes temperaturas.

Por último, para validar los resultados obtenidos con el bioanalizador automatizado trabajando en modo FIA a través de la aplicación "off-line" se ha empleado el método de la t de Student tomando el dato obtenido por la metodología de la cromatografía de gases como valor de referencia. Como se puede observar en la Tabla 51, en todos los casos los valores de $t_{\text{experimental}}$ calculados para cada muestra han resultado ser inferiores a las correspondientes t_{tabulada} , siendo los valores $t_{\text{tab}}(3 \text{ grados de libertad, } p = 0,05) = 3,182$ para los análisis de las muestras α y β y $t_{\text{tab}}(4 \text{ grados de libertad, } p = 0,05) = 2,776$ para el análisis de la muestra γ .

Para la comparación de los resultados obtenidos a diferentes temperaturas, se ha empleado como método el ensayo de hipótesis utilizando el método de la t de Student para la comparación de dos medias experimentales. Como se puede observar en la Tabla 51, en todos los casos los valores de $t_{\text{experimental}}$ calculados para cada muestra han resultado ser menores que el valor crítico $t_{\text{tabulada}}(6 \text{ grados de libertad, } p = 0,05) = 2,447$. De la comparación de las t de Student para las diferentes temperaturas para una misma muestra, se puede deducir que no existen diferencias significativas en los valores de concentración de etanol determinados al variar la temperatura de la muestra y, por lo tanto, se puede afirmar que no hay errores sistemáticos en el método propuesto. Como ya se demostró para los desarrollos manuales, esto es debido a que el camino que recorre la muestra desde el punto de muestreo hasta la unidad muestreadora es lo suficientemente largo como para que se alcance la temperatura de la disolución aceptora (temperatura ambiente), lo cual hace que no haya variaciones en la cantidad de etanol que atraviesa la membrana y, por tanto, no se produzcan variaciones en la concentración de etanol medida, tal y como se pone de manifiesto en los resultados obtenidos.

3.3.2.2. Bioanalizador automático de ácido L-málico

En este apartado se describe el desarrollo de un bioanalizador automático que permita el análisis de ácido L-málico en muestras de vino. Para llevarlo a cabo, además de considerar como base de desarrollo el sistema FIA manual desarrollado anteriormente en el Apartado 3.3.1.2, se tomó como punto de partida, con respecto a la etapa de mecanizado del instrumento, el prototipo de bioanalizador automatizado de etanol desarrollado en el Apartado 3.3.2.1. De nuevo, por lo que respecta al "hardware" y al "software" del Sistema de Control, fue requerida la colaboración del Grupo HCTLab de la Escuela Politécnica Superior de la UAM para el desarrollo de la microelectrónica y de la aplicación informática, necesarias para el funcionamiento y control del bioanalizador.

3.3.2.2.1. Diseño del prototipo automático

Con el fin de obtener un instrumento analítico basado en la metodología FIA que permitiera el análisis automático de ácido L-málico en muestras de vino, se llevó a cabo la modificación del esquema de flujo del bioanalizador automatizado de etanol, manteniendo el diseño mecánico y electrónico del prototipo. Para el funcionamiento y control automáticos del instrumento se llevó a cabo el desarrollo de un "software" que permitiera la programación del método y las condiciones de análisis, así como la visualización de la información analítica y de los resultados obtenidos.

3.3.2.2.1.1. Diseño mecánico del instrumento

En este apartado se indica que sólo fue necesario rediseñar el esquema de flujo de manera que el funcionamiento del sistema fuera el mismo que en el desarrollo manual de este bioanalizador, es decir, un sistema de análisis en flujo básico, ya que todos los componentes del bioanalizador de etanol fueron los mismos (célula electroquímica de flujo, electroválvulas y bombas peristálticas). Solamente se prescindió de la unidad muestreadora y de una de las bombas

peristálticas, no necesarias en el bioanalizador de ácido málico. En la **Figura 105**, se muestra el esquema de la configuración del bioanalizador de ácido málico. Por otro lado, sí se mantuvo intacto el diseño del dispositivo de metacrilato con las electroválvulas. Dicho módulo, como ya se indicó anteriormente, actúa como gestor de flujo del sistema, además de conformar la válvula de inyección del sistema FIA. El diseño mecánico final del instrumento se muestra en la **Figura 106**.

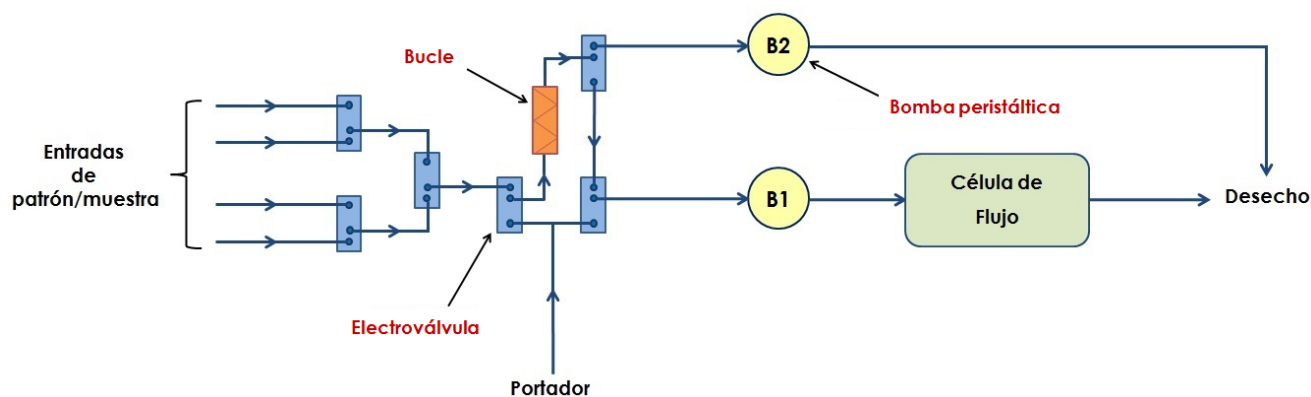


Figura 105. Esquema del sistema de flujo del bioanalizador automático para el análisis de ácido L-málico en vinos.

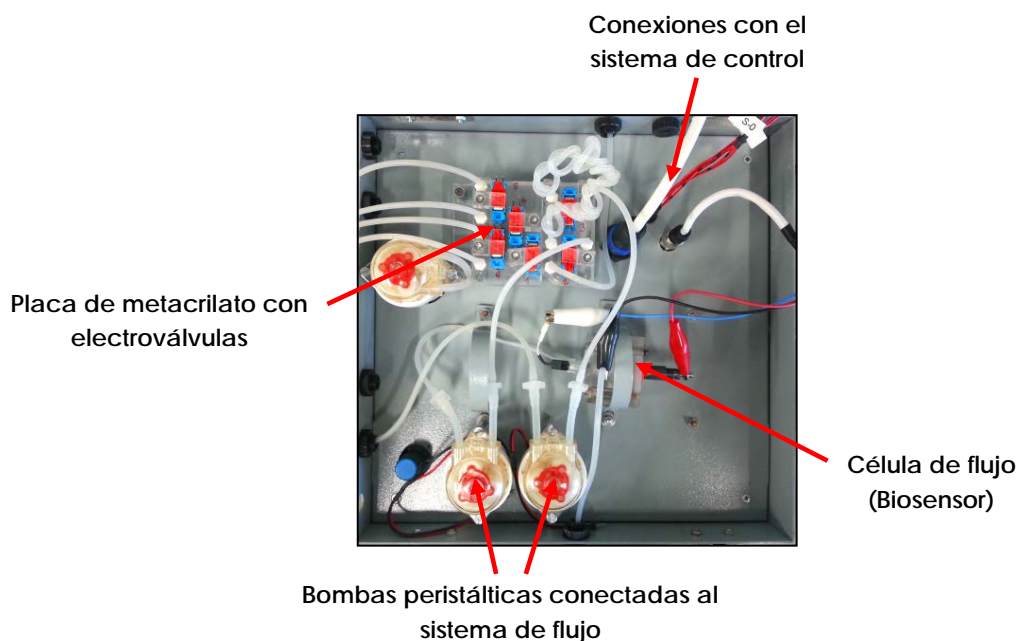


Figura 106. Vista superior del bioanalizador automático de ácido L-málico.

Como se puede ver en la Figura 105, este bioanalizador sólo presenta un modo de configurar las entradas de flujo con respecto a las entradas o salidas de

disolución del módulo de válvulas y que corresponde con el del funcionamiento del instrumento como bioanalizador FIA, es decir, una entrada de portador, dos salidas de flujo y cuatro entradas para las disoluciones patrón y de muestras en la parte correspondiente al selector de muestras del módulo de válvulas.

3.3.2.2.1.2. Diseño electrónico del instrumento

Como ya se explicó en el Apartado 3.3.2.1.1.2 en referencia al diseño y montaje del aparato eléctrico y electrónico del prototipo, se integraron en el mismo los componentes y se establecieron las interacciones necesarios para su funcionamiento automático, equipándolo con un detector amperométrico y constituyendo los distintos tipos de conexiones necesarias entre el ordenador y el equipo analítico.

Con respecto a la interfase activa, en el caso del bioanalizador de ácido málico, el ordenador se va a limitar a controlar el sistema de manera que el instrumento exhiba una actividad estrictamente automática, posibilitando la activación y desactivación de los componentes electrónicos siguiendo el método de análisis preestablecido. El bioanalizador facilita la información analítica pero sin llevar a cabo una evaluación de dicha información en ningún momento.

3.3.2.2.1.3. Diseño y desarrollo del "software" de control del instrumento

Para el funcionamiento del bioanalizador automático se llevó a cabo el desarrollo de una aplicación informática que permitiera el control del instrumento y la visualización de la información analítica registrada. Además, dicho desarrollo, por sus características y configuración, va a presentar una funcionalidad genérica con respecto a la aplicación analítica y, por tanto, va a posibilitar que el bioanalizador FIA pudiera ser empleado para otras aplicaciones diferentes al análisis de ácido L-málico en función del biosensor utilizado.

Así, considerando en primer lugar la **interfaz de usuario**, dicho componente del "software" va a permitir, a través de las diferentes pestañas que ofrece la aplicación, la visualización de la curva que se va registrando, la programación de los parámetros de configuración relativos a la calibración y al análisis de las muestras y la visualización de los resultados obtenidos. Con respecto a la visualización de la curva amperométrica registrada por el bioanalizador, los elementos que van a proporcionar información al operador (**Figura 107**) son el *bloque gráfico*, en el que se representa el fiagrama según va siendo registrado por el sistema, y los *parámetros de registro*, donde se muestra el potencial al que se está trabajando y el valor de corriente amperométrica que va registrando el sistema.

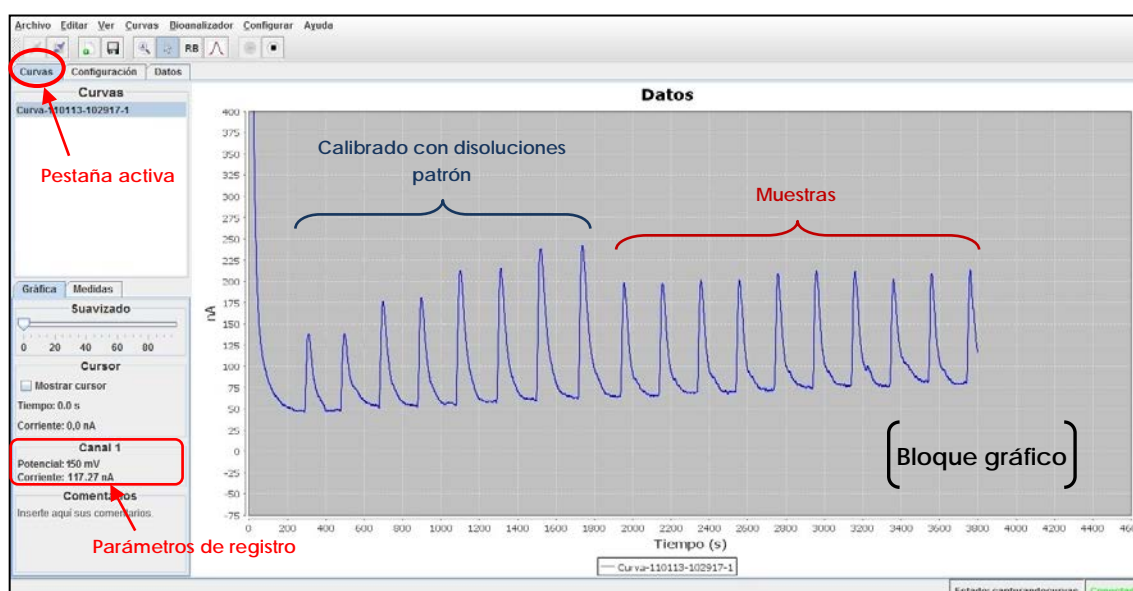


Figura 107. Aspecto de la interfaz de usuario del "software" de control del bioanalizador automático para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino. Pestaña "curvas" activa para su visualización en pantalla.

Asimismo, se determinó que el método y las condiciones de trabajo a aplicar en un análisis se pudieran predefinir desde la misma interfaz de usuario. Como se puede ver en la **Figura 108**, desde la pestaña de configuración se puede establecer el potencial de trabajo y el tipo de reacción electroquímica a monitorizar (oxidación o reducción), con respecto a la calibración, el número de patrones que comprenderá el calibrado, el número de réplicas a realizar y la concentración de

cada punto del calibrado, las unidades en que se van a expresar las concentraciones (a definir entre %, g L⁻¹, mg L⁻¹ y mol L⁻¹), así como el tipo de curva al que se van a ajustar los puntos del calibrado (a definir el ajuste entre lineal, cuadrático o cúbico).

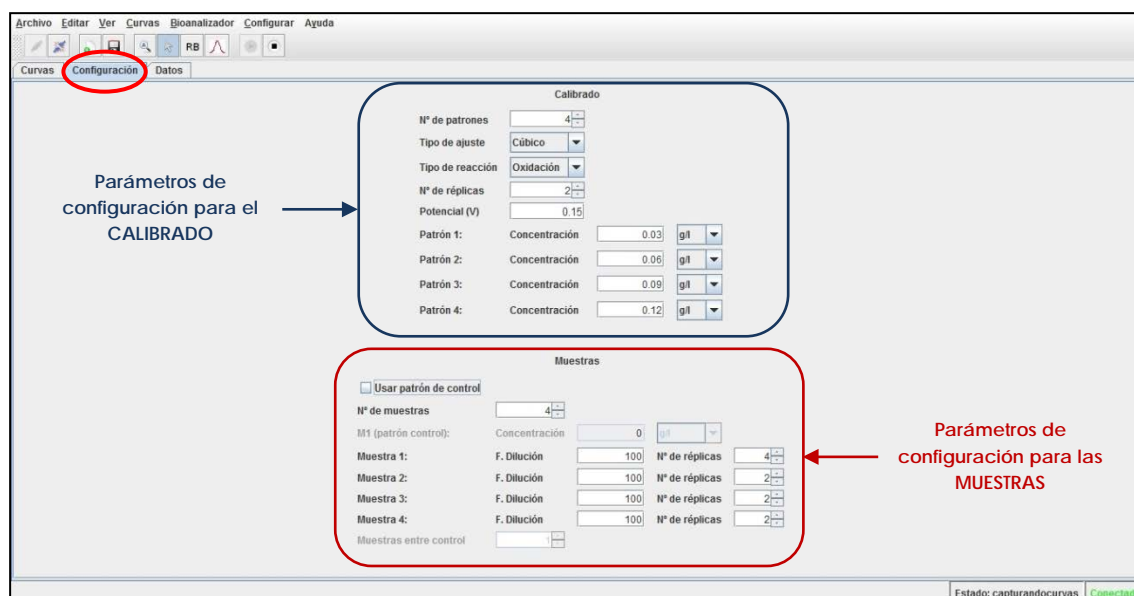


Figura 108. Aspecto de la interfaz de usuario del "software" de control del bioanalizador automático para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino. Pestaña "configuración" activa para su visualización en pantalla.

Con respecto a las muestras, se posibilita configurar el número de muestras a analizar y, para cada muestra, se puede definir el número de medidas a realizar y el factor de dilución que debe considerar el sistema para el cálculo de la concentración de analito en la muestra. Además, permite programar la introducción de un *patrón de control*, cuya función es permitir al operador chequear durante el análisis de una muestra que la señal que proporciona el biosensor no ha variado para un nivel de concentración de analito con respecto a la que se obtuvo durante el calibrado y, por lo tanto, las medidas de las muestras se están dando adecuadamente. Para dicho patrón, es posible definir, además de su concentración, el número de medidas de muestra a realizar por el sistema antes de que éste introduzca el patrón de control.

En referencia a la calibración y posterior medida de muestras, se ha posibilitado usar todas las entradas de muestra disponibles del sistema de modo que en el análisis se comprenden dos fases con respecto al empleo y disposición de las entradas del selector de muestras: una primera fase de calibración en la que en las entradas se colocan las disoluciones patrón a medir, y una segunda fase en la que, tras aparecer un mensaje en pantalla en el que el sistema invita a sustituir las disoluciones patrón por las disoluciones de muestra, se inicia la fase de medida de las muestras tras haber dado la orden para ello. Por lo tanto, para cada fase el máximo de disoluciones a introducir es de cuatro, ya que el diseño del dispositivo con las electroválvulas instalado en el prototipo tiene cuatro entradas de muestra, pero el "software" está preparado para controlar hasta 64 entradas de muestra.

Asimismo, de manera adicional para el control del bioanalizador automático, se estableció un fichero anexo con **parámetros de configuración**, como se hiciera con la aplicación para el análisis de etanol en cervezas. Así, en la **Figura 109** se muestra el fichero de configuración del "software" y en la **Tabla 52** se recogen las funciones que desempeñan los parámetros de dicho fichero.

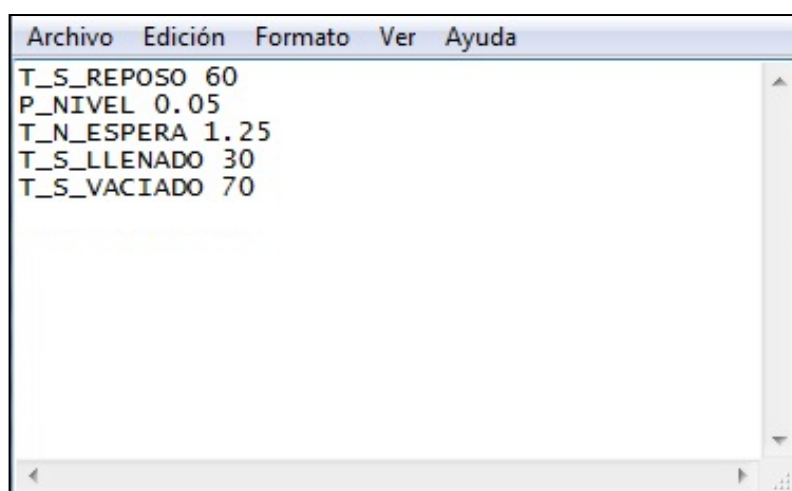


Figura 109. Fichero de configuración del "software" de control del bioanalizador automático.

Tabla 52. Funciones de los parámetros de configuración del "software" de control del bioanalizador automático mostrados en la Figura 109.

Parámetro	Función
T_S_REPOSO	Tiempo en segundos que se emplean para medir la intensidad de corriente correspondiente a la disolución portadora para verificar la estabilidad de la línea base.
P_NIVEL	Máxima pendiente de la curva en valor absoluto que se tolera para considerar que la intensidad de corriente correspondiente a la línea base es estable.
T_N_ESPERA	Factor de tiempo empleado para la estabilización de la línea base para que el sistema comience a verificar la estabilización de la intensidad de corriente, antes de la introducción de disolución patrón o de muestra.
T_S_LLENADO	Tiempo en segundos empleado para llenar el bucle de patrón o de muestra.
T_S_VACIADO	Tiempo en segundos durante el cual se busca el valor extremo del pico amperométrico.

Como se puede observar, para este "software", a comparación del desarrollado para la monitorización de etanol en cerveza, el fichero de configuración resulta significativamente más sencillo, en el que todos los parámetros tienen una función activa durante el análisis. El funcionamiento automático, es decir, no automatizado del bioanalizador a través de la aplicación informática implicó la necesidad de definir y controlar un menor número de parámetros de configuración. Además, no se incluyó un tratamiento de limpieza del sistema de flujo post-análisis, determinándose que para llevar a cabo la limpieza del mismo se ejecutara el método de un análisis, introduciendo por las entradas de flujo las disoluciones de limpieza en lugar de las disoluciones que participan en un análisis.

Con respecto a los parámetros del fichero de configuración, todos estos participan durante la realización de un análisis, ya que en este desarrollo sólo se lleva a cabo la medida de picos amperométricos como modo de monitorizar las señales analíticas obtenidas. Considerando las dos fases que se diferenciaron de cara al registro de una medida amperométrica, que son por un lado la

estabilización de la línea base y por otro la medida propiamente dicha, como se puede observar en la **Figura 110**, para esta aplicación se simplificó la cantidad de parámetros a designar como necesarios en cada fase para que el sistema lo lleve a cabo adecuadamente, en comparación con los desarrollos para el análisis de etanol.

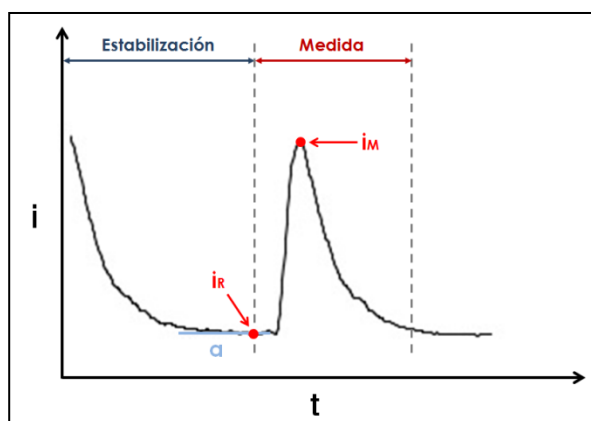


Figura 110. Parámetros involucrados en el registro de una señal amperométrica.

De este modo, en una primera fase de **estabilización** de la corriente amperométrica, en la que se establece la línea base que servirá como referencia para la medida de la altura del pico amperométrico, los parámetros que se deben considerar, según lo indicado en la Tabla 52, son T_S_REPOSO , P_NIVEL y T_N_ESPERA . De nuevo, se debe tener en cuenta en el momento de introducir los datos en el fichero de configuración que los valores establecidos para dichos parámetros tienen que ser coherentes con el comportamiento del biosensor, de manera que la estabilización de la intensidad de corriente y el registro de los picos se den de un modo eficaz para la obtención de medidas analíticas con una reproducibilidad y exactitud adecuadas.

En el instante en el que el sistema considera que la intensidad de corriente correspondiente a la medida de la disolución portadora es estable, es decir, la pendiente " a " cumple la condición establecida a partir del parámetro P_NIVEL , éste considera el valor de " i_R " como el valor de la intensidad de corriente de la línea base que servirá de referencia para la medida de la magnitud de una señal. A partir de ese momento, la corriente registrada ya es debida al proceso de oxidación que se

produce en la superficie del electrodo que corresponderá o bien al patrón para la construcción del calibrado o bien al analito de la muestra, con lo que comienza la fase de **medida** propiamente dicha. La duración de esta fase depende de los datos introducidos para los parámetros T_S_LLENADO y T_S_VACIADO, habiendo considerado de nuevo que el tiempo necesario para registrar el valor máximo del pico amperométrico " i_M " depende de las dimensiones del sistema de flujo y del caudal de trabajo y, por lo tanto, el tiempo aplicado para el llenado del bucle con patrón o con muestra debe ser tenido en cuenta para la estimación de ese valor máximo de la curva " i_M ". De este modo se asegura que en el sistema de flujo se ha llevado a cabo el arrastre del contenido del bucle por parte del portador de manera completa.

Una vez consumido el tiempo programado para esta fase, el sistema registra el dato de intensidad de pico y realiza la operación pertinente, ya sea emplearlo para la obtención de la curva de calibrado o para su interpolación, si lo inyectado es la muestra, en dicha curva y así obtener la concentración de analito en la muestra.

Con respecto a la **adquisición y tratamiento de datos** obtenidos por el bioanalizador, éstos van apareciendo y quedando compilados en la pestaña de "datos" de la interfaz de usuario de la aplicación, según van siendo éstos registrados (**Figura 111**). Para la calibración, como se puede observar en la **Figura 111a**, para cada medida de patrón va apareciendo el dato de intensidad de pico FIA, indicando la concentración y la réplica a la que corresponde. Una vez realizadas todas las medidas de patrón, el sistema lleva a cabo el cálculo de la ecuación de ajuste a partir de la media de cada punto de calibrado y considerando el valor 0,0 siendo, en el caso específico de la aplicación del análisis de ácido L-málico, la ecuación de un **polinomio de tercer grado**, incluyendo ésta en pantalla para su visualización. Asimismo, para las medidas de las muestras, como se puede ver en la **Figura 111b**, para cada una se indica, del mismo modo que para las medidas de patrón, el dato de intensidad del pico FIA de cada réplica y, tras interpolar en la curva de calibrado el valor de intensidad de corriente y aplicar el correspondiente factor de dilución, se muestra el valor de concentración de ácido L-málico en la muestra.

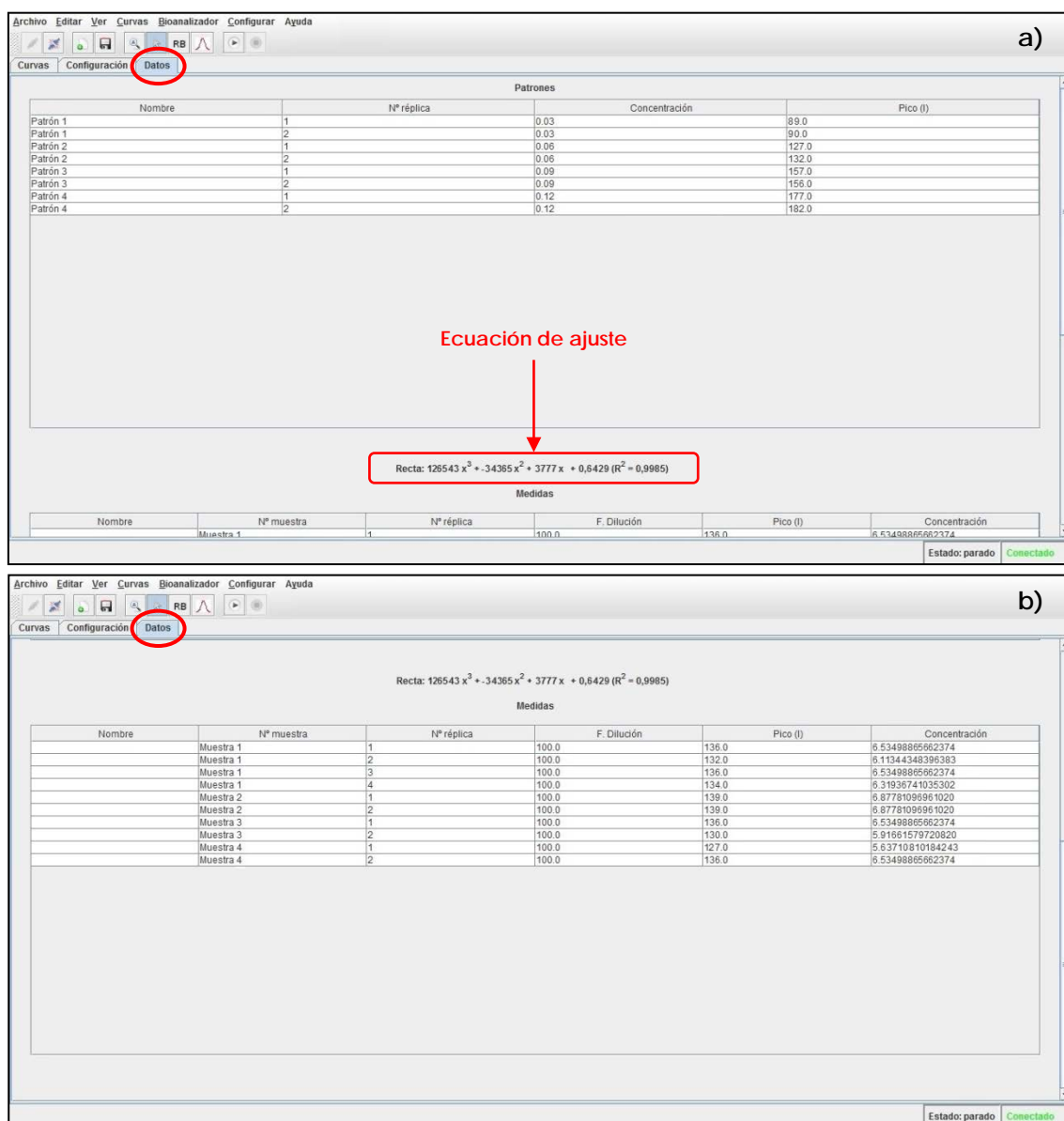


Figura 111. Aspecto de la interfaz de usuario del “software” de control del bioanalizador automático para el análisis de ácido L-málico en muestras de vino. Pestaña “Datos” activa para su visualización en pantalla. **(a)** Datos correspondientes al calibrado. **(b)** Datos correspondientes a las muestras.

3.3.2.2.2. Características operacionales del bioanalizador automático

En este apartado se han estudiado las características referentes al funcionamiento del bioanalizador de ácido L-málico desarrollado. Debido al empleo de las nuevas bombas peristálticas el caudal de trabajo es de 4,0 mL min⁻¹, ligeramente superior al del desarrollo manual (3,0 mL min⁻¹) y, por lo tanto, las

condiciones de trabajo no se vieron significativamente modificadas. No obstante, para definir las prestaciones reales del instrumento desarrollado, se han evaluado la precisión de las medidas, los tiempos de respuesta y de análisis, las características analíticas y el tiempo de vida del biosensor de ácido L-málico en las condiciones experimentales dadas por el bioanalizador automático.

3.3.2.2.1. Curvas de calibrado y características analíticas

En las condiciones experimentales establecidas para el bioanalizador automático y empleando el biosensor de ácido L-málico como detector, se han construido las curvas de calibrado en el intervalo de concentración comprendido entre 0 y 0,12 g L⁻¹. En la **Figura 112a** se muestra un registro intensidad-tiempo obtenido con el bioanalizador automático y en la **Figura 112b** se ha representado la dependencia de la intensidad de corriente de pico medida con la concentración de ácido L-málico.

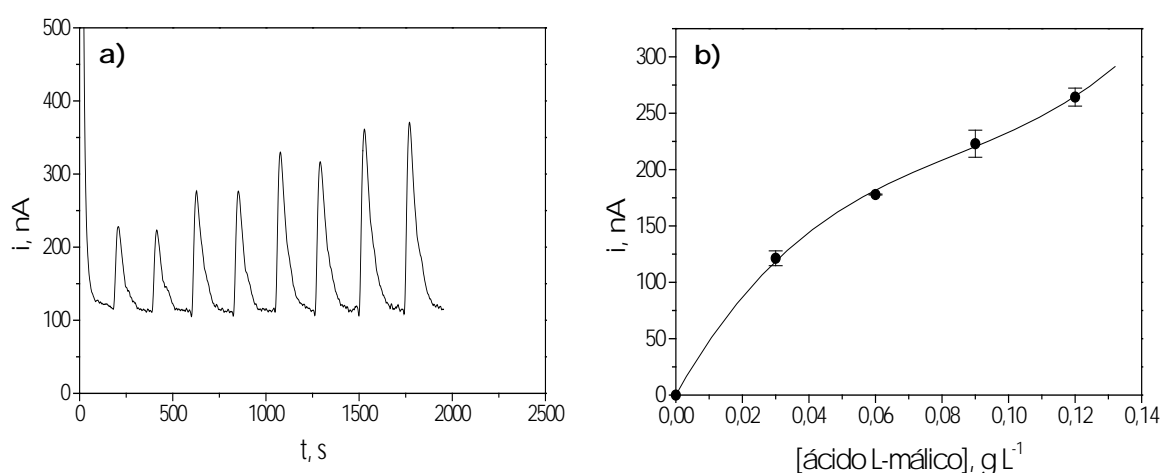


Figura 112. (a) Diagrama obtenido para disoluciones patrón de ácido L-málico de concentraciones crecientes. (b) Curva de calibrado obtenida a partir del registro intensidad-tiempo (a). Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0 y NAD⁺ 1 mmol L⁻¹. Volumen de bucle: 500 μ L. Caudal de trabajo: 4,0 mL min⁻¹. $E_{ap} = +0,15$ V vs. Ag/AgCl. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Como fue estudiado previamente en el desarrollo del bioanalizador manual de ácido L-málico (Apartado 3.3.1.2.3), el tipo de ajuste que mejor describe el comportamiento del sistema frente a la concentración de sustrato es el polinómico de grado 3. Como criterios para evaluar el grado de ajuste y estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado los indicados en el Apartado 3.3.1.2.3. En la **Tabla 53** se muestran los parámetros de la ecuación de la curva de ajuste y el coeficiente de determinación R^2 obtenidos, junto con los límites de detección y de cuantificación.

Tabla 53. Parámetros de la ecuación polinómica de tercer grado $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, coeficientes de determinación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a la curva de calibrado de la Figura 112.

Parámetro "a"	Parámetro "b"	Parámetro "c"	Parámetro "d"	R^2	LD, g L ⁻¹	LC, g L ⁻¹
1 ± 5	(5,2 ± 0,5) × 10 ³	(-5 ± 1) × 10 ⁴	(1,9 ± 0,5) × 10 ⁵	0,9993	6,8 × 10 ⁻⁴	2,6 × 10 ⁻³

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Si se comparan las características analíticas obtenidas para el bioanalizador automatizado (Tabla 53) con las que se obtuvieron para el desarrollo manual (Tabla 29 del Apartado 3.3.1.2.3), en el caso del prototipo automático el sistema proporciona una menor sensibilidad. No obstante, esto resulta ser coherente con el hecho de que el sistema automatizado trabaja a un caudal mayor que para el desarrollo manual, por lo que el sistema parte de una situación de menor sensibilidad.

Además, con este bioanalizador se pudo comprobar cómo la célula cilíndrica de pequeño volumen, diseñada para su implementación en los equipos automatizados, proporciona unas condiciones de detección electroquímica de menor sensibilidad en comparación con las que proporciona la célula "wall-jet" de gran volumen, empleada en los desarrollos manuales. Esto es debido a que, por el propio diseño de la célula cilíndrica, se da en un pequeño grado la dilución de la muestra antes de que ésta llegue a la superficie del biosensor. Así, en la **Figura 113** se muestran los fiagramas obtenidos para una misma concentración de patrón de

ácido L-málico ($0,06 \text{ g L}^{-1}$) cuando se trabaja con el bioanalizador automático equipado con ambos tipos de célula electroquímica de flujo: una célula "wall-jet" de gran volumen (**Figura 113a**) y una célula cilíndrica de pequeño volumen (**Figura 113b**).

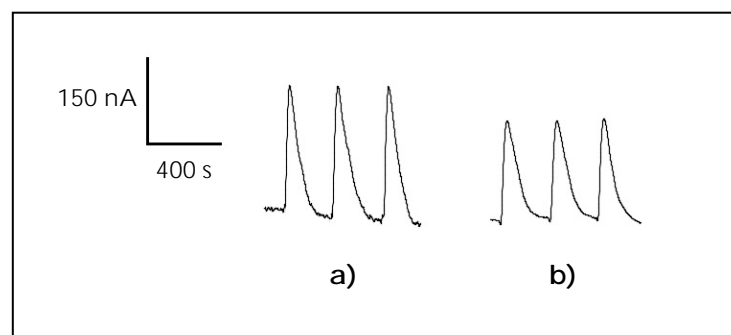


Figura 113. *Diagramas obtenidos para disoluciones patrón de ácido L-málico de concentración $0,06 \text{ g L}^{-1}$ trabajando con el bioanalizador automático equipado con una célula "wall-jet" de gran volumen (a) y con una célula cilíndrica de pequeño volumen (b). Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Volumen de bucle: $500 \mu\text{L}$. Caudal de trabajo: $4,0 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.*

Del estudio de la Figura 113, se puede deducir que la pérdida de sensibilidad provocada por el diseño de la célula electroquímica de flujo no es significativa, ya que se tiene suficiente sensibilidad para distinguir pequeños cambios en la concentración de ácido L-málico en las muestras y, por lo tanto, el bioanalizador automático va a permitir realizar el análisis del analito en muestras de vino de manera adecuada.

3.3.2.2.2. Precisión instrumental y tiempo de respuesta

Inicialmente, para estudiar la repetitividad de los picos amperométricos proporcionados por el bioanalizador automático se llevaron a cabo 20 medidas sucesivas de disoluciones patrón de ácido L-málico de concentración $0,06 \text{ g L}^{-1}$ (**Figura 114**). Las señales amperométricas se obtuvieron empleando el selector de muestras con el fin de comprobar su funcionamiento y comprobar que la introducción de los patrones por cada uno de los canales no afecta de manera sensible la reproducibilidad de las medidas. Por cada uno de los canales se

introdujeron cinco réplicas de cuatro disoluciones patrón de ácido L-málico de la misma concentración anteriormente indicada. Así, para las señales registradas para cada entrada del selector, numeradas dichas entradas de la 1 a la 4, se obtuvieron unos valores de RSD de 2,2 %, 1,4 %, 1,4 % y 1,8 %, respectivamente. El valor de la desviación estándar relativa total para las 20 medidas fue de 2,9 %. Estos resultados ponen de manifiesto la buena reproducibilidad con que el bioanalizador automático proporciona las medidas amperométricas, además de demostrar que prácticamente no hay influencia del canal por donde se introduce la muestra en el bioanalizador sobre la repetitividad.

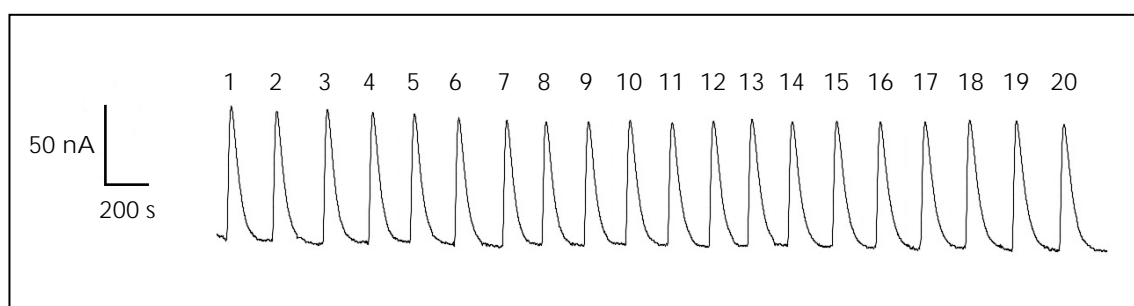


Figura 114. *Diagrama correspondiente a 20 medidas sucesivas registradas para disoluciones patrón de ácido L-málico de concentración $0,06 \text{ g L}^{-1}$ introducidas por la entrada 1 (medidas 1 – 5), la entrada 2 (medidas 6 – 10), la entrada 3 (medidas 11 – 15) y la entrada 4 (medidas 16 – 20) del selector de muestras, trabajando con el bioanalizador automático. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Volumen de bucle: $500 \mu\text{L}$. Caudal de trabajo: $4,0 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.*

Para evaluar la precisión con que el bioanalizador automático registra las señales analíticas, medidas a partir de la curva amperométrica que se va obteniendo, y realiza los cálculos para la determinación de la concentración de ácido L-málico en las muestras de vino, se han comparado los valores obtenidos y compilados en la pestaña de resultados del "software" con los que se obtienen si se realiza la cuantificación de esas señales de manera manual, es decir, midiéndolas directamente sobre los registros intensidad-tiempo obtenidos. Así, en las **Tablas 54** y **55** se muestran los resultados obtenidos en la calibración y en las medidas de la muestra, respectivamente, tanto por el "software" de control del bioanalizador automático como mediante la medida manual de las señales registradas en el análisis de una muestra de vino.

Tabla 54. Resultados obtenidos en la calibración del bioanalizador automático de ácido L-málico para el análisis de una muestra de vino, midiendo las señales amperométricas automáticamente y de manera manual.

[ácido L-málico], g L ⁻¹	Medida	Automático	Manual	Error relativo		
		i, nA	i, nA	E _r , %	E _r promedio, %	
0,03	1	95,0	101,8	-6,7	-2 ± 2	
	2	94,0	96,5	-2,6		
0,06	1	156,0	159,5	-2,2		
	2	156,5	158,5	-1,3		
0,09	1	197,5	199,5	-1,0		
	2	203,5	206,0	-1,2		
0,12	1	244,5	250,5	-2,4		
	2	267,5	269,5	-0,7		
Ecuación de ajuste						
Automático	$y = (0 \pm 2) + (4,0 \pm 0,1) \times 10^3 x + (-3,2 \pm 0,3) \times 10^4 x^2 + (1,4 \pm 0,2) \times 10^5 x^3$ $(R^2 = 0,9999)$					
Manual	$y = (0,0 \pm 0,3) + (4,29 \pm 0,03) \times 10^3 x + (-3,73 \pm 0,05) \times 10^4 x^2 + (1,63 \pm 0,03) \times 10^5 x^3$ $(R^2 = 0,9999)$					

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 55. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de ácido L-málico en una muestra de vino trabajando con el bioanalizador automático y realizando la medida de las medidas amperométricas de manera manual.

Medida	Automático	Manual	E _r , %
	[ácido L-málico], g L ⁻¹	[ácido L-málico], g L ⁻¹	
1	6,04	5,78	+4,5
2	5,09	4,67	+9,0
3	4,62	4,51	+2,5
4	4,68	4,53	+3,3
5	4,68	4,48	+4,5
6	5,62	5,38	+4,5
7	4,98	4,68	+6,4
8	5,59	5,30	+5,5
9	5,59	5,41	+3,4
10	5,56	5,04	+10,2
Promedio:	5,2 ± 0,4 (RSD _{n=10} = 9,5 %)	5,0 ± 0,3 (RSD _{n=10} = 9,3 %)	+5 ± 2

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Como se puede observar en las Tablas 54 y 55, se obtuvieron por ambos procedimientos resultados que no difieren significativamente entre sí, como se puede deducir de los valores de error relativo " E_r " calculados tomando como referencia el dato medido directamente sobre el registro intensidad-tiempo. Además, el bioanalizador proporcionó una ecuación de ajuste cuyos términos no difieren significativamente de la calculada con los datos medidos manualmente (Tabla 54). En general se ha obtenido un error relativo promedio en torno al 5 %, lo que permite afirmar que la aplicación informática realiza adecuadamente el cálculo de los valores de concentración de ácido L-málico en las muestras.

Por último, se han evaluado los tiempos de respuesta y de análisis proporcionados por el bioanalizador de ácido L-málico. El tiempo de respuesta, entendido como el tiempo empleado por el sistema para el registro de un dato de intensidad de pico, es un parámetro que va a depender de la configuración establecida desde el "software" y, por lo tanto, modificable en función de los requerimientos del análisis. Los parámetros elegidos para llevar a cabo este estudio se recogen en la Figura 109, mostrada anteriormente en el Apartado 3.3.2.2.1.3. En estas condiciones experimentales se promedió un tiempo de respuesta de 3,5 minutos (17 muestras por hora).

Si se considera el tiempo de análisis teniendo en cuenta la construcción del correspondiente calibrado, se obtuvo un valor de 67 ± 2 minutos, cuando se realiza un calibrado con cuatro patrones con dos réplicas cada uno y el posterior análisis de cinco muestras con dos réplicas cada una.

3.3.2.2.3. Estabilidad

En las condiciones experimentales optimizadas se procedió a estudiar el tiempo de vida útil del biosensor de ácido L-málico cuando se emplea como sistema de detección en el bioanalizador. Para ello, se emplearon disoluciones patrón de ácido L-málico de concentración $0,06 \text{ g L}^{-1}$. Durante este estudio el biosensor se almacenó en disolución reguladora fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,0 a 4°C . En la **Figura 115** se muestra el gráfico de control construido para un biosensor TTF-MDH-DP-AuE tomando como valor central la media de 4 medidas sucesivas de

patrón de ácido málico, obtenidas el primer día de trabajo del biosensor, y como valor de los límites superior e inferior de control la media $\pm 3s$ (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

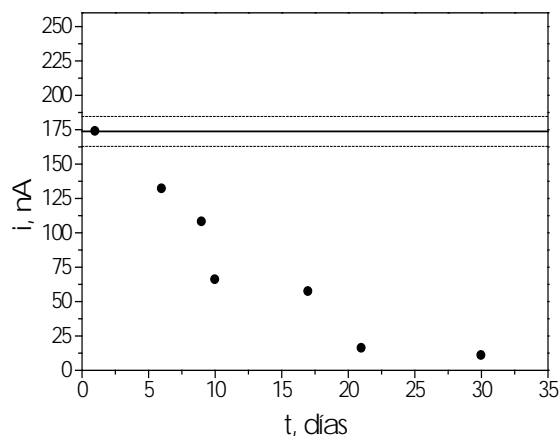


Figura 115. Gráfico de control para evaluar la estabilidad de un biosensor TTF-MDH-DP-AuE trabajando como detector amperométrico del bioanalizador automático durante 30 días. Intensidades de corriente correspondientes a disolución patrón de ácido L-málico $0,06 \text{ g L}^{-1}$. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 8,0 y NAD^+ 1 mmol L^{-1} . Volumen de bucle: $500 \mu\text{L}$. Caudal de trabajo: $4,0 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = +0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Como se puede observar en el gráfico, el biosensor de ácido L-málico pierde señal paulatinamente con el tiempo, de manera que a los pocos días de vida se observó una disminución de la señal del 40 % aproximadamente. El biosensor se pudo considerar operativo durante aproximadamente 17 días, a partir de los cuales los calibrados tenían coeficientes de correlación por debajo de 0,97, además de una disminución de la reproducibilidad de los valores de las señales obtenidas. En ese tiempo se analizaron alrededor de 70 muestras con cada uno de los cinco biosensores empleados para este estudio.

3.3.2.2.3. Validación del prototipo automático: análisis de muestras de vino

Para la validación de los resultados obtenidos de la concentración de ácido L-málico empleando el bioanalizador desarrollado, se emplearon materiales de referencia certificados. Para llevar a cabo la determinación, se realizó un calibrado para el intervalo de concentración comprendido entre $0,03$ y $0,12 \text{ g L}^{-1}$, incluyendo

el 0, para ácido L-málico con disoluciones patrón preparadas en la disolución tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 8,0. Las muestras se prepararon mediante la dilución adecuada del material de referencia certificado en la disolución tampón de trabajo, para que las señales de intensidad de corriente registradas para las muestras estuvieran comprendidas en el intervalo de los tres primeros puntos del calibrado, correspondiente a la región más sensible y de mayor precisión. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 56**.

Tabla 56. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de ácido L-málico en materiales de referencia certificados del Centre Œnologique de Bourgogne (Lote 2009) con el bioanalizador automático desarrollado.

Material de referencia	[ácido L-málico], g L ⁻¹	[ácido L-málico] Promedio, g L ⁻¹	t _{exp}
	1,344		
	1,641		
	1,680		
	1,407		
Vino tinto Referencia 1	1,267	(1,5 ± 0,1) g L ⁻¹	0,704
[ácido L-málico]: (1,5 ± 0,2) g L ⁻¹	1,348	(RSD _{n=10} = 9,2 %)	
	1,555		
	1,531		
	1,486		
	1,417		
	1,170		
	1,010		
	1,065		
	0,995		
Vino blanco Referencia 2	0,980	(1,08 ± 0,07) g L ⁻¹	1,964
[ácido L-málico]: (1,02 ± 0,07) g L ⁻¹	1,030	(RSD _{n=10} = 8,9 %)	
	0,995		
	1,260		
	1,165		
	1,145		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 56. Continuación.

Material de referencia	[ácido L-málico], g L ⁻¹	[ácido L-málico] Promedio, g L ⁻¹	t _{exp}
	0,998		
	0,959		
	0,983		
	0,942		
Vino blanco Referencia 3	0,865	(0,97 ± 0,04) g L ⁻¹	0,573
[ácido L-málico]: (0,96 ± 0,04) g L ⁻¹	0,961	(RSD _{n=10} = 5,7 %)	
	1,050		
	1,060		
	0,956		
	0,972		
	5,864		
	5,556		
	5,496		
	5,685		
Vino rosado Referencia 4	5,528	(5,63 ± 0,08) g L ⁻¹	0,806
[ácido L-málico]: (5,6 ± 0,6) g L ⁻¹	5,717	(RSD _{n=10} = 2,1 %)	
	5,536		
	5,543		
	5,710		
	5,681		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Asimismo, la exactitud del método se ha evaluado comparando las medias experimentales obtenidas para el contenido de ácido L-málico en los materiales de referencia con los valores certificados a través del cálculo del estadístico *t*. Como se puede observar en la Tabla 56, los valores de *t*_{experimental} obtenidos son inferiores al valor tabulado *t*_{tab} (9 grados de libertad, *p* = 0,05) = 2,262. Por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los valores determinados empleando el bioanalizador desarrollado y los certificados. Por ello, se puede decir que el bioanalizador automático de ácido L-málico es adecuado para la determinación de este compuesto en vinos.

3.4. CONCLUSIONES

- **Bioanalizadores semiautomáticos**

En el apartado 3.3.1 se ha descrito el desarrollo de bioanalizadores semiautomáticos para el análisis de diferentes parámetros químicos relacionados con la elaboración de bebidas fermentadas, basados en el empleo de biosensores enzimáticos amperométricos como detectores en sistemas de análisis en flujo, cuyos diseños responden a la aplicación objetivo. Así, de la optimización de las variables experimentales relacionadas con el funcionamiento de los componentes y dispositivos que componen los bioanalizadores, se obtuvieron en todos los casos una selectividad y sensibilidad buenas para los analitos en estudio, siendo necesario una dilución previa de las muestras antes de alcanzar el detector (realizada "in-line" en el propio sistema de flujo o antes de introducir las mismas en el bioanalizador), y un alto rendimiento de muestreo.

Para la monitorización de etanol en cervezas de bajo contenido alcohólico se han diseñado dos sistemas de flujo: uno cuyo esquema responde a un sistema de análisis en flujo continuo, y otro cuyo esquema responde a un sistema FIA. Asimismo, se han desarrollado e implementado con éxito un dispositivo desgasificador, acoplado al sistema de flujo en continuo para la introducción de cerveza sin someterla previamente a una desgasificación, y, como dispositivo de muestreo en ambos sistemas, una unidad de difusión gaseosa que ha posibilitado llevar a cabo el análisis de las cervezas "0,0" y "Sin" sin necesidad de aplicarle a las mismas una dilución previa. Así, los bioanalizadores manuales de etanol desarrollados han sido validados por comparación con otros métodos de referencia para el análisis de etanol en cerveza, proporcionando una sensibilidad y precisión adecuadas para la determinación de este analito en este tipo de cervezas. Se ha demostrado que el bioanalizador de flujo en continuo se trata de un instrumento adecuado para la monitorización "on-line" de etanol en los procesos de elaboración de las cervezas "0,0" y "Sin", posibilitando la obtención de resultados en tiempo real. Asimismo, se ha demostrado que el bioanalizador basado en la metodología FIA es útil para el control de calidad del producto elaborado, siendo adecuado también

para la monitorización de etanol en el proceso de elaboración de este tipo de cervezas.

El biosensor desarrollado para la determinación de ácido L-málico en vinos está basado en el empleo de un sistema bienzimático de MDH/DP (malato deshidrogenasa/diaforasa). Dicho biosensor se ha validado, en las condiciones experimentales de trabajo optimizadas, mediante el análisis de materiales de referencia certificados trabajando en amperometría en disoluciones agitadas. La metodología aplicada para la preparación de los biosensores de ácido D-málico (atrapamiento con membrana sobre electrodos de acero inoxidable con capa delgada de oro depositada por "sputtering") resulta sencilla, proporcionando una reproducibilidad de fabricación y una estabilidad de los biosensores buenas. Además, comparando el biosensor desarrollado con otros reportados en la bibliografía, se han obtenido una alta sensibilidad y un bajo límite de detección. Posteriormente se ha implementado el biosensor de ácido L-málico como detector en un sistema FIA, en el que ha mostrado un comportamiento de la señal proporcionada con la concentración que se ajusta a un polinomio de tercer grado. La validación del bioanalizador manual también se ha llevado a cabo empleando materiales de referencia certificados.

La validación del biosensor desarrollado para la determinación de ácido D-láctico, basado en el empleo de un sistema bienzimático de D-LDH/DP (D-lactato deshidrogenasa/diaforasa), se ha realizado, en las condiciones experimentales de trabajo optimizadas, trabajando en amperometría en disoluciones agitadas y empleando un ensayo enzimático espectrofotométrico como método de referencia. El biosensor de ácido D-láctico, fabricado con el mismo sustrato electródico que el de L-málico, presenta una reproducibilidad de fabricación y una estabilidad buenas. Además, se han obtenido una alta sensibilidad y un bajo límite de detección, comparando con otros biosensores reportados en la bibliografía. Posteriormente se ha implementado, junto a un biosensor de ácido L-láctico comercial, como detector en un sistema FIA para llevar a cabo el análisis simultáneo, y en un solo experimento, de los dos isómeros del ácido láctico. Finalmente, el bioanalizador multiparamétrico semiautomático ha sido validado por comparación con un ensayo

enzimático espectrofotométrico, demostrando su utilidad para la monitorización de la relación de concentración entre los dos isómeros del ácido láctico en cervezas.

- **Bioanalizadores automatizados**

El prototipo de bioanalizador automatizado (“hardware”) desarrollado para la monitorización de etanol en cervezas de baja graduación alcohólica presenta la versatilidad de poder ser empleado tanto para aplicaciones “on-line” como “off-line”, variando simplemente el “software” de control. Este prototipo, junto al prototipo automático para el análisis “off-line” de ácido L-málico en vinos, proporcionan una sensibilidad, precisión y rendimiento de muestreo adecuados para las aplicaciones objetivo.

Asimismo, el trabajo experimental se ha llevado a cabo orientado a la evaluación de las características de funcionamiento que ofrecen los bioanalizadores, gobernados por los “softwares” de control, demostrando su utilidad para las aplicaciones para las que han sido desarrollados, además de facilitar la identificación de posibles mejoras para futuros desarrollos.

Por último, los bioanalizadores desarrollados han demostrado ser herramientas útiles para la monitorización y control de procesos industriales para la elaboración de bebidas fermentadas. Gracias a los “softwares” de control desarrollados se ha demostrado que dichos bioanalizadores pueden funcionar de una manera autónoma, ejecutando determinadas acciones, en función de los cambios reales registrados, requeridas en los procedimientos analíticos que operan independientemente del analista, o sencillamente posibilitando la monitorización de un proceso analítico en curso en función del método de análisis establecido previamente por el operador. La posibilidad de poder aplicar diferentes metodologías de análisis proporciona a los bioanalizadores una alta flexibilidad. Asimismo, los instrumentos desarrollados abren una vía muy interesante para aplicaciones en muy diversos campos, no sólo el agroalimentario, ya que, modificando únicamente el elemento sensor, se podrían obtener diferentes bioanalizadores.

4. Capítulo 2

ANÁLISIS DE GLUCOSA EN FRUTAS EN
ESTADO NATURAL MEDIANTE EXTRACCIÓN
CON MICRODIÁLISIS

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Aplicaciones de la microdiálisis

La preparación de la muestra es una etapa analítica que consume tiempo, de modo que un método de análisis puede verse en gran medida ralentizado y, en ocasiones, obstaculizado debido a que puede tener lugar la degradación de algún componente. Con el objetivo de superar este tipo de inconvenientes, surgieron las aplicaciones basadas en el tándem sistema analítico-microdiálisis. En éstas, se posibilita llevar a cabo la introducción del dializado, que contiene al analito extraído de la muestra, en un equipo analítico que está constituido por un detector y, dependiendo de la aplicación, de un dispositivo de separación [Jin, 2008].

Tradicionalmente, se ha trabajado con la microdiálisis en estudios de ámbito clínico. Sin embargo, como resultado de las características atractivas que aporta el muestreo en continuo, el empleo de la microdiálisis se ha extendido progresivamente a otras áreas de investigación, como es la biotecnología, para el seguimiento en línea de procesos de fermentación o el control de calidad de productos alimentarios [Miró, 2005]. Una de las ventajas que ofrece el muestreo con microdiálisis es que el dispositivo puede actuar como un sistema genérico de muestreo, de manera que puede ser acoplado con un amplio rango de técnicas analíticas [Davies, 2000]. La capacidad inherente de la microdiálisis para proporcionar una muestra más limpia hace viable la inyección directa del dializado en sistemas de tipo electroforéticos o cromatográficos, o que utilizan un sensor óptico en flujo, sin llevar a cabo un tratamiento previo de la muestra [Miró, 2005]. Así, esta estrategia de muestreo ha permitido desarrollar métodos analíticos para un amplio abanico de aplicaciones, habiendo posibilitado la extracción de muchos tipos de analitos en diferentes tipos de muestras. En la **Tabla 57** se muestran algunos ejemplos de métodos analíticos basados en el empleo de microdiálisis en diferentes campos o áreas de aplicación.

Tabla 57. Ejemplos de aplicaciones de la microdiálisis.

Área	Analito	Muestra	Método	Referencia
	Melamina y ácido cianúrico	Crema no láctea	HPLC-Detección UV	[Chao, 2011]
	Polifenoles	Vino	Amperometría (sensor electroquímico)	[Jakubec, 2011]
Análisis alimentario	Ésteres de ftalato	Agua derivada de plásticos en contacto con comida	HPLC-Detección UV	[Jen, 2006]
	Sinigrina	Semillas de verduras crucíferas	RP-IP-HPLC-Detección UV	[Lin, 2010]
	Ácido L-láctico	Yogur probiótico	Amperometría (biosensor enzimático de LLDH)	[Radoj, 2010]
	Cloruro	Disolución salina de KCl	Potenciometría (sensor de cloruro)	[Böhm, 2000]
Análisis clínico	Dopamina	Sangre de conejo	Quimioluminiscencia (biosensor óptico)	[Li, 2002]
	Aminoácidos	Cerebro de rata	Electroforesis-Detector de fluorescencia	[Sandlin, 2005]
	Aspirina y ácido salicílico	Sangre y cerebro de rata	HPLC-Detección UV	[Shaw, 2012]
	Cloruro, nitrito, nitrato, fosfato y sulfato	Aguas residuales de almazara	IC-detector de conductividad	[Buldini, 2000]
Análisis medioambiental	Ginkgólidos y bilobálico	Extracto de una planta	HPLC-Detector multi-longitud de onda	[Chiu, 2004]
	Oxalato y citrato	Muestras de suelo	IC-detector de conductividad	[Sulyok, 2005]
	Metales pesados	Aguas estancadas y residuales	Espectrometría de absorción atómica	[Torto, 2002]

Abreviaturas: HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia. IC: cromatografía de intercambio iónico. IP: par iónico. LLDH: L-Lactato deshidrogenasa. RP: fase inversa. UV: ultravioleta.

4.1.1.1. Microdiálisis como herramienta para el análisis de glucosa en flujo

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Este compuesto posee dos enantiómeros, siendo la D(+)-glucosa la especie predominante en la naturaleza (**Figura 116**). Este azúcar, ya sea en su forma libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza y, junto a la fructosa y a la galactosa, es uno de los monosacáridos que puede ser adsorbido al torrente sanguíneo durante la digestión.

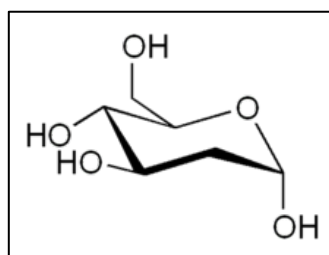


Figura 116. Estructura cíclica de la D-glucosa.

La glucosa está presente de manera natural en alimentos tales como granos, frutas y verduras, aunque también es uno de los principales ingredientes en muchos edulcorantes y alimentos procesados o fermentados. Su presencia en muchos tipos de muestras (biológicas, alimentarias o industriales) hace necesaria su monitorización en muchos tipos de muestras, ya sean materias primas o elaboradas, así como en procesos de fabricación. Cada vez más se están desarrollando nuevos métodos analíticos para la determinación de glucosa mediante el empleo de sistemas en flujo, ya que permiten, entre otras ventajas, realizar un mayor número de análisis, así como su fácil automatización. En este contexto, se incluye la investigación descrita en este capítulo, en la que se ha desarrollado un sistema en continuo que emplea un biosensor de glucosa oxidasa como detector amperométrico, en el que la extracción de la glucosa de la muestra se realiza mediante microdiálisis.

La microdiálisis puede ser fácilmente implementada en sistemas de flujo, proporcionando una dilución de la muestra "in-line" y una mayor versatilidad al método de análisis. Una de las características que ofrecen en sí las técnicas de análisis en flujo, como es el caso de la técnica FIA, es la de posibilitar una dilución

de la muestra en continuo. Por lo tanto, el acoplamiento de una sonda de microdiálisis a este tipo de sistemas permite conseguir sinérgicamente altos factores de dilución y, de este modo, analizar muestras con una alta concentración de analito [Davies, 2000].

En la **Tabla 58** se muestran ejemplos recogidos de la bibliografía en los que se ha empleado el tándem "sistema de análisis en flujo-microdiálisis" para el análisis de glucosa en diversos tipos de muestras, ya sea para una monitorización *in vitro* ([Boubriak, 2006], [Yao, 2004]), *in vivo* ([Gramsbergen, 2004], [Rhemrev-Boom, 2002], [Ricci, 2008], [Yao, 2004]), "on-line" ([Kumar, 2001], [Torto, 2000]), "off-line" ([Mannino, 1996], [Mannino, 1997], [Mentana, 2013], [Rajendran, 2002]) o "at-line" [Peuker, 2004]. Como se puede observar en dicha tabla, se ha llevado a cabo con éxito el acoplamiento de la microdiálisis en numerosos sistemas FIA ([Gramsbergen, 2004], [Kumar, 2001], [Mannino, 1996], [Mannino, 1997], [Mentana, 2013], [Rajendran, 2002], [Torto, 2000], [Yao, 2004]) y de análisis en flujo continuo ([Peuker, 2004], [Rhemrev-Boom, 2002], [Ricci, 2008]). Estos sistemas presentan una potencial capacidad para el muestreo automático y aplicabilidad para la monitorización del analito en todo tipo de matrices y en tiempo real [Miró, 2005]. Asimismo, cabe destacar el hecho de que en la mayor parte de los trabajos encontrados emplean detección amperométrica, sirviéndose de la especificidad proporcionada por el biorreconocimiento enzimático ([Gramsbergen, 2004], [Kumar, 2001], [Mannino, 1997], [Mentana, 2013], [Peuker, 2004], [Rajendran, 2002], [Torto, 2000], [Yao, 2004]). El acoplamiento de la microdiálisis a la detección amperométrica basada en el empleo de biosensores enzimáticos proporciona una mejora interesante de las capacidades de estos dispositivos para su uso en el muestreo y análisis *in situ* [Serra, 2007]. El diseño experimental de este tipo de sistemas se basa en una sonda de microdiálisis y un biosensor integrados en un sistema de flujo, dando lugar a una detección en continuo [Castillo, 2004]. La etapa de muestreo y dilución llevada a cabo mediante microdiálisis favorece una eliminación muy eficiente de los problemas de ensuciamiento del biosensor por parte de otros compuestos de la matriz de la muestra, gracias al proceso de exclusión por tamaño molecular a través de la membrana. Así, el uso de biosensores junto con la microdiálisis como dispositivo de muestreo en sistemas FIA puede ser un enfoque muy útil para la determinación de analitos en matrices reales [Mentana, 2013].

Tabla 58. Métodos de análisis de glucosa en diferentes tipos de muestras basados en el empleo de microdiálisis.

Muestra	Técnica de flujo	Automático	Detección	Tipo de análisis	Operación en línea	Pretratamiento de muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	RR, %	RSD, %	Referencia
Cultivo de células del cartílago articular bovino (condrocitos)	-	No	Espectrofotometría (absorbancia)	In vitro	Ninguna	Ninguno	-	-	28	-	[Boubriak, 2006]
Cerebro de rata	FIA	Sí	Amperometría (biosensor enzimático de glucosa)	In vivo	Ninguna	Ninguno	Hasta 1,13	9,0x10 ⁻³	-	-	[Gramsbergen, 2004]
Caldo de fermentación	FIA	Sí	Amperometría (biosensor enzimático de GOD)	On-line	Diálisis	Ninguno	2 - 100	-	-	-	[Kumar, 2001]
Productos lácteos	FIA	No	Amperometría (sensor electroquímico)	Off-line	Separación (HPLC)	Disolución en caso de muestras sólidas	(5 - 400)x10 ⁻²	1,4x10 ⁻³	98	1,7	[Mannino, 1996]
Leche, zumo	FIA	No	Amperometría (enzima GOD inmovilizada)	Off-line	Ninguna	Dilución	0,1 - 10	5,0x10 ⁻²	1,3	2,6	[Mannino, 1997]
Licor, mosto, biomasa leñosa	FIA	No	Amperometría (biosensor (dual) enzimático de GOD/AOD)	Off-line	-	Disolución y filtración de muestra sólida	1,80 - 180	0,9	-	-	[Mentana, 2013]

Tabla 58. Continuación.

Muestra	Técnica de flujo	Automático	Detección	Tipo de análisis	Operación en línea	Pretratamiento de muestra	IL, g L ⁻¹	LD, g L ⁻¹	RR, %	RSD, %	Referencia
Cultivos de <i>Escherichia coli</i>	CFA	Sí	Amperometría (ensayo enzimático)	At-line	Diálisis	Ninguno	0,5 - 40	0,2	-	-	[Peuker, 2004]
Leche	FIA	No	Amperometría (ensayo enzimático con GOD)	Off-line	Ninguna	Ninguno	(9,008 – 1802)x10 ⁻³	-	-	4	[Rajendran, 2002]
Sangre (de tejido subcutáneo)	CFA	No	Amperometría (biosensor enzimático de GOD)	In vivo	Ninguna	Ninguno	Hasta 5,4	9,0x10 ⁻³	-	2 -4	[Rhemrev-Boom, 2002]
Sangre (de tejido subcutáneo)	CFA	Sí	Amperometría (biosensor enzimático de GOD)	In vivo	Ninguna	Ninguno	Hasta 4,9	-	10	-	[Ricci, 2008]
Aguas residuales industriales	FIA	No	IPED	On-line	Separación (HPAEC)	Ninguno	-	-	Máx. 72	-	[Torto, 2000]
Cerebro de rata	FIA	Sí	Amperometría (biosensor enzimático de GOD/LOD/PyOx)	In vivo, in vitro	Ninguna	Ninguno	(1,80 – 180)x10 ⁻²	-	13,3	2,9	[Yao, 2004]

Abreviaturas: AOD: alcohol oxidasa. CFA: análisis en flujo continuo. FIA: análisis por inyección en flujo. GOD: glucosa oxidasa. HPAEC: cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia. HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia. IL: intervalo lineal. IPED: detección electroquímica pulsada integrada. LD: límite de detección. LOD: lactato oxidasa. PyOx: piruvato oxidasa. RSD: desviación estándar relativa. RR: recuperación relativa de analito.

4.1.2. Análisis de glucosa en frutas

A lo largo de los últimos años se ha observado una mayor concienciación sobre la necesidad de que el consumidor tenga a su disposición frutos comestibles que hayan alcanzado un nivel de madurez satisfactorio y que muestren unas características organolépticas óptimas. El concepto de calidad ha ido evolucionando a lo largo del tiempo. Al principio, la percepción de la calidad era diferente según el interés particular de cada uno de los interventores en el proceso de producción (productor, consumidor, comerciante). Sin embargo, cada vez hay una mayor tendencia a la unificación de criterios entre los sectores implicados con el objetivo de coincidir con los impuestos por el consumidor, para lo cual el estado de madurez de la fruta juega un papel muy importante [Angón-Galván, 2006]. El hecho de proporcionar las frutas con un buen sabor y a precios asequibles hace que de manera muy probable aumente su consumo, siendo muy positivo económicamente para productores y comerciantes. Asimismo el beneficio también es para los consumidores, por el mayor valor nutricional que aporta este tipo de alimento [Kader, 2008].

El fruto pasa a lo largo de su vida por una serie de etapas, caracterizadas por una secuencia de continuos cambios en su composición. Así, la vida de las frutas puede dividirse en tres etapas fisiológicas fundamentales: crecimiento, maduración y senescencia, sin poder definir exactamente cuándo se da el cambio de etapa. Además, desde que se da el aumento del dulzor de las frutas con la maduración, éstas se deterioran más rápidamente, por lo que la cosecha se realiza antes de que hayan alcanzado la dulzura plena [Barret, 2010]. Por ello, es necesaria la existencia de algunos índices y parámetros que sirvan para monitorizar tanto la maduración del fruto como la evolución de su calidad organoléptica durante la conservación en frío y posterior maduración a temperatura ambiente [Angón-Galván, 2006]. La etapa más importante y compleja en el desarrollo de la fruta, el proceso de maduración, puede dividirse, a su vez, en dos fases: la fase de maduración fisiológica y la de maduración organoléptica. La primera suele iniciarse antes de que termine el crecimiento celular y finaliza, más o menos, cuando el fruto tiene las semillas en disposición de producir nuevas plantas. El crecimiento y maduración fisiológica sólo se completan adecuadamente en el árbol. La maduración organoléptica hace

referencia al proceso por el cual las frutas adquieren las características sensoriales que las definen como comestibles. Por lo tanto, se trata de un proceso que transforma un tejido fisiológicamente maduro pero no comestible en otro visual, olfatoria y gustativamente atractivo [Brezmes, 2001].

Las características que ofrecen distintivo de calidad en una fruta y sirven de baremo para determinar el momento óptimo de recolección son atribuidas a cuatro tipos de propiedades: color y apariencia; sabor y aroma; textura; y valor nutricional [Barret, 2010]. Dichas propiedades son las que sufren los cambios más significativos durante el proceso de maduración. Con respecto al sabor, uno de los principales componentes de la fruta que lo condicionan son los azúcares. Éstos, junto con los ácidos orgánicos de la fruta, se emplean como índice de aceptabilidad del sabor de la misma para el consumo [Terry, 2005]. Los cambios producidos en las características de una fruta son el resultado de la profunda reestructuración metabólica y química que se desencadena dentro de la misma. Es decir, a medida que el fruto se desarrolla en el árbol sufre una serie de cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos que son perfectamente evaluables. Los indicadores físico-químicos tradicionalmente más utilizados para medir la madurez de un fruto son el color de fondo, la firmeza, el contenido de sólidos solubles (azúcares), la prueba de almidón y la acidez, siendo todos ellos de empleo muy extendido [Brezmes, 2001].

En la "Guía de pruebas objetivas para determinar la madurez de la fruta" de la OCDE [p. web 18] se describen los métodos oficiales de realización de pruebas objetivas para la determinación del nivel de madurez de la fruta, empleados tradicionalmente tanto por la industria frutícola en general, como por los servicios de inspección. Así, en esta guía se exponen estas metodologías:

- Determinación de la firmeza de la fruta mediante un penetrómetro.
- Determinación del contenido de almidón mediante un ensayo con solución de yodo.
- Determinación de los sólidos solubles totales (azúcares) mediante un refractómetro.

- Determinación de los ácidos mediante titulación y cálculo de la proporción entre los azúcares y los ácidos.

La medida del nivel de sólidos solubles se emplea como un estimador del contenido de azúcares en la fruta, ya que éstos son los componentes mayoritarios en el zumo de fruta. La refractometría se basa en la capacidad de los azúcares de un jugo para desviar la luz, determinando la cantidad presente de éstos como porcentaje de grados Brix. Es decir, la refractometría se trata de una metodología destructiva para la muestra [Brezmes, 2001].

El incremento del interés público en el consumo de productos de alta calidad, junto con la demanda de prácticas de producción medioambientalmente responsables, ha hecho surgir la necesidad de llevar a cabo una mejora continua de los métodos de detección para calidad pre y post cosecha [Melo Ferreira, 2010]. Las frutas son alimentos muy variables, y la calidad de las piezas individuales puede diferir en gran medida de la media. El tratamiento y clasificación adecuados de la producción requieren metodologías de análisis que aceleren tal proceso, sean sencillas de usar e implementar, y necesiten mínima o ninguna preparación de la muestra [Karoui, 2010]. Así, los métodos basados en instrumentación no destructiva de la muestra se prefieren a los métodos destructivos, ya que permiten el estudio y análisis de la fruta individual (pudiendo realizar la medida de varias propiedades en una misma pieza de fruta, o incluso realizar varias determinaciones de un mismo parámetro en dicha pieza), e incluso reducir los residuos [Magwaza, 2012]. Por lo tanto, es deseable el desarrollo de una metodología no destructiva que correlacione la información extraída fuera del producto con su etapa de frescura [Mello, 2002]. Debido a la necesidad de poder seleccionar las frutas con una calidad de sabor aceptable, existe el continuo desarrollo de métodos de detección no destructivos que permitan evaluar esa cualidad de la fruta. La técnica más ampliamente estudiada para esta aplicación es la espectroscopía infrarroja, permitiendo la caracterización química de las frutas con respecto a los constituyentes relacionados con el sabor [Butz, 2005] [Nicolai, 2007]. En la **Tabla 59** se recogen diferentes métodos de análisis de glucosa en frutas encontrados en la bibliografía, basados en técnicas de infrarrojo ([Bureau, 2009], [Cho, 1998], [Liu, 2006], [Tewan, 2008]), amperométricas ([Ang, 2010], [Bordonaba, 2009], [Jawaheer, 2003]) y

cromatográficas ([Ma, 2014], [Sturm, 2003], [Usenik, 2008]), de los que sólo los primeros ofrecen metodologías no destructivas para las muestras. Estos métodos proporcionan análisis más detallados y con mayor precisión de la composición de las frutas con respecto a los azúcares individuales, en este caso glucosa, que la medida de los sólidos solubles totales que determina el refractómetro [Barret, 2010]. Los métodos basados en la detección con biosensores enzimáticos están cercanamente relacionados con la química y procesamiento de la fruta y la verdura, por tratarse de una tecnología ampliamente probada y no costosa [Melo Ferreira, 2010].

Tabla 59. Métodos de análisis de glucosa en frutas.

Técnica	Clasificación	Muestra	Pretratamiento de muestra	Rango de concentración	LD	RSD, %	Referencia
Amperometría en discontinuo (biosensor electroquímico enzimático de glucosa)	Destructivo	Plátano, sandía, naranja, mango, manzana y pera	Disolución, homogeneización, centrifugación y filtración	$(1,802 - 2702) \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$	$9,0 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$	2,3	[Ang, 2010]
Amperometría en discontinuo (biosensor electroquímico enzimático de glucosa)	Destructivo	Fresa	Disolución 1:20 (m/v)	Hasta $1,8 \text{ g L}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-5} \text{ g g}^{-1}$ muestra	-	[Bordonaba, 2009]
ATR-FTIR	No destructivo/No invasivo	Albaricoque	Ninguno	0,6 – 5,1 % (m/m)	-	-	[Bureau, 2009]
Espectroscopía NIR (modo reflectancia)	No destructivo/No invasivo	Manzana	Ninguno	2,08 – 3,60 % (m/m)	-	-	[Cho, 1998]
FT-NIR (modo reflectancia difusa)	No destructivo/No invasivo	Manzana	Ninguno	1,92 – 4,50 % (m/m)	-	-	[Liu, 2006]

Tabla 59. Continuación.

Técnica	Clasificación	Muestra	Pretratamiento de muestra	Rango de concentración	LD	RSD, %	Referencia
Amperometría en discontinuo (array multi(bio)sensor electroquímico enzimático de glucosa y sacarosa)	Destructivo	Piña	Extracción del jugo, dilución 1:50 y tratamiento con AsOx	Hasta 1,26 g L ⁻¹	-	-	[Jawaheer, 2003]
HPLC-ELSD	Destructivo	Melocotón, manzana, sandía, cereza	Trituración en nitrógeno líquido, disolución, centrifugación y filtración	(2,00 – 200)x10 ⁻² g L ⁻¹	7,0x10 ⁻⁵ g L ⁻¹	0,3	[Ma, 2014]
HPLC-Detector UV	Destructivo	Fresa	Trituración, homogeneización, disolución, centrifugación y filtración	1,42 – 2,55 % (m/m)	-	0,2	[Sturm, 2003]
FT-NIR (modo transmitancia)	Destructivo	Naranja	Exprimido y filtración	1,21 – 3,52 % (m/m)	-	-	[Tewari, 2008]
HPLC-Detector RI	Destructivo	Cereza	Batido, dilución, centrifugación y filtración	6,18 – 10,7 % (m/m)	-	-	[Usenik, 2008]

Abreviaturas: AsOx: ascorbato oxidasa. ATR: espectroscopía de reflectancia total atenuada. ELSD: detección de dispersión de luz evaporativa. FIA: análisis por inyección en flujo. FTIR: espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier. FT-NIR: espectroscopía de infrarrojo cercano con transformada de Fourier.

HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia. LD: límite de detección. RI: índice de refracción. RSD: desviación estándar relativa. UV: ultravioleta.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. Instrumentación

4.2.1.1. Aparatos

Para llevar a cabo los diferentes experimentos se han empleado:

- Detector amperométrico monocanal InBea Biosensores S.L.
- Bomba peristáltica Spetec Perimax.
- Bomba peristáltica Gilson Minipuls-2.
- Sondas de microdiálisis EICOM modelos TP-100-10, DZ-6-02 y AZ-6-02.
- Batidora Philips.
- Agitador magnético Velp Scientifica Microstirrer.
- Baño de ultrasonidos Branson 1510.
- pH-metro de precisión Crison Basic 20+ calibrado de la forma habitual con disoluciones reguladoras de pH 7,00, 4,00 y 9,21 a $(25 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.
- Equipo Sputtering Emitech K550X.

4.2.1.2. Electrodo, células de trabajo y dispositivos

Electrodos:

Las medidas electroquímicas se han llevado a cabo utilizando los siguientes electrodos:

- Electrodo de trabajo: biosensor de glucosa fabricado por InBea Biosensores S.L.
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl/KCl (3 mol L^{-1}) BAS MF-2052.
- Electrodo auxiliar o contraelectrodo: electrodo de punta de Pt.

Células de trabajo:

- Las medidas electroquímicas en discontinuo se han llevado a cabo en células de plástico de 20 mL.
- Para las medidas en flujo se ha utilizado una célula de metacrilato "wall-jet", de gran volumen diseñada por el Grupo de Investigación.

4.2.2. Reactivos y muestras

El sustrato utilizado ha sido D(+)glucosa anhidra (Panreac).

Otros reactivos empleados: fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4 , Panreac), fosfato monosódico anhidro (NaH_2PO_4 , Panreac).

Todos los reactivos empleados utilizados han sido de calidad para el análisis.

Muestras analizadas: se ha llevado a cabo la determinación de glucosa en peras conferencia, kiwis verdes, ciruelas rojas y uvas blancas, cuyas piezas de fruta fueron adquiridas en un comercio convencional.

4.2.3. Procedimiento experimental

4.2.3.1. Preparación de disoluciones

Para preparar las disoluciones que se describen a continuación, se ha utilizado agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q:

Disoluciones del sustrato:

- *Medidas en amperometría en disoluciones agitadas:*

- **Disolución patrón de glucosa 18 g L^{-1} :** se disuelven 0,09 g, pesados exactamente, del compuesto en 5 mL de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Las disoluciones de menor concentración se preparan

por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.

- *Medidas con el sistema de flujo con detección amperométrica:*

- **Disolución patrón de glucosa 100 g L^{-1} :** se disuelven 2,5 g, pesados exactamente, del compuesto en 25 mL de la disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución patrón con tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4.

Otras disoluciones utilizadas:

- **Disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4:** se disuelven las cantidades adecuadas de ambas sales (2,38 y 4,29 g, respectivamente) en 1 L de agua ultrapura obteniéndose el pH indicado. Cuando se requiere otro pH próximo al de esta disolución reguladora se ajusta con HCl o con NaOH 2 mol L^{-1} .

4.2.3.2. Obtención de los amperogramas en disoluciones agitadas

Para obtener los amperogramas, se introducen los electrodos de trabajo, de referencia y auxiliar en la célula de medida que contiene la disolución reguladora de trabajo correspondiente, y se agita mecánicamente a velocidad constante durante todo el tiempo que dure el experimento. Se aplica el potencial de medida deseado mientras se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se añade la cantidad adecuada de sustrato con una micropipeta, y se espera hasta que la corriente alcance el estado estacionario; de esta manera se realizan tantas adiciones, de pequeños volúmenes, como sea necesario. Posteriormente, se mide la variación en intensidad de corriente que produce cada adición y se relaciona con la magnitud estudiada.

4.2.3.3. Medidas en flujo con detección amperométrica

Para obtener los amperogramas en continuo, se introducen en la célula de flujo el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar y se pasa la disolución portadora, en las condiciones de trabajo seleccionadas, por todo el sistema durante unos minutos hasta llenar dicha célula. El electrodo de trabajo se introduce en la célula de flujo evitando que queden burbujas de aire en el sistema, se conectan los electrodos al potenciostato, se aplica el potencial de medida y se monitoriza la variación de la intensidad de corriente con el tiempo. Cuando la corriente de fondo se ha estabilizado, se procede a la introducción de patrón o muestra en el sistema de flujo de modo que el portador lo arrastra hasta la célula de medida y se registra la señal amperométrica. Cuando se alcanza de nuevo la línea base se puede llevar a cabo la siguiente medida. Posteriormente, se toma la intensidad de cada medida y se relaciona con la magnitud estudiada.

4.2.3.4. Determinación de glucosa en frutas

El biosensor de glucosa se ha empleado como detector amperométrico para la determinación de este compuesto en frutas trabajando en discontinuo, siguiendo la metodología incluida en el manual "Bioanalizador de glucosa en mostos y zumos" validada por InBea, y en un sistema de flujo en el que se implementó una sonda de microdiálisis para la extracción de la glucosa de las muestras.

4.2.3.4.1. Determinación de glucosa en fruta batida

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon batiendo las piezas de las frutas a analizar (kiwi verde, pera conferencia, ciruela roja y uva blanca) con una batidora doméstica.

En el análisis de glucosa mediante amperometría en disoluciones agitadas se requirió el tratamiento de las frutas batidas. En la determinación de este analito en g L^{-1} en una muestra batida de kiwi verde, se llevó a cabo una dilución 1:20 de la misma en la disolución reguladora fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Para ello, se

empleó una micropipeta equipada con una punta de semisólidos. En los ensayos para la determinación de glucosa expresada en % (m/m), se prepararon suspensiones de las frutas batidas en la disolución reguladora de trabajo. Así, para las determinaciones en pera conferencia, ciruela roja y kiwi verde se suspendieron 0,7 g, y en el caso de la uva blanca 0,2 g (todas las masas fueron pesadas exactamente), hasta 10 mL con el tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4.

En la determinación de glucosa trabajando con el sistema de flujo no se requirió el tratamiento de las muestras y, por lo tanto, se procedió sumergiendo la sonda de microdiálisis directamente sobre la fruta batida para el registro de las intensidades de corriente en función del tiempo.

Obtención de las señales amperométricas

- *Amperogramas en discontinuo:*

La determinación se llevó a cabo realizando un calibrado en el intervalo de concentración comprendido entre $4,5 \times 10^{-3}$ y $9,0 \times 10^{-3}$ g L⁻¹ por adición de alícuotas de 50 µL de una disolución patrón de glucosa 1,8 g L⁻¹ a la célula de medida que contenía 20 mL de disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Sobre una nueva disolución de trabajo se realizó la adición de la muestra, previamente tratada como se ha indicado en el anterior apartado, transfiriendo a la célula de medida una alícuota de 50 µL. Las medidas amperométricas se realizaron con agitación mecánica constante, aplicando un potencial de 0,0 V, y registrando la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. La medida de la intensidad de la señal amperométrica obtenida se interpoló en la recta de calibrado y, tras corregir por el factor de dilución correspondiente, se obtuvo la concentración de glucosa en la muestra.

- *Sistema de flujo con detección amperométrica:*

Se prepararon disoluciones de glucosa de concentraciones adecuadas a partir de la disolución patrón de glucosa. En las determinaciones en las muestras de pera conferencia se cubrió el intervalo de concentración comprendido entre 10 y 20 g L⁻¹, para las de ciruela roja y kiwi verde se trabajó con el intervalo de concentración comprendido entre 20 y 40 g L⁻¹, y en el caso de la uva blanca el intervalo de concentración comprendido fue de 40 a 80 g L⁻¹. La obtención de las señales analíticas se realizó dejando alcanzar la línea base de los registros i-t, para lo cual la sonda estaba fuera de las disoluciones a dializar. Una vez estabilizada la corriente de fondo, se introdujo la sonda en las disoluciones patrón hasta que la señal llegó hasta el estado estacionario. Por último, se sacó la sonda de la disolución hasta la recuperación de nuevo de la línea base. Este proceso se repitió hasta obtener las señales analíticas requeridas. La representación de la intensidad de corriente en función de la concentración permitió construir el calibrado correspondiente. A continuación, se procedió sumergiendo la sonda de microdiálisis en la muestra de fruta, preparada según se ha indicado en el apartado de preparación de muestras, llevando a cabo el mismo procedimiento que se ha explicado para la medida de las disoluciones patrón. Para obtener la concentración de glucosa en la muestra se interpoló la medida de la intensidad de corriente registrada en el calibrado.

4.2.3.4.2. Determinación de glucosa en piezas de fruta

Preparación de las muestras

Las piezas de las frutas se batieron con una batidora, conservando una fracción en estado sólido para la determinación de glucosa en la fruta con el sistema de flujo. La fracción batida se empleó para el análisis de este compuesto mediante amperometría en disoluciones agitadas, para lo cual la muestra requirió el tratamiento descrito anteriormente en el Apartado 4.2.3.4.1.

Obtención de las señales amperométricas

- *Amperogramas en discontinuo:*

Para llevar a cabo la determinación de glucosa sobre las fracciones batidas de las frutas, se aplicó el procedimiento expuesto anteriormente en el Apartado 4.2.3.4.1.

- *Sistema de flujo con detección amperométrica:*

La metodología de calibración que se empleó es el calibrado unipuntual, que consiste en la obtención de la recta de calibrado a partir de un punto experimental y el punto (0,0). Para la determinación de glucosa en las frutas sólidas los patrones empleados fueron de 7 g L⁻¹ en el análisis de pera conferencia; 16 g L⁻¹ en el análisis de ciruela roja; 25 g L⁻¹ en el análisis de kiwi verde; y 59 g L⁻¹ en el análisis de uva blanca, preparados a partir de la disolución patrón de glucosa.

La obtención de las señales analíticas se realizó dejando alcanzar la línea base de los registros i-t, para lo cual la sonda estaba fuera de las disoluciones a dializar. Una vez estabilizada la corriente de fondo, se sumergió la sonda en la disolución patrón de concentración adecuada y se registró la intensidad de corriente, hasta alcanzar el estado estacionario, al aplicar un potencial constante de 0,0 V. Antes de la medida de la muestra, se sacó la sonda de la disolución patrón para la recuperación de la línea base y separación de las señales analíticas. La representación de la intensidad de corriente en función de la concentración permitió construir el calibrado correspondiente. Para la medida en la pieza de fruta se procedió insertando la sonda de microdialisis mediante una cánula en la fracción sólida de la misma, y registrando la intensidad de corriente hasta alcanzar el estado estacionario. Posteriormente, se retira la sonda de la fruta para que el sistema recupere de nuevo la línea base. Este proceso se repitió hasta obtener las señales analíticas requeridas, realizando las distintas medidas de una misma pieza de fruta en diferentes puntos. La concentración de glucosa en la fruta se obtuvo tras aplicar el tratamiento matemático explicado en el Apartado 4.3.5.2 de resultados y discusión.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se va a describir el diseño, desarrollo y optimización de un sistema de flujo continuo, denominado a partir de ahora como bioanalizador, para la monitorización del contenido de glucosa en diferentes frutas de forma directa sin llevar a cabo ningún tipo de pretratamiento de las muestras. Con el objetivo de obtener un sistema capaz de analizar glucosa en un amplio rango de concentraciones, con una exactitud y precisión adecuadas, se diseñaron diferentes modelos de bioanalizadores que implicaban la integración de una sonda de microdiálisis para la extracción del analito de las muestras.

4.3.1. Diseño de un sistema de flujo en continuo para el análisis de glucosa en fruta

En principio, se diseñó un sistema de flujo continuo sencillo formado por una bomba peristáltica, un reactor, un biosensor enzimático de glucosa como detector y una sonda de microdiálisis para realizar la extracción y dilución de la glucosa en el propio sistema de flujo continuo.

Como detector amperométrico para el análisis en flujo de glucosa en frutas se eligió un biosensor bienzimático desarrollado por InBea (**patente WO 2002012550 A1**) que, en principio, y de acuerdo con sus características (**Tabla 60**), permitirá una adecuada monitorización de glucosa en frutas en las condiciones de medida. Este biosensor emplea el sistema glucosa oxidasa (GOD)/peroxidasa (HRP)/ferroceno (Fc) para determinar la concentración de glucosa a través de una secuencia de reacciones en la que la glucosa es oxidada a ácido glucónico en una reacción catalizada por la GOD, y el peróxido generado es reducido por el ferroceno en una reacción acoplada catalizada por la HRP. Es la reducción amperométrica del ion ferricinio la reacción electroquímica utilizada para la monitorización de la secuencia de reacciones indicada en la **Figura 117**.

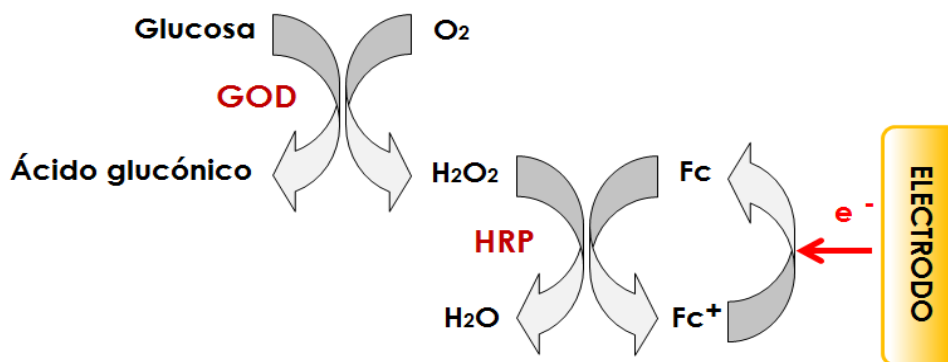


Figura 117. Secuencia de reacciones enzimática y electroquímica implicadas en la detección de glucosa empleando el biosensor enzimático amperométrico GOD-HRP-Fc.

Tabla 60. Características analíticas y propiedades del biosensor de acero inoxidable con capa de oro de GOD-HRP-Fc trabajando en disoluciones agitadas de tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 y empleando glucosa como sustrato. $E_{ap} = 0,0$ V vs. Ag/AgCl. Datos facilitados por InBea Biosensores S.L.

Potencial de trabajo (vs. Ag/AgCl)	0,0 V
Medio de trabajo	tampón fosfato 0,05 mol L ⁻¹ de pH 7,4
Intervalo lineal	(3,80 – 250) × 10 ⁻⁴ g L ⁻¹
Sensibilidad	(1,25 ± 0,02) × 10 ⁴ nA g ⁻¹ L
Límite de detección	9,7 × 10 ⁻⁵ g L ⁻¹
Límite de cuantificación	3,8 × 10 ⁻⁴ g L ⁻¹
RSD	4,5 %
Tiempo de vida	30 días /80 medidas
Condiciones de almacenamiento	Sumergido en tampón fosfato 0,05 mol L ⁻¹ de pH 7,4 a 4°C
Tiempo de almacenamiento	30 días

Se optimizaron las diferentes variables experimentales del sistema de flujo continuo, centrándose principalmente en las condiciones hidrodinámicas, siendo estas últimas las que van a influir decisivamente en un buen rendimiento de extracción de la glucosa de las frutas y en una adecuada dilución del analito procedente de la muestra.

4.3.1.1. Selección de la sonda de microdiálisis

El objetivo principal de este capítulo, determinación directa de glucosa en frutas en estado natural, sin tratamiento previo de las mismas, hace necesario implementar en el sistema de flujo continuo un dispositivo que extraiga el analito de la muestra.

Como estrategia metodológica para conseguir este objetivo se eligió la microdiálisis, debido a que esta metodología se ha empleado con éxito en la monitorización de glucosa en diferentes tipos de muestras, como se ha mostrado anteriormente en la Tabla 58 de ejemplos del Apartado 4.1.1.1. Teniendo en cuenta que esta especie en la fruta se encuentra disuelta en la fracción acuosa de su composición, esta metodología resulta muy apropiada para la extracción de la glucosa de las frutas en estado natural.

Asimismo, esta estrategia de muestreo, además de ser de fácil implementación en un sistema de flujo continuo, tiene como característica ser una metodología no destructiva, favorece la selectividad y preserva el biosensor del ensuciamiento de la superficie del electrodo por no estar en contacto con la matriz de la muestra lo que aumenta su tiempo de vida útil, aspecto ya comentado en el Apartado 2.2.3.

Por otro lado, el límite superior del intervalo lineal de concentración del biosensor de glucosa está por debajo de la concentración que contienen las frutas, y es incluso superior a 15 g L^{-1} en muchos zumos de fruta como los de naranja, manzana o piña (RD 1518/2007), por lo que es necesario la dilución del contenido de este analito de la muestra antes de que alcance la célula de medida. La microdiálisis, al no tener un rendimiento de extracción del 100 %, hace que sea una estrategia adecuada para este fin, permitiendo variar el rendimiento de la extracción cambiando las variables hidrodinámicas del sistema de flujo continuo [Lange, 2013]. De entre todos los modelos comerciales de sondas probados (Figura 118), se escogió aquel cuyo diseño y dimensiones facilitaban su integración en un sistema de flujo en continuo para el análisis tanto de disoluciones como de muestras sólidas.

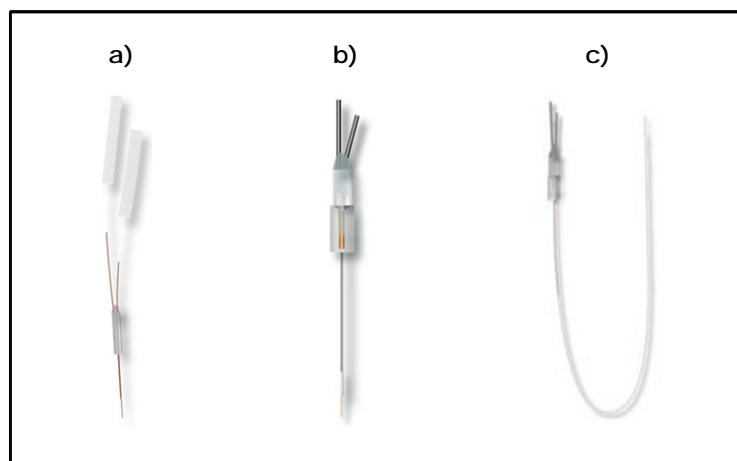


Figura 118. Sondas de microdiálisis comerciales ensayadas. Modelo DZ-X-0Y (a), Modelo AZ-X-0Y (b) y Modelo TP-X-Y (c). [p. web 19].

Así, se encontró que con el modelo mostrado en la **Figura 118a** era complicado obtener un acoplamiento eficaz en el sistema de flujo de modo que el tránsito de flujo se diera sin la entrada de burbujas en el sistema o sin la ruptura de la membrana debido a sobrepresiones. En el caso del modelo mostrado en la **Figura 118b**, el hecho de ser una sonda fabricada con un material rígido se traducía en una fácil ruptura de la membrana al introducirla en una muestra sólida de las características de la fruta. Además, como en el caso del anterior modelo, requiere una mayor longitud de los tubos del sistema de flujo conectados a la entrada y la salida de la sonda para posibilitar la introducción y una correcta orientación de la misma dentro de las muestras. La sonda seleccionada fue el modelo TP-100-10 con una longitud de membrana de 10 mm, mostrada en la **Figura 118c**, que proporciona una mayor durabilidad debido a su flexibilidad.

4.3.1.2. Diseño del bioanalizador para el análisis de glucosa en fruta

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de la sonda de microdiálisis tanto como dispositivo muestreador así como sistema de dilución para la monitorización de glucosa, se diseñó el sistema de flujo en continuo que se muestra en el esquema

de la **Figura 119**, y cuyos componentes principales son una bomba peristáltica, la sonda de microdiálisis (**Figura 119b**) y una célula electroquímica de flujo "wall-jet".

Este estudio se realizó mediante la inmersión de la sonda de microdiálisis en disoluciones patrón de glucosa de concentraciones comprendidas entre 0,4 y 2,5 g L⁻¹, trabajando con tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 como disolución portadora y aplicando un potencial de 0,0 V. Se eligió como caudal de trabajo el mínimo permitido por la bomba peristáltica empleada debido a que caudales mayores disminuían el tiempo de vida de la membrana de la sonda de microdiálisis.

En el proceso de diálisis, la glucosa que contiene la muestra pasa a través de la membrana y es recogida por la disolución de perfusión (disolución portadora que llega a la sonda) y el dializado (disolución portadora con el analito extraído) alcanza la célula de flujo para producir la señal analítica correspondiente.

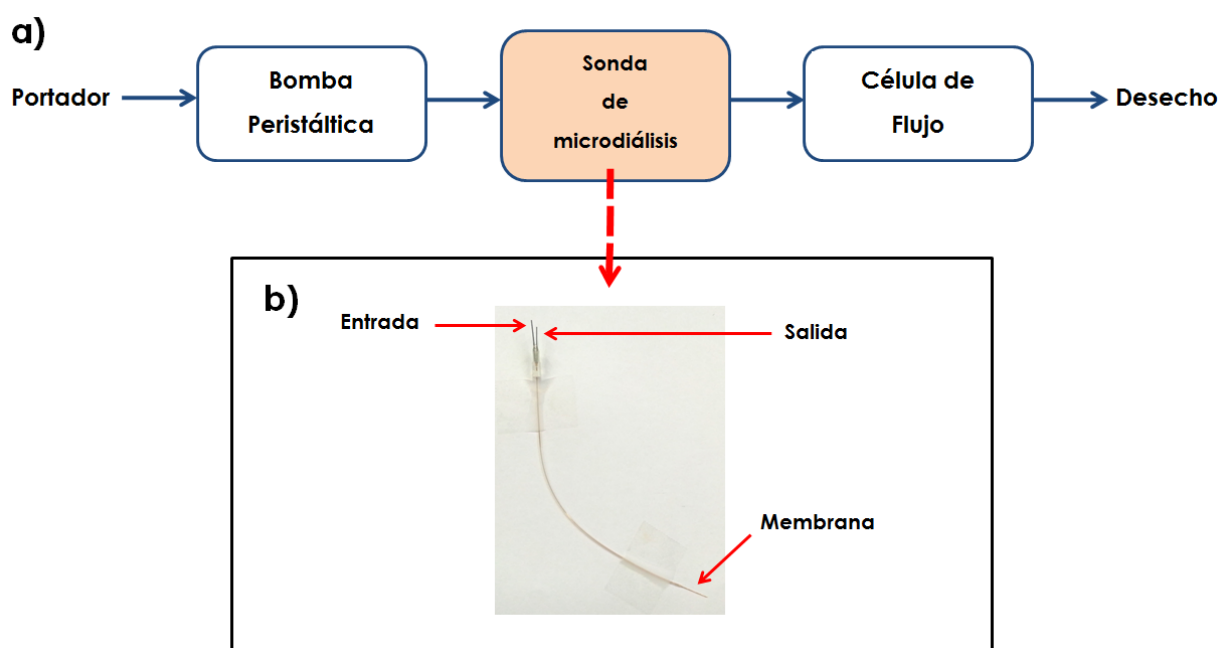


Figura 119. a) Esquema del sistema de flujo en continuo l. b) Sonda de microdiálisis empleada.

En la **Figura 120** se muestra el registro i-t obtenido para las diferentes concentraciones de disolución patrón de glucosa ensayadas, así como la curva de calibrado. Es necesario indicar que la medida de la intensidad de corriente se realizó sobre señales que habían alcanzado el estado estacionario, debido a que el muestreo se debe realizar manualmente punzando la sonda dentro de la fruta. La

obtención de la señal a tiempos inferiores a alcanzar el estado estacionario proporciona resultados muy irreproducibles.

Como se puede observar en la **Figura 120a**, se obtuvieron señales crecientes con el aumento de la concentración de glucosa, de una manera reproducible y con una recuperación eficaz de la línea base original al retirar la sonda de las disoluciones patrón.

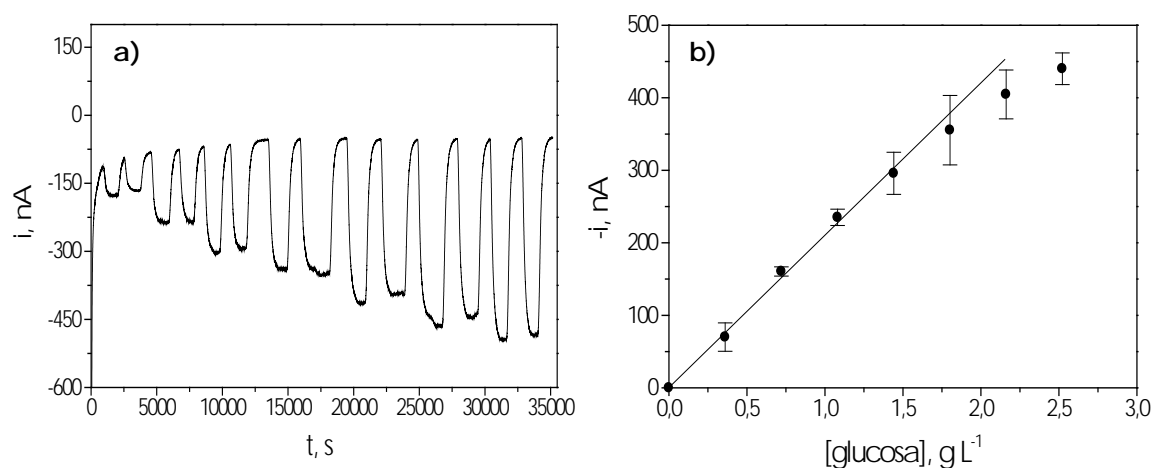


Figura 120. (a) Registro amperométrico obtenido tras introducir la sonda de microdiálisis en disoluciones patrón de glucosa de concentraciones comprendidas entre 0,4 y 2,5 g L⁻¹. (b) Curva de calibrado correspondiente al registro (a). Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo: 24 μL min⁻¹. E_{ap} = 0,0 V vs. Ag/AgCl. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Las características del calibrado se muestran en la **Tabla 61**. Como se puede apreciar, aunque se obtuvo una buena sensibilidad, el límite superior del intervalo dinámico de concentraciones estaba por debajo de los niveles de concentración de glucosa, en g L⁻¹, encontrados en distintas frutas analizadas en este Trabajo como son, por ejemplo, 63 g L⁻¹ en la uva blanca o 5 g L⁻¹ en la pera conferencia.

Tabla 61. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y concentraciones máximas de glucosa admitidas para los intervalos de linealidad, correspondientes a la curva de calibrado de la **Figura 120**.

Pendiente, nA g ⁻¹ L	O.o, nA	r	Límite superior de linealidad, g L ⁻¹
(2,10 ± 0,08) × 10 ²	1 ± 7	0,9980	1,44

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

A la vista de estos resultados, se puede decir que la capacidad de dilución de la sonda de diálisis no es suficiente para la monitorización de glucosa en frutas. La primera solución sería aumentar el caudal del portador con el fin de que el tiempo de contacto fuera menor y se extrajera menos glucosa, disminuyendo así la concentración de este analito en el portador. Sin embargo, este aumento del caudal proporcionaría tiempos de vida de la membrana muy cortos, como ya se ha comentado. Por tanto, se procedió a diluir la muestra en el propio sistema implementando un segundo canal de flujo mediante la colocación de un conector de tres vías después de la sonda de microdiálisis (Figura 121).

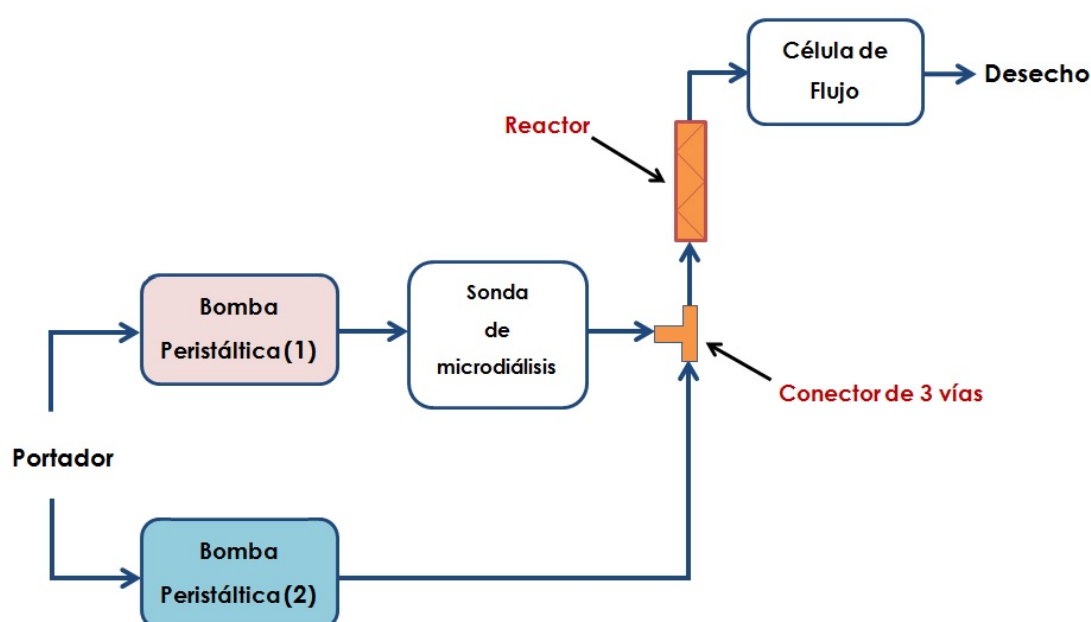


Figura 121. Esquema del sistema de flujo en continuo II.

A continuación del conector de tres vías se acopló un reactor de la longitud adecuada para que se produjese una mezcla reproducible de la disolución del canal de dilución con la disolución portadora del analito. De este modo, se hizo necesario estudiar el caudal de este segundo canal con el fin de conseguir una dilución de la muestra que permitiera la monitorización de la glucosa al nivel de concentración que se encuentra en las frutas, estudio que se describe en el siguiente apartado.

4.3.1.2.1. Optimización de las variables hidrodinámicas

Las variables hidrodinámicas a estudiar serán el caudal de perfusión (Bomba 1) y el caudal de dilución (Bomba 2). Como ya se indicó anteriormente, el caudal de la Bomba 1 fue de $24 \mu\text{L min}^{-1}$, el mínimo que podía proporcionar la bomba empleada con el diámetro de los tubos de propulsión empleados. Este caudal es alto en comparación con los empleados normalmente en microdiálisis, comprendido entre $0,1$ y $5 \mu\text{L min}^{-1}$ [Lange, 2013]. Sin embargo, no se estudiaron caudales más bajos debido a que la extracción de la muestra tendría un mayor rendimiento [Chaurasia, 2007] y por lo tanto una menor dilución del analito en el dializado. Esto sería un aspecto negativo en el desarrollo del bioanalizador en el que es necesario, como ya se ha comentado, añadir un nuevo canal para diluir la muestra. Además, este caudal de trabajo para la Bomba 1 pudo ser aplicado con la sonda de microdiálisis utilizada durante periodos de tiempo adecuados para cumplir los objetivos como se verá en el apartado de estabilidad (Apartado 4.3.2.2).

Para la optimización del caudal proporcionado por la Bomba 2, empleado para la dilución y el transporte del dializado a la célula de flujo, se registraron las intensidades de corriente medidas en el estado estacionario introduciendo la sonda en disoluciones patrón de glucosa de concentraciones crecientes, trabajando con caudales comprendidos entre $0,37$ y $3,61 \text{ mL min}^{-1}$, y se construyeron los calibrados correspondientes. En la **Figura 122** se muestran las curvas de calibrado obtenidas.

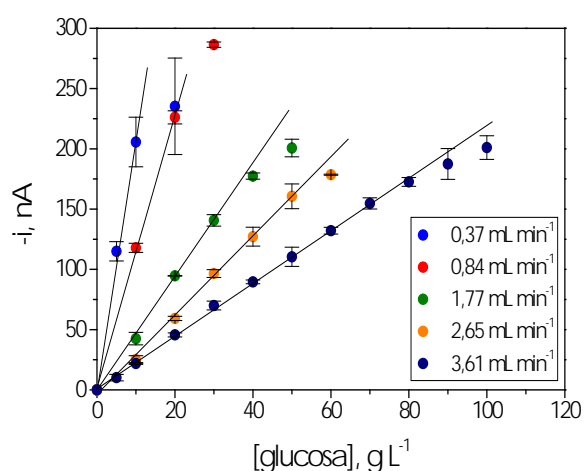


Figura 122. Intensidades de corriente registradas tras introducir la sonda de microdiálisis en disoluciones patrón de glucosa de concentraciones crecientes trabajando con diferentes caudales para la Bomba 2. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo para la Bomba 1: $24 \mu\text{L min}^{-1}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Barras de error calculadas como 3 veces la desviación estándar de las medidas.

Asimismo, las características analíticas correspondientes a las curvas de la Figura 122 se recogen en la **Tabla 62**, donde se incluye el límite superior de linealidad obtenido para cada uno de los calibrados.

Tabla 62. Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de correlación y concentraciones máximas de glucosa admitidas para los intervalos de linealidad, correspondientes a las curvas de calibrado de la Figura 122.

Caudal, mL min ⁻¹	Pendiente, nA g ⁻¹ L	O.o, nA	r	Límite superior de linealidad, g L ⁻¹
0,37	21 ± 1	4 ± 9	0,9980	10
0,84	11,3 ± 0,3	2 ± 4	0,9997	20
1,77	4,7 ± 0,1	-2 ± 2	0,9993	30
2,65	3,27 ± 0,07	-4 ± 2	0,9990	50
3,61	2,18 ± 0,02	1 ± 1	0,9996	80

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

A la vista de los resultados y con objeto de obtener un sistema de flujo capaz de medir glucosa en un amplio rango de concentraciones, se seleccionó 3,61 mL min⁻¹ como caudal de trabajo para la bomba peristáltica 2, ya que a este caudal los niveles de concentración de las frutas están incluidos en el intervalo de linealidad proporcionado por el sistema bioanalizador.

4.3.2. Estudios de estabilidad

El bioanalizador objeto de estudio en este apartado tiene, en principio, dos componentes desechables, por lo que es necesario conocer el tiempo de vida de estos desechables. Además del biosensor, que presenta un tiempo de vida útil de trabajo como detector amperométrico del sistema de flujo, también se produce un deterioro de la sonda con el tiempo.

4.3.2.1. Estabilidad del biosensor de glucosa

En primer lugar, se ha estudiado el tiempo de vida del biosensor y se ha evaluado la reproducibilidad de las señales analíticas proporcionadas por el mismo.

La repetitividad de las señales amperométricas se ha evaluado realizando 20 medidas sucesivas de disoluciones patrón de glucosa de concentración 40 g L^{-1} (**Figura 123**), obteniendo un valor para la desviación estándar relativa de las mismas de 7,0 %, indicativo de una buena reproducibilidad de medida en las condiciones hidrodinámicas establecidas.



Figura 123. Señales amperométricas correspondientes a 20 medidas sucesivas registradas tras introducir la sonda de microdiálisis en una disolución patrón de glucosa de concentración 40 g L^{-1} . Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo para la Bomba 1: $24 \mu\text{L min}^{-1}$. Caudal de trabajo para la Bomba 2: $3,61 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

En las condiciones previamente optimizadas se estudió la estabilidad del biosensor con el tiempo, para lo cual se obtuvieron los valores de intensidad de corriente en el estado estacionario de las señales registradas tras la inmersión de la sonda en disoluciones patrón de glucosa de 40 g L^{-1} . El biosensor fue almacenado en disolución reguladora de fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ y pH 7,4 a 4°C durante el estudio. En la **Figura 124** se muestra el gráfico de control construido para un biosensor de glucosa tomando como valor central la media de 3 medidas sucesivas de patrón de glucosa, obtenidas el primer día de trabajo del biosensor, y como valor de los límites superior e inferior de control la media $\pm 3s$ (donde "s" es la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día).

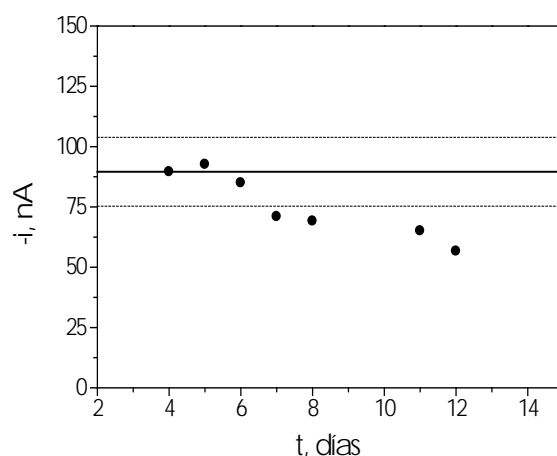


Figura 124. Gráfico de control para evaluar la estabilidad de un biosensor Fc-GOD-HRP-AuE. Intensidades de corriente correspondientes a disolución patrón de glucosa de concentración 40 g L^{-1} . Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo para la Bomba 1: $24 \mu\text{L min}^{-1}$. Caudal de trabajo para la Bomba 2: $3,61 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Como se puede observar en el gráfico, el biosensor de glucosa presenta un tiempo de vida significativamente menor si se utiliza como detector amperométrico en el bioanalizador desarrollado que trabajando en disoluciones agitadas (Tabla 60 del Apartado 4.3.1). Se puede considerar operativo durante aproximadamente 10 días, a partir de los cuales el biosensor presentaba dificultades para calibrar. En ese tiempo se analizaron una media de 90 muestras con cada uno de los cinco biosensores empleados en el estudio.

4.3.2.2. Estabilidad de la sonda de microdiálisis

Con respecto al tiempo de vida útil de la sonda de microdiálisis empleada como dispositivo muestreador del bioanalizador de flujo continuo, se promediaron unos 20 días de trabajo antes de la ruptura de la membrana para las sondas empleadas en este estudio (Tabla 63).

Tabla 63. Número de días de uso de cada sonda de microdiálisis antes de la ruptura de la membrana.

Sonda	Nº días de trabajo
1	18
2	33
3	22

4.3.3. Curvas de calibrado y características analíticas

A partir de la curva de calibrado, mostrada anteriormente en la Figura 122 (Apartado 4.3.1.2.1), obtenida con el bioanalizador de glucosa desarrollado en las condiciones de trabajo optimizadas, se han determinado las características analíticas que se recogen en la **Tabla 64**. Los datos que se muestran en la misma corresponden al estudio de la respuesta amperométrica en el intervalo de concentraciones comprendido entre 5 y 100 g L⁻¹ de glucosa.

Para establecer el intervalo lineal de los calibrados y estimar los límites de detección y de cuantificación se han tomado como criterios los indicados anteriormente en el Apartado 3.3.1.1.3.

Tabla 64. Intervalo de linealidad, pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación y límites de detección y de cuantificación correspondientes a la curva de calibrado de la Figura 122.

Intervalo lineal, g L ⁻¹	Pendiente, nA g ⁻¹ L	O.o, nA	r	LD, g L ⁻¹	LC, g L ⁻¹
3,0 - 80	2,18 ± 0,02	1 ± 1	0,9996	0,9	3,0

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

4.3.4. Validación del bioanalizador en el análisis de glucosa en fruta batida

En este apartado se describen los estudios llevados a cabo con el objetivo de evaluar el funcionamiento y la aplicabilidad del sistema de análisis en flujo continuo para la monitorización de glucosa, basándose en la microdiálisis como técnica de extracción.

En primer lugar se compararon los resultados obtenidos en el análisis de glucosa en un batido de fruta empleando el bioanalizador en flujo desarrollado y el método validado de InBea "Bioanalizador de glucosa en mostos y zumos", que utiliza el mismo biosensor de GOD como detector amperométrico trabajando en

disoluciones agitadas. Con el sistema de flujo en continuo, se estableció el calibrado a partir de la medida por triplicado de la intensidad de corriente de disoluciones patrón de glucosa de concentraciones 40 y 80 g L⁻¹, para posteriormente realizar varias medidas de un batido de kiwi verde sin haber llevado a cabo ningún pretratamiento. En la **Figura 125** se muestra el registro intensidad-tiempo obtenido.

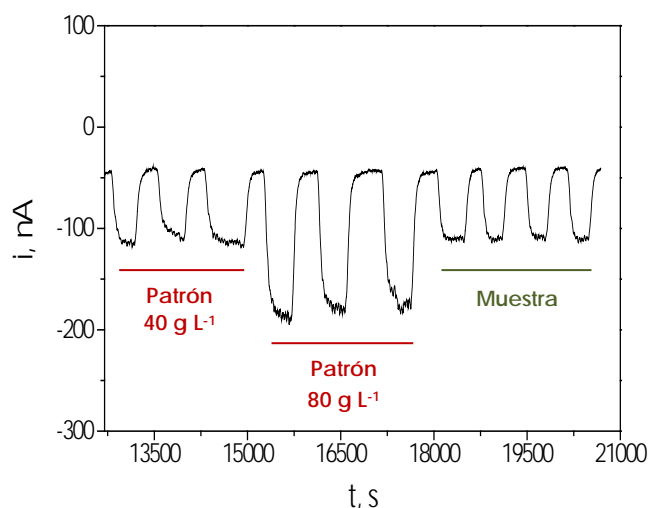


Figura 125. Registro amperométrico obtenido tras introducir la sonda de microdiálisis en disoluciones patrón de glucosa de concentraciones 40 y 80 g L⁻¹ y medidas consecutivas de un batido de kiwi verde. Disolución portadora: tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. Caudal de trabajo para la Bomba 1: 24 μL min⁻¹. Caudal de trabajo para la Bomba 2: 3,61 mL min⁻¹. E_{ap} = 0,0 V vs. Ag/AgCl.

Trabajando en disoluciones agitadas se realizó un calibrado para el intervalo de concentraciones comprendido entre 4,5x10⁻³ y 9x10⁻³ g L⁻¹ a partir de disoluciones patrón de glucosa de concentraciones adecuadas preparadas en disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4. La muestra de kiwi se preparó con una dilución 1:20 del batido con la disolución reguladora de trabajo. En la célula de medida, que contenía 20 mL de tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4, se adicionó el volumen adecuado de la dilución de muestra (50 μL) y se fueron registrando las intensidades de corriente en función del tiempo. Los resultados se muestran en la **Tabla 65**, en la que se incluyen los resultados obtenidos con ambos métodos.

Tabla 65. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en un batido de kiwi verde empleando el bioanalizador en flujo desarrollado y el método validado de InBea Biosensores S.L.

Metodología	[glucosa], g L ⁻¹	[glucosa] Promedio, g L ⁻¹	t _{exp}
Bioanalizador en flujo	39,437	(39,8 ± 0,9) g L ⁻¹ (RSD _{n=4} = 1,3 %)	2,461
	40,323		
	39,219		
	40,144		
InBea	39,954	(38 ± 2) g L ⁻¹ (RSD _{n=4} = 3,4 %)	2,461
	37,544		
	36,997		
	37,670		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Para la validación de los resultados obtenidos con el bioanalizador en flujo se han comparado las medias determinadas por cada método aplicando el criterio de la *t* de Student para la comparación de dos medias experimentales. Teniendo en cuenta que el valor tabulado $t_{\text{tab}}(4 \text{ grados de libertad, } p = 0,05) = 2,776$ es superior a la $t_{\text{experimental}}$ determinada (Tabla 65), se deduce que no existen diferencias significativas entre los valores de concentración obtenidos con el bioanalizador de glucosa desarrollado y el método validado de InBea.

De manera adicional para comprobar que la monitorización de glucosa en muestras de fruta empleando el sistema de análisis en flujo continuo proporciona una exactitud adecuada, se llevó a cabo un estudio de recuperación en el que se realizó el enriquecimiento de un batido de ciruela roja, con glucosa patrón a dos niveles diferentes de concentración. Para la preparación de las muestras enriquecidas se disolvieron, aplicando agitación magnética, 0,025 y 0,050 g de glucosa, pesados exactamente, en 5 mL del batido de ciruela para el enriquecimiento de 5 y 10 g L⁻¹, respectivamente. Para el análisis, en primer lugar se estableció el calibrado a partir de disoluciones patrón de glucosa de concentraciones 20 y 40 g L⁻¹ para a continuación realizar varias medidas de las

muestras de ciruela roja batida sin enriquecer y enriquecida, sin haber efectuado ninguna dilución de las mismas. En la **Tabla 66** se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 66. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en una muestra de ciruela roja y enriquecidas empleando el bioanalizador de glucosa desarrollado.

Muestra	[glucosa], g L ⁻¹	[glucosa] Promedio, g L ⁻¹	% recuperación
Ciruela roja	29,029	30 ± 3 (RSD _{n=3} = 3,8 %)	-
	30,426		
	31,303		
Ciruela roja +5,06 g L ⁻¹	34,695	35 ± 1 (RSD _{n=3} = 1,1 %)	102 ± 19 (RSD _{n=3} = 7,5 %)
	35,401		
	35,321		
Ciruela roja +9,96 g L ⁻¹	39,637	40 ± 2 (RSD _{n=3} = 2,6 %)	97 ± 26 (RSD _{n=3} = 10,7 %)
	40,685		
	38,626		

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Como se puede observar en los resultados de la tabla, se obtuvieron recuperaciones próximas al 100 % y, por lo tanto, se puede concluir que el método desarrollado no presenta errores sistemáticos.

Por último, con el objetivo de comprobar que la sonda se comporta del mismo modo en la monitorización de glucosa en patrones y en las frutas, a cualquier nivel de concentración, se llevó a cabo el estudio de un parámetro característico del sistema e importante en la metodología de análisis de la microdiálisis cuantitativa, que es la recuperación relativa "RR". Esta recuperación relativa expresa el rendimiento con que se ha extraído el analito de la muestra, también expresado como fracción de extracción [Miró, 2005] o eficiencia de extracción [Davies, 2000].

Así, "RR" se determina a partir de la siguiente expresión (1) [Li, 2008], expresado en %:

$$RR, \% = \frac{C_d}{C_m} \times 100 \quad (1)$$

Donde " C_d " es la concentración de analito en el dializado y " C_m " es la concentración de analito en la muestra (exterior a la membrana de la sonda).

Para este estudio, en primer lugar se procedió a la determinación de la recuperación relativa llevada a cabo por la sonda de microdiálisis en el proceso de extracción de la glucosa en disoluciones patrón de concentraciones comprendidas entre 10 y 90 g L⁻¹. Para ello, se introdujo la sonda en las disoluciones patrón y se recogió el dializado obtenido para cada una de las disoluciones, empleando tampón fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4 como líquido de perfusión y aplicando las condiciones de flujo establecidas en el bioanalizador desarrollado. A continuación, se llevó a cabo la determinación de la concentración de glucosa en los dializados obtenidos empleando la metodología en disoluciones agitadas de InBea. De este modo, con la concentración de glucosa medida en los dializados y aplicando la expresión (1) anteriormente indicada para el cálculo de la recuperación relativa RR, se pudieron obtener los valores de RR para cada concentración de patrón de glucosa que se muestran en la **Tabla 67**. Como se indica en dicha tabla, se estimó un valor promedio de RR del 2,43 % a partir de los datos obtenidos para todas las concentraciones de glucosa ensayadas. Este valor tan bajo para el rendimiento de la extracción, trabajando a un valor de caudal de 24 μL min⁻¹ para la disolución de perfusión, es razonable teniendo en cuenta que valores de RR del 100 % sólo se pueden conseguir trabajando con una membrana de 10 mm de longitud y caudales por debajo de 0,3 μL min⁻¹ [Chaurasia, 2007]. Además, teniendo en cuenta que fue necesario introducir un mecanismo de dilución adicional en el sistema de flujo, interesa que este parámetro sea bajo para la aplicación que se ha estudiado.

Tabla 67. Resultados obtenidos en la determinación de la recuperación relativa proporcionada por la sonda en disoluciones patrón de glucosa de diferentes concentraciones.

[patrón glucosa], g L ⁻¹	RR,%	RR promedio, %
10	2,422	2,5 ± 0,3 (RSD _{n=3} = 5,7 %)
	2,375	
	2,638	
18	2,579	2,4 ± 0,1 (RSD _{n=5} = 3,7 %)
	2,357	
	2,374	
	2,408	
	2,468	
20	2,270	2,4 ± 0,2 (RSD _{n=5} = 6,1 %)
	2,485	
	2,325	
	2,610	
	2,575	
25	2,569	2,55 ± 0,04 (RSD _{n=5} = 1,3 %)
	2,533	
	2,576	
	2,576	
	2,504	
45	2,282	2,25 ± 0,03 (RSD _{n=5} = 1,0 %)
	2,250	
	2,250	
	2,266	
	2,219	
60	2,485	2,47 ± 0,04 (RSD _{n=5} = 1,5 %)
	2,513	
	2,494	
	2,439	
	2,429	
90	2,384	2,4 ± 0,2 (RSD _{n=5} = 8,7 %)
	2,107	
	2,601	
	2,523	
	2,220	
RR promedio total, %:	2,43 ± 0,05	(RSD_{n=33} = 5,7 %)

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Posteriormente, se realizó la determinación de la concentración de glucosa en varias frutas batidas previamente. Para ello, se establecieron los calibrados en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 20 g L⁻¹ para el análisis en la pera conferencia, entre 20 y 40 g L⁻¹ para el análisis en el kiwi verde y la ciruela roja, y entre 40 y 80 g L⁻¹ para el análisis en la uva blanca a partir de disoluciones patrón de glucosa de concentraciones adecuadas, preparadas en disolución reguladora fosfato 0,05 mol L⁻¹ de pH 7,4, y se midieron posteriormente las muestras de frutas, sin haberlas sometido a dilución alguna. En la **Tabla 68** se muestran los resultados obtenidos para cada fruta batida analizada.

Por último, con objeto de comprobar que la recuperación de glucosa por parte de la sonda es el mismo en los patrones y en las muestras de fruta, se procedió, aplicando el mismo procedimiento que para las disoluciones patrón, a la extracción de este analito con la sonda de microdiálisis en las muestras de fruta batidas anteriormente analizadas y a la recogida del dializado para su posterior análisis trabajando con la metodología en disoluciones agitadas de InBea. De este modo, se pudo determinar el valor de RR obtenido para cada muestra de fruta a partir de las concentraciones de glucosa medidas con el bioanalizador y las medidas en los dializados con el método de InBea. Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 68.

Así, se han comparado estadísticamente los valores promedio de RR obtenidos en las muestras de fruta y en los patrones de glucosa a través del cálculo de la *t* de Student. Como se puede ver a continuación en la Tabla 68, el valor de $t_{\text{experimental}}$ obtenido es inferior al valor tabulado t_{tab} (35 grados de libertad, $p = 0,05$) = 2,030. Por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los valores de RR determinados en las muestras de fruta y en los patrones de glucosa.

Tabla 68. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en varias muestras de fruta y en los correspondientes dializados para el cálculo de la recuperación relativa.

[glucosa], g L ⁻¹					Recuperación relativa			
Método	Bioanalizador en flujo		InBea					
Muestra	Muestra	Muestra promedio	Dializado	Dializado promedio	RR, %	RR promedio, %	RR promedio (patrones), %	t _{Exp}
Pera conferencia	5,929	5 ± 1 (RSD _{n=3} = 7,8 %)	0,121	0,122 ± 0,005 (RSD _{n=3} = 1,7 %)	2,440	2,4 ± 0,2 (RSD _{n=4} = 4,9 %)	2,43 ± 0,05 (RSD _{n=33} = 5,7 %)	0,132
	5,395		0,120					
	5,080		0,124					
Kiwi verde	20,964	21,6 ± 0,8 (RSD _{n=5} = 2,9 %)	0,513	0,49 ± 0,04 (RSD _{n=5} = 6,3 %)	2,268			
	20,956		0,468					
	21,892		0,451					
	21,568		0,526					
	22,427		0,494					
Ciruela roja	25,564	24 ± 1 (RSD _{n=5} = 4,9 %)	0,601	0,60 ± 0,02 (RSD _{n=5} = 2,5 %)	2,500			
	22,821		0,617					
	23,523		0,581					
	24,356		0,601					
	22,795		0,619					
Uva blanca	64,893	63 ± 2 (RSD _{n=5} = 3,2 %)	1,564	1,6 ± 0,1 (RSD _{n=5} = 5,2 %)	2,540			
	61,059		1,623					
	61,098		1,618					
	62,325		1,589					
	65,229		1,426					

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Asimismo, se ha llevado a cabo el cálculo de la concentración de glucosa en las muestras de fruta aplicando el valor de RR promediado para los patrones sobre las concentraciones obtenidas en los dializados, medidas mediante la metodología en disoluciones agitadas de InBea. Los resultados se recogen en la **Tabla 69**, en la que se han incluido las concentraciones que se midieron trabajando con el bioanalizador en flujo.

Tabla 69. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en varias muestras de fruta aplicando $RR_{promedio}$ (patrones) sobre los valores de concentración medidos en los correspondientes dializados.

[glucosa], g L ⁻¹					
Método	InBea			Bioanalizador en flujo	t _{Exp}
Muestra	Dializado	Muestra	Muestra _{promedio}	Muestra _{promedio}	
Pera conferencia	0,121	4,979	5,0 ± 0,2 (RSD _{n=3} = 1,7 %)	5 ± 1 (RSD _{n=3} = 7,8 %)	0,085
	0,120	4,938			
	0,124	5,103			
Kiwi verde	0,513	21,111	20 ± 2 (RSD _{n=5} = 6,3 %)	21,6 ± 0,8 (RSD _{n=5} = 2,9 %)	
	0,468	19,259			
	0,451	18,560			
	0,526	21,646			
	0,494	20,329			
Ciruela roja	0,601	24,733	24,8 ± 0,8 (RSD _{n=5} = 2,5 %)	24 ± 1 (RSD _{n=5} = 4,9 %)	
	0,617	25,391			
	0,581	23,909			
	0,601	24,733			
	0,619	25,473			
Uva blanca	1,564	64,362	64 ± 4 (RSD _{n=5} = 5,2 %)	63 ± 2 (RSD _{n=5} = 3,2 %)	
	1,623	66,790			
	1,618	66,584			
	1,589	65,391			
	1,426	58,683			

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

De nuevo, se ha llevado a cabo la comparación de las medias experimentales obtenidas por análisis directo con el bioanalizador en flujo e indirecto mediante la medida en disoluciones agitadas de los dializados, y posterior aplicación del valor de RR promediado para los patrones para el contenido de glucosa, en los triturados de frutas a través del cálculo del estadístico *t* para datos emparejados. Como se puede observar en la Tabla 69, el valor de *t*_{experimental} obtenido es inferior al valor

tabulado de t_{tab} (3 grados de libertad, $p = 0,05$) = 3,182. Por lo tanto, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de concentración de glucosa determinados por ambos métodos, demostrándose así que la sonda se comporta igual con respecto a la extracción del analito tanto en patrones como en las muestras.

Adicionalmente, se ha llevado a cabo la comparación de los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de glucosa en las muestras de fruta con ambos procedimientos empleando el método de las rectas de regresión (Figura 126).

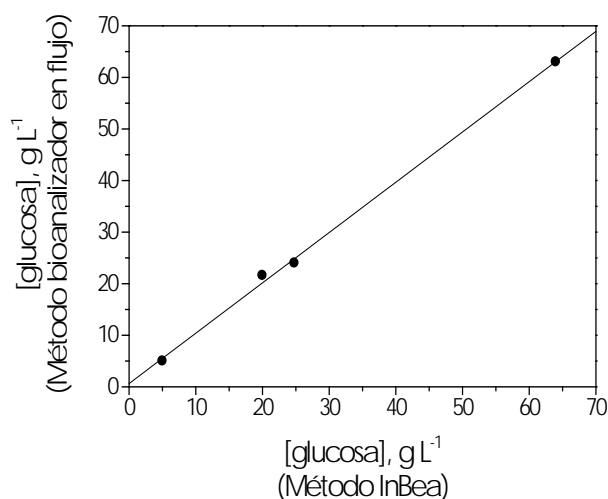


Figura 126. Comparación de los resultados obtenidos para la determinación de glucosa en muestras de fruta empleando el bioanalizador de flujo en continuo desarrollado frente a los obtenidos a través del dato de RR promediado para las disoluciones patrón.

Los valores obtenidos para la pendiente ($0,98 \pm 0,03$) y la ordenada en el origen (1 ± 1), contienen el 1 y el 0 en los intervalos de confianza correspondientes, indicando que no hay diferencias significativas entre ambos métodos. Además, el valor del coeficiente r es de 0,9992, lo que indica una buena correlación de los resultados de concentración de glucosa obtenidos con ambas metodologías.

4.3.5. Análisis de glucosa en piezas de fruta

En este apartado se recogen los resultados y la metodología aplicada en el análisis de glucosa en peras conferencia, kiwis verdes, ciruelas rojas y uvas blancas empleando el bioanalizador en flujo desarrollado, utilizando una sonda de microdiálisis para la extracción.

Antes de proceder a la determinación de la glucosa en la pieza de fruta sin batir, es necesario calcular un factor de corrección K y calcular la relación entre las unidades de las disoluciones patrón (g L^{-1}) y la expresión de la concentración de este analito en las frutas (% (m/m)).

4.3.5.1. Análisis de glucosa en fruta batida: estimación del factor de corrección K

Debido a que no se puede realizar la interpolación en el calibrado con patrones de glucosa, ya que la eficacia de extracción de este analito con la sonda en la fruta sólida no es la misma que en el triturado de frutas, es necesario considerar un factor de corrección. Dicho factor se denominará como K y relaciona la intensidad de corriente medida en las señales obtenidas en la fruta sin batir (" i_f ") con la correspondiente intensidad de las señales realizadas en la fruta batida (" i_b "). La expresión para el cálculo de K , es la siguiente:

$$K = \frac{i_f}{i_b} \quad (2)$$

Para la determinación del factor K , en primer lugar se dividió la pieza de fruta en dos mitades. Una de ellas se batió y se procedió a obtener la correspondiente señal analítica empleando la sonda de microdiálisis cuyo valor intensidad de corriente corresponde a " i_b ". En la otra mitad se insertó la sonda de microdiálisis mediante una cánula para evitar la ruptura de la membrana de la sonda (**Figura 127**), y el valor de intensidad de corriente de la señal obtenida corresponde al valor de " i_f ".

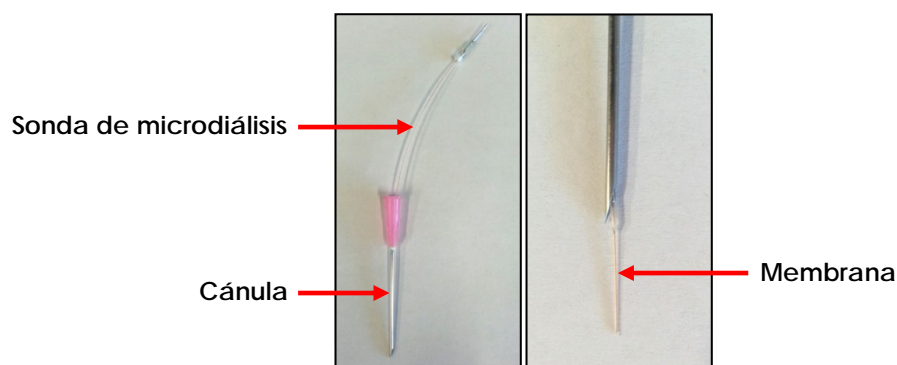


Figura 127. Sonda de microdiálisis acoplada a una cánula para su introducción en la fruta sólida.

En la **Figura 128** se muestra, a modo de ejemplo, un registro intensidad-tiempo correspondiente a la medida de glucosa con el bioanalizador en flujo en el jugo y en la pieza de fruta de una uva, en el que se puede observar la diferencia en la altura de las señales amperométricas dependiendo del estado físico de la fruta. Los valores de K calculados para las distintas frutas ensayadas se muestran a continuación en las **Tablas 70, 71, 72 y 73**.

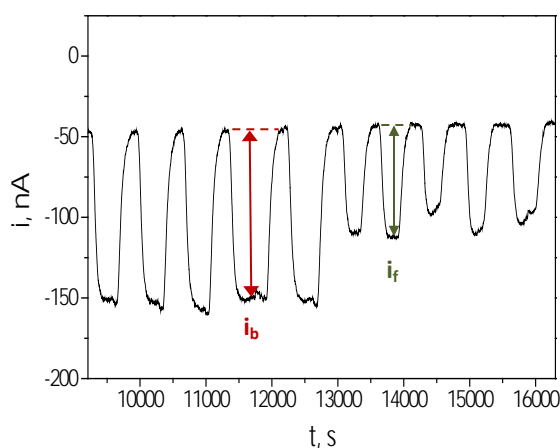


Figura 128. Registro amperométrico obtenido tras introducir la sonda de microdiálisis en el jugo y en distintos puntos de la pieza de fruta de una uva blanca. Disolución portadora: tampón fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4. Caudal de trabajo para la Bomba 1: $24 \mu\text{L min}^{-1}$. Caudal de trabajo para la Bomba 2: $3,61 \text{ mL min}^{-1}$. $E_{ap} = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Tabla 70. Resultados obtenidos en la estimación del factor K en la pera conferencia.

Muestra	-i _b , nA	-i _f , nA	K _{promedio}
Pera 1	14,235	7,141	0,54 ± 0,03 (RSD _{n=15} = 11,1 %)
	14,973	6,598	
	12,625	8,207	
	-	8,02	
	-	7,442	
Pera 2	9,271	5,514	0,55 ± 0,03 (RSD _{n=12} = 8,4 %)
	10,32	5,037	
	10,402	5,665	
	-	5,952	
Pera 3	11,574	4,979	0,51 ± 0,03 (RSD _{n=15} = 11,3 %)
	10,987	5,598	
	10,639	4,223	
	-	5,285	
	-	4,392	
K Promedio total:			0,53 ± 0,02 (RSD_{n=42} = 10,7 %)

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05. Los valores de "n" corresponden a todas las combinaciones posibles de cocientes i_f/i_b.

Tabla 71. Resultados obtenidos en la estimación del factor K en la ciruela roja.

Muestra	$-i_b$, nA	$-i_f$, nA	K_{promedio}
Ciruela 1	17,985	12,257	0,69 ± 0,04 (RSD $n=15$ = 10,7 %)
	19,286	10,699	
	17,144	12,548	
	16,565	-	
	15,334	-	
Ciruela 2	38,991	22,277	0,62 ± 0,04 (RSD $n=12$ = 9,5 %)
	39,872	26,866	
	36,306	24,497	
	-	22,067	
	-	-	
Ciruela 3	27,144	16,188	0,62 ± 0,02 (RSD $n=12$ = 6,4 %)
	25,742	16,486	
	24,978	16,55	
	-	14,572	
	-	-	
$K_{\text{Promedio total}}$:			0,65 ± 0,02 (RSD $n=33$ = 10,6 %)

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05. Los valores de "n" corresponden a todas las combinaciones posibles de cocientes i_f/i_b .

Tabla 72. Resultados obtenidos en la estimación del factor K en el kiwi verde.

Muestra	$-i_b$, nA	$-i_f$, nA	K_{promedio}
Kiwi 1	26,312	20,122	0,82 ± 0,05 (RSD $n=9$ = 8,4 %)
	25,762	19,545	
	24,365	22,982	
Kiwi 2	28,229	24,543	0,81 ± 0,04 (RSD $n=9$ = 6,8 %)
	27,125	21,877	
	28,487	21,418	
Kiwi 3	27,359	20,693	0,70 ± 0,07 (RSD $n=9$ = 11,3 %)
	24,269	16,978	
	25,435	16,314	
K Promedio total:		0,78 ± 0,03 (RSD $n=27$ =11,3 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05. Los valores de "n" corresponden a todas las combinaciones posibles de cocientes i_f/i_b .

Tabla 73. Resultados obtenidos en la estimación del factor K en la uva blanca.

Muestra	$-i_b$, nA	$-i_f$, nA	K_{promedio}
Uva 1	107,37	68,639	0,60 \pm 0,02 (RSD $_{n=25}$ = 8,4 %)
	111,48	70,754	
	113,71	56,665	
	105,88	68,057	
	110,67	62,644	
Uva 2	68,443	42,915	0,59 \pm 0,03 (RSD $_{n=20}$ = 10,8 %)
	68,669	38,977	
	73,065	40,009	
	68,687	35,123	
	-	41,737	
$K_{\text{Promedio total}}$:		0,59 \pm 0,02 (RSD $_{n=45}$ =9,5 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05. Los valores de "n" corresponden a todas las combinaciones posibles de cocientes i_f/i_b .

Como se puede observar en los datos de las tablas, la determinación de los factores K, tanto en cada pieza de fruta como para cada tipo de fruta, se ha llevado a cabo en general con una buena reproducibilidad como se deduce de los valores de RSD obtenidos. Además, se ha podido comprobar que este factor de corrección se trata de un parámetro característico de cada tipo de fruta, acorde con la singularidad en las propiedades físicas de cada una de ellas.

4.3.5.2. Relación de equivalencia g L⁻¹ - % (m/m)

Como ya se ha comentado, el contenido de glucosa en piezas de fruta se expresa en % (m/m). Sin embargo, cuando el muestreo se realiza, mediante la sonda de microdiálisis, en la pieza de fruta para analizar el contenido de glucosa, no se puede obtener directamente el % (m/m) ya que los calibrados se construyen en unidades de g L⁻¹ y no se conoce el peso de la muestra. Por todo ello, es preciso conocer previamente la equivalencia de la concentración en % para una intensidad de señal de patrón dada. Para estimar la equivalencia g L⁻¹ - % (m/m) es necesario determinar ambas concentraciones de glucosa en la fruta, operando con la fracción batida, de modo que la concentración en g L⁻¹ es determinada empleando el bioanalizador en flujo y la concentración en % se determina con la metodología de amperometría en disoluciones agitadas (InBea), ya que por esta última se conoce previamente el peso de la muestra a analizar.

Cuando se realizaron los análisis con el método de InBea, se construyó en primer lugar un calibrado en el intervalo de concentración comprendido entre $4,5 \times 10^{-3}$ y 9×10^{-3} g L⁻¹ a partir de disoluciones patrón de glucosa. Las muestras de las frutas se prepararon suspendiendo 0,7 g (para la pera, el kiwi y la ciruela) y 0,2 g (para la uva), pesados exactamente, hasta 10 mL con la disolución reguladora de trabajo.

En las **Tablas 74, 75, 76 y 77** se muestran los resultados obtenidos en la estimación de la equivalencia g L⁻¹ - % (m/m) para la concentración de glucosa en las frutas, incluyendo a pie de tabla los valores promediados para cada tipo de fruta. En el caso de la uva blanca se han incluido además los resultados en la determinación del contenido de glucosa en el racimo.

Tabla 74. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en $g L^{-1}$ y en % (m/m) en la pera conferencia.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], $g L^{-1}$	[glucosa] promedio, $g L^{-1}$	[glucosa], %	[glucosa] promedio, %
Pera 1	7,244	7 ± 1 (RSD _{n=3} = 7,8 %)	1,046	$1,0 \pm 0,1$ (RSD _{n=5} = 8,8 %)
	7,602		0,882	
	6,463		0,975	
	-		0,967	
	-		1,116	
Pera 2	6,355	7 ± 1 (RSD _{n=3} = 6,3 %)	1,065	$1,03 \pm 0,06$ (RSD _{n=4} = 3,9 %)
	7,074		1,035	
	7,13		1,046	
	-		0,972	
	-		-	
Pera 3	7,261	$6,9 \pm 0,7$ (RSD _{n=3} = 4,3 %)	0,856	$1,0 \pm 0,1$ (RSD _{n=5} = 10,8 %)
	6,893		0,926	
	6,674		1,122	
	-		0,920	
	-		1,025	
Promedio total	[glucosa], $g L^{-1}$: $7,0 \pm 0,3$ (RSD_{n=9} = 5,8 %)		[glucosa], %: $1,00 \pm 0,05$ (RSD_{n=14} = 8,2 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 75. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en $g L^{-1}$ y en % (m/m) en la ciruela roja.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], $g L^{-1}$	[glucosa] promedio, $g L^{-1}$	[glucosa], %	[glucosa] promedio, %
Ciruela 1	16,559	16 ± 2 (RSD $n=5$ = 8,6 %)	2,053	2,1 ± 0,1 (RSD $n=5$ = 5,4 %)
	17,757		2,249	
	15,785		2,132	
	15,252		2,014	
	14,118		1,962	
Ciruela 2	16,906	17 ± 2 (RSD $n=3$ = 4,8 %)	2,040	2,0 ± 0,2 (RSD $n=5$ = 8,9 %)
	17,288		1,812	
	15,743		2,301	
	-		1,992	
	-		1,992	
Ciruela 3	15,562	15 ± 2 (RSD $n=3$ = 4,1 %)	1,866	2,0 ± 0,3 (RSD $n=5$ = 11,0 %)
	14,776		1,809	
	14,347		1,815	
	-		2,183	
	-		2,265	
Promedio total	[glucosa], $g L^{-1}$: 16,0 ± 0,8 (RSD $n=11$ = 7,5 %)		[glucosa], %: 2,03 ± 0,09 (RSD $n=15$ = 8,2 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 76. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en $g L^{-1}$ y en % (m/m) en el kiwi verde.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], $g L^{-1}$	[glucosa] promedio $g L^{-1}$	[glucosa], %	[glucosa] promedio %
Kiwi 1	25,926	25 ± 2 (RSD $n=3$ = 3,9 %)	3,320	3,5 ± 0,2 (RSD $n=5$ = 3,5 %)
	25,387		3,628	
	24,017		3,605	
	-		3,516	
	-		3,583	
Kiwi 2	25,185	25 ± 2 (RSD $n=3$ = 1,6 %)	3,370	3,5 ± 0,01 (RSD $n=5$ = 2,6 %)
	24,194		3,618	
	25,416		3,539	
	-		3,479	
	-		3,504	
Kiwi 3	28,517	27 ± 4 (RSD $n=3$ = 6,2 %)	3,573	3,9 ± 0,02 (RSD $n=5$ = 5,0 %)
	25,246		3,827	
	26,480		4,110	
	-		3,910	
	-		3,915	
Promedio total	[glucosa], $g L^{-1}$: 25 ± 1 (RSD $n=9$ = 5,2 %)		[glucosa], %: 3,6 ± 0,1 (RSD $n=15$ = 6,0 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 77. Resultados obtenidos en el análisis del contenido de glucosa en g L^{-1} y en % (m/m) en la uva blanca.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], g L^{-1}	[glucosa] promedio, g L^{-1}	[glucosa], %	[glucosa] promedio, %
Racimo	61,153	59 ± 2 (RSD $n=10$ = 4,1 %)	9,418	9,5 ± 0,4 (RSD $n=10$ = 5,5 %)
	62,498		9,080	
	56,113		9,204	
	56,092		9,377	
	59,130		9,182	
	57,302		10,091	
	59,455		9,586	
	56,456		10,796	
	57,168		9,447	
	61,457		9,259	
Uva 1	59,834	61 ± 2 (RSD $n=5$ = 2,9 %)	10,204	9,8 ± 0,5 (RSD $n=5$ = 4,2 %)
	62,117		10,011	
	63,358		9,905	
	59,009		9,207	
	61,667		9,470	
Uva 2	57,206	58 ± 3 (RSD $n=4$ = 3,2 %)	9,511	9,3 ± 0,2 (RSD $n=5$ = 2,4 %)
	57,395		9,827	
	61,073		9,160	
	57,410		9,236	
	-		9,585	
Promedio total	[glucosa], g L^{-1}: 59 ± 1 (RSD $n=19$ = 4,0 %)		[glucosa], %: 9,5 ± 0,2 (RSD $n=20$ = 4,6 %)	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Se han representado los valores promedio de concentración de glucosa determinados en g L^{-1} y % (m/m) medidos con el bioanalizador y el método de InBea, respectivamente, con los correspondientes intervalos de confianza, obteniéndose la correlación que se muestra en la **Figura 129**. El coeficiente r obtenido es de 0,998, indicativo de que se ha obtenido una relación coherente de equivalencia, cuya expresión es:

$$[\text{glucosa}], \% (\text{m/m}) = (0,162 \pm 0,006) \times [\text{glucosa}], \text{g L}^{-1} - (0,2 \pm 0,2)$$

Esta ecuación de correlación es la relación de equivalencia g L^{-1} - % (m/m) y es válida para calcular el contenido de glucosa en las disoluciones patrón o en muestras de frutas batidas expresado en % (m/m).

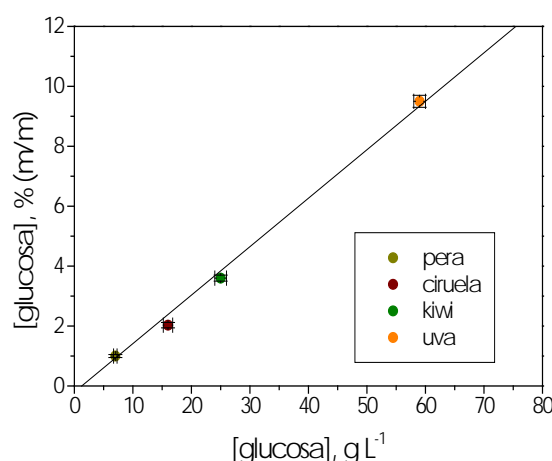


Figura 129. Correlación entre g L^{-1} y % (m/m) de glucosa determinada en la fruta.

La determinación del % de glucosa en la fruta se realizó mediante la medida de la señal analítica de una disolución patrón de glucosa a un nivel de concentración adecuado para cada tipo de fruta, siendo estos valores 7 g L^{-1} para el ensayo con pera conferencia, 16 g L^{-1} para el ensayo con ciruela roja, 25 g L^{-1} para el ensayo con kiwi verde y 59 g L^{-1} para el ensayo con uva blanca. Habiendo comprobado que los calibrados pasan por el punto 0,0, se decidió llevar a cabo calibrados unipuntuales con el fin de disminuir el tiempo de análisis. Para los análisis, se operó introduciendo la sonda de microdiálisis en varios puntos de cada fruta a analizar y se registraron las intensidades de corriente en función del tiempo. El cálculo del % (m/m) de glucosa presente en las frutas, teniendo en cuenta los

valores promedios de K que se recogen en las Tablas 70, 71, 72 y 73, se llevó a cabo a partir de la siguiente expresión (3):

$$[\text{glucosa}], \% (\text{m/m}) = \frac{i_f / K}{i_p} \times [\text{patrón}] \quad (3)$$

Donde " i_f " es la intensidad de corriente correspondiente a la glucosa medida en la pieza de fruta, " i_p " es la intensidad de corriente correspondiente al patrón de glucosa y " K " el factor de corrección a aplicar a la señal registrada para la muestra, característico del tipo de fruta objeto del análisis. La concentración del patrón viene expresada en % (m/m).

Para validar el bioanalizador en flujo manual, se llevó a cabo la determinación del % (m/m) de glucosa en las frutas y se comparó con el método de InBea, ya expuesto anteriormente en este mismo apartado. Los resultados obtenidos con ambos métodos se recogen en las **Tablas 78, 79, 80 y 81**.

Tabla 78. Resultados obtenidos en el análisis del contenido en % (m/m) de glucosa en peras conferencia empleando el bioanalizador de glucosa en flujo desarrollado y mediante la metodología de InBea Biosensores S.L.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], %	[glucosa] promedior %	[glucosa], %	[glucosa] promedior %
Pera (a)	0,834	0,9 ± 0,2 (RSD _{n=3} = 9,6 %)	0,913	0,92 ± 0,02 (RSD _{n=5} = 1,8 %)
	0,813		0,952	
	0,966		0,924	
	-		0,930	
	-		0,910	
Pera (b)	0,960	0,8 ± 0,2 (RSD _{n=4} = 18,1 %)	0,930	0,87 ± 0,04 (RSD _{n=5} = 3,7 %)
	0,665		0,862	
	0,959		0,871	
	0,744		0,856	
	-		0,848	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 79. Resultados obtenidos en el análisis del contenido en % (m/m) de glucosa en kiwis verdes empleando el bioanalizador de glucosa en flujo desarrollado y mediante la metodología de InBea Biosensores S.L.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], %	[glucosa] promedio %	[glucosa], %	[glucosa] promedio %
Kiwi (a)	2,927	3 ± 1 (RSD _{n=3} = 15,2 %)	3,110	3,2 ± 0,1 (RSD _{n=5} = 2,9 %)
	2,730		3,291	
	3,623		3,241	
	–		3,123	
	–		3,073	
Kiwi (b)	3,017	3 ± 1 (RSD _{n=3} = 15,6 %)	3,000	3,1 ± 0,3 (RSD _{n=5} = 7,3 %)
	3,580		3,122	
	2,625		3,208	
	–		2,785	
	–		3,394	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 80. Resultados obtenidos en el análisis del contenido en % (m/m) de glucosa en ciruelas rojas empleando el bioanalizador de glucosa en flujo desarrollado y mediante la metodología de InBea Biosensores S.L.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], %	[glucosa] promedio %	[glucosa], %	[glucosa] promedio %
Ciruela (a)	2,386	2,2 ± 0,3 (RSD _{n=5} = 10,2 %)	2,195	2,2 ± 0,2 (RSD _{n=5} = 8,1 %)
	1,968		2,429	
	2,169		1,947	
	2,571		2,097	
	2,173		2,201	
Ciruela (b)	2,313	2,2 ± 0,2 (RSD _{n=5} = 7,4 %)	1,712	1,9 ± 0,3 (RSD _{n=5} = 12,9 %)
	2,447		1,853	
	1,994		1,822	
	2,238		1,673	
	2,216		2,275	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Tabla 81. Resultados obtenidos en el análisis del contenido en % (m/m) de glucosa en uvas blancas empleando el bioanalizador de glucosa en flujo desarrollado y mediante la metodología de InBea Biosensores S.L.

Método	Bioanalizador en flujo		InBea	
Muestra	[glucosa], %	[glucosa] promedio %	[glucosa], %	[glucosa] promedio %
Uva (a)	10,310	10 ± 1 (RSD _{n=3} = 4,9 %)	9,590	9,6 ± 0,4 (RSD _{n=5} = 3,0 %)
	11,128		9,159	
	10,168		9,940	
	-		9,600	
	-		9,75	
Uva (b)	10,791	11 ± 1 (RSD _{n=3} = 4,6 %)	10,179	10,4 ± 0,8 (RSD _{n=5} = 6,4 %)
	11,574		9,432	
	11,789		10,479	
	-		10,951	
	-		11,108	

Los intervalos de confianza se han calculado para un nivel de significación del 0,05.

Los resultados obtenidos se han validado mediante la comparación estadística de los valores proporcionados por ambas metodologías empleando el método de las rectas de regresión (**Figura 130**). La recta de regresión obtenida tiene un valor de la pendiente de $(1,02 \pm 0,02)$ y de la ordenada en el origen de $(-0,1 \pm 0,1)$, por tanto, los intervalos de confianza de cada parámetro incluyen el 1 y el 0, respectivamente, por lo que se puede afirmar que ambos métodos llevan a resultados estadísticamente iguales. Asimismo, el valor del coeficiente r obtenido es de 0,999, indicativo de una buena correlación de los resultados de concentración de glucosa obtenidos con ambas metodologías.

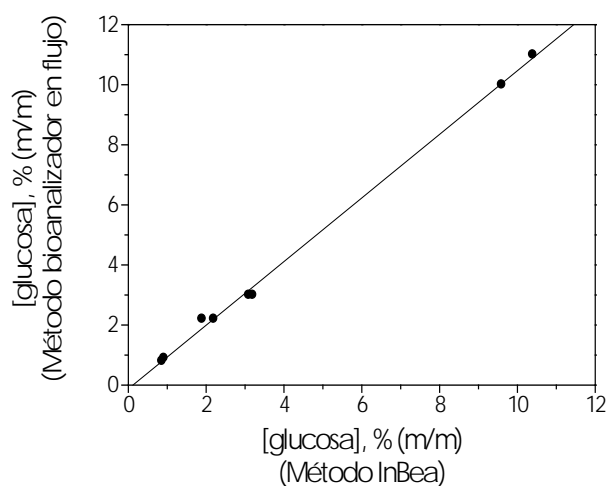


Figura 130. Comparación de los resultados obtenidos en el análisis del contenido en % (m/m) de glucosa empleando el bioanalizador de glucosa desarrollado frente a los obtenidos mediante la metodología de InBea Biosensores S.L.

4.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha demostrado la integración eficaz de una sonda de microdiálisis en un sistema de análisis en flujo continuo con detección amperométrica para la determinación de glucosa en frutas en estado natural, posibilitando llevar a cabo el análisis de este compuesto sin someter la muestra a pretratamiento alguno. Asimismo, se ha desarrollado un método *in vivo* no destructivo que posibilita reducir el tiempo de análisis de manera significativa en comparación con otros métodos de análisis que sí requieren pretratamiento de la fruta. Además, el método desarrollado presenta, en comparación con otros métodos de análisis de glucosa en fruta, características ventajosas en cuanto a simplicidad y bajo coste de la instrumentación. Con respecto al sistema bioanalizador desarrollado, éste presenta unas características operacionales adecuadas para el análisis de glucosa en una gran variedad de frutas gracias al amplio rango lineal de concentraciones obtenido, además de la buena estabilidad mostrada por el biosensor enzimático de glucosa empleado como detector. La sencillez de este método de análisis, así como del diseño del sistema de flujo empleado, hace de este bioanalizador un desarrollo fácil de adaptar a un sistema de análisis automatizado y, por lo tanto, una herramienta analítica atractiva para el análisis de rutina en la industria frutícola.

5. Bibliografía

- [Abbas, 2006]: Abbas, C. A. Chapter 10 "Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts" (2006). "Yeast in Food and Beverages. The Yeast Handbook. Vol. 2". Ed. Querol, A.; Fleet, G. H.
- [Abdel-Rahman, 2013]: Abdel-Rahman, M.; Tashiro, Y.; Sonomoto, K. *Biotechnology Advances*, 31 (2013) 877-902.
- [Alvareda-Sirvent, 2002]: Alvareda-Sirvent, M.; Hart, A. L. *Sensors and Actuators B*, 87 (2002) 73-81.
- [Ang, 2010]: Ang, L. F.; Por, L. Y.; Yam, M. F. *PLOS One*, 10 (3) (2010).
- [Angón-Galván, 2006]: Angón-Galván, P.; Santos-Sánchez, N. F.; Hernández-Carlos, G. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 10 (30) (2006) 3-8.
- [Aoyama, 2004]: Aoyama, C.; Santa, T.; Tsunoda, M.; Fukushima, T.; Kitada, C.; Imai, K. *Biomedical Chromatography*, 18 (2004) 630-636.
- [Arif, 2002]: Arif, M.; Setford, S. J.; Burton, S. K.; Tothill, I. E. *The Analyst*, 127 (2002) 104-108.
- [Armenta, 2008]: Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (6) (2008) 497-511.
- [Arvinte, 2008^A]: Arvinte, A.; Rotariu, L.; Bala, C. *Sensors*, 8 (2008) 1497-1507.
- [Arvinte, 2008^B]: Arvinte, A.; Sesay, A. M.; Virtanen, V.; Bala, C. *Electroanalysis*, 20 (21) (2008) 2355-2362.
- [Arvinte, 2009]: Arvinte, A.; Rotariu, L.; Bala, C.; Gurban, A. M. *Bioelectrochemistry*, 76 (2009) 107-114.
- [Avramescu, 2001]: Avramescu, A.; Noguer, T.; Magearu, V.; Marty, J. L. *Analytica Chimica Acta*, 433 (2001) 81-88.
- [Avramescu, 2002^A]: Avramescu, A.; Noguer, T.; Avramescu, M.; Marty, J. L. *Analytica Chimica Acta*, 458 (2002) 203-213.
- [Avramescu, 2002^B]: Avramescu, A.; Andreescu, S.; Noguer, T.; Bala, C.; Andreescu, D.; Marty, J. L. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374 (2002) 25-32.
- [Badui, 1999]: Badui, S. "Química de los Alimentos". Ed. Pearson Educación. México (1999).
- [Baiulescu, 2000]: Baiulescu, G. E.; Stefan, R. I.; Aboul-Enein, H. Y. (2000). "Quality and Reliability in Analytical Chemistry". Ed. CRC Press.

- [Barret, 2010]: Barret, D. M.; Beaulieu, J. C.; Shewfelt, R. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 (2010) 369-389.
- [Bianchi, 2005]: Bianchi, F.; Careri, M.; Corradini, C. *Journal of Separation Science*, 28 (2005) 898-904.
- [Blum, 2001]: Blum, P.; Mohr, G. J.; Matern, K.; Reichert, J.; Spichiger-Keller, U. E. *Analytica Chimica Acta*, 432 (2001) 269-275.
- [Böhm, 2000]: Böhm, S.; Olthuis, W.; Bergveld, P. *Sensors and Actuators B*, 63 (2000) 201-208.
- [Bokulich, 2013]: Bokulich, N. A.; Bamforth, C. W. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77 (2) (2013) 157-172.
- [Bordonaba, 2009]: Bordonaba, J. G.; Terry, L. A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 8220-8226.
- [Boubriak, 2006]: Boubriak, O. A.; Urban, J. P. G.; Cui, Z. F. *Journal of Membrane Science*, 273 (2006) 77-83.
- [Brányik, 2012]: Brányik, T.; Silva, D. P.; Baszczyński, M.; Lehnert, R.; Almeida e Silva, J. B. *Journal of Food Engineering*, 108 (2012) 493-506.
- [Brezmes, 2001]: Brezmes, J. Tesis Doctoral "Diseño de una nariz electrónica para la determinación del grado de maduración de la fruta", (2001).
- [Bucur, 2006]: Bucur, B.; Mallat, E.; Gurban, A. M.; Gocheva, Y.; Velasco, C.; Marty, J. L.; Noguer, T. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006) 2290-2297.
- [Buglass, 2001]: Buglass, A. J.; Lee, S. H. *Journal of Chromatographic Science*, 39 (2001) 454-458.
- [Buglass, 2003]: Buglass, A. J.; Lee, S. H. *LCGC Asia Pacific*, 6 (4) (2003) 16-22.
- [Buldini, 2000]: Buldini, P. L.; Mevoli, A.; Quirini, A. *Journal of Chromatography A*, 882 (2000) 321-328.
- [Bureau, 2009]: Bureau, S.; Ruiz, D.; Reich, M.; Gouble, B.; Bertrand, D.; Audergon, J. M.; Renard, C. M. G. C. *Food Chemistry*, 115 (2009) 1133-1140.
- [Butz, 2005]: Butz, P.; Hofmann, C.; Tauscher, B. *Journal of Food Science*, 70 (9) (2005) R131-R141.
- [Cabaleiro, 2013]: Cabaleiro, N.; de la Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I. *Analytical Methods*, 5 (2013) 323-340.

- [Cahn, 2013]: Cahn, R. S.; Dermer, O. C. "Recommended Nomenclature for Automatic Analysis" (2013). "Introduction to Chemical Nomenclature". Ed. Butterworth - Heinemann.
- [Campuzano, 2003]: Campuzano, S.; Gálvez, R.; Pedrero, M.; Villena, F. J.; Pingarrón, J. M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (2003) 600-607.
- [Campuzano, 2004]: Campuzano, S.; Loaiza, O. A.; Pedrero, M.; Villena, F. J.; Pingarrón, J. M. *Bioelectrochemistry*, 63 (2004) 199-206.
- [Campuzano, 2005]: Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. *Talanta*, 66 (2005) 1310-1319.
- [Campuzano, 2007]: Campuzano, S.; Gamella, M.; Serra, B.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 49 (2007) e113-e117.
- [Cañizares, 2002]: Cañizares, M. P. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46 (2) (2002) 167-174.
- [Castillo, 2004]: Castillo, J.; Gáspár, S.; Leth, S.; Niculescu, M.; Mortari, A.; Bontidean, I.; Soukharev, V.; Dorneanu, S. A.; Ryabov, A. D.; Csöregi, E. *Sensors and Actuators*, B 102 (2004) 179-194.
- [Castiñeira, 2002]: Castiñeira, A.; Peña, R. M.; Herrero, C.; García-Martín, S. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15 (2002) 319-331.
- [Catarino, 2011]: Catarino, M.; Mendes, A. *Separation and Purification Technology*, 79 (2011) 342-351.
- [Cerdá, 2005]: Cerdá, V.; Estela, J. M. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 85 (2005) 231-253.
- [Cerdá, 2008]: Cerdá, V.; Estela, J. M. Chapter 2 "Injection Techniques in Flow Analysis" (2008). "Advances in Flow Analysis". Ed. WILEY-VCH. Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [Ciosek, 2006]: Ciosek, P.; Brzózka, Z.; Wróblewski, W. *Sensors and Actuators B*, 118 (2006) 454-460.
- [Cox, 2009]: Cox, M. M.; Nelson, D. L. (2009). "Leningher. Principios de Bioquímica". Ed. Omega.
- [Cozzolino, 2009]: Cozzolino, D.; Damberg, R. G. Chapter 14 "Wine and Beer" (2009). "Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control". Ed. Sun D-W. Burlington, M. A.

- [Chailapakul, 2006]: Chailapakul, O.; Ngamukot, P.; Yoosamran, A.; Siangproh, W.; Wangfuengkanagul, N. *Sensors*, 6 (2006) 1383-1410.
- [Chalk, 2008]: Chalk, S. J. Chapter 12 "Flow Analysis and the Internet- Databases, Instrumentation and Resources" (2008). "Advances in Flow Analysis". Ed. WILEY-VCH. Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [Chao, 2011]: Chao, Y. Y.; Lee, C. T.; Wei, Y. T.; Kou, H. S.; Huang, Y. L. *Analytica Chimica Acta*, 702 (2011) 56-61.
- [Chaubey, 2000]: Chaubey, A.; Pande, K. K.; Singh, V. S.; Malhotra, B. D. *Analytica Chimica Acta*, 407 (2000) 97-103.
- [Chaubey, 2002]: Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (2002) 441.
- [Chaurasia, 2007]: Chaurasia, C. S.; Müller, M.; Bashaw, E. D.; Benfeldt, E.; Bolinder, J.; Bullock, R.; Bungay, P. M.; DeLange, E. C. M.; Derendorf, H.; Elmquist, W. F.; Hammarlund-Udenaes, M.; Joukhadar, C.; Kellogg Jr., D. L.; Lunte, C. E.; Nordstrom, C. H.; Rollema, H.; Sawchuk, R. J.; Cheung, B. W. Y.; Shah, V. P.; Stahle, L.; Ungerstedt, U.; Welty, D. F.; Yeo, H. *Pharmaceutical Research*, 24 (5) (2007) 1014-1025.
- [Chew, 2010]: Chew, W.; Sharratt, P. *Analytical Methods*, 2 (2010) 1412-1438.
- [Chinnadayala, 2014]: Chinnadayala, S. R.; Kakoti, A.; Santhosh, M.; Goswami, P. *Biosensors and Bioelectronics*, 55 (2014) 120-126.
- [Chisolm, 2010]: Chisolm, C. N.; Evans, C. R.; Jennings, C.; Black, W. A.; Antosz, F. J.; Qiang, Y.; Diaz, A. R.; Kennedy, R. T. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 7471-7477.
- [Chiu, 2004]: Chiu, H. L.; Lin, H. Y.; Yang, T. C. C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (2004) 445-448.
- [Cho, 1998]: Cho, R. K.; Sohn, M. R.; Kwon, Y. K. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6 (1998) A75-A78.
- [Choengchan, 2006]: Choengchan, N.; Mantim, T.; Wilairat, P.; Dasgupta, P. K.; Motomizu, S.; Nacaprocha, D. *Analytica Chimica Acta*, 579 (2006) 33-37.
- [Darie, 2007]: Darie, N.; Ognean, C. F.; Ognean, M.; Gafita, A.; Petrenciu, O. S. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 13 (2) (2007) 359-362.
- [Das, 2013]: Das, M.; Goswami, P. *Bioelectrochemistry*, 89 (2013) 19-25.

- [Davies, 2000]: Davies, M. I.; Cooper, J. D.; Desmond, S. S.; Lunte, C. E.; Lunte, S. M. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45 (2000) 169-188.
- [Diamantis, 2006]: Diamantis, V.; Melidis, P.; Aivasidis, A. *Analytica Chimica Acta*, 573-574 (2006) 189-194.
- [Dias, 2010]: Dias, A. C. B.; Silva, R. A. O.; Arruda, M. A. Z. *Microchemical Journal*, 96 (2010) 151-156.
- [Doskey, 2001]: Doskey, P. V.; Bialk, H. M. *Environmental Science & Technology*, 35 (2001) 591-594.
- [Dzyadevych, 2008]: Dzyadevych, S. V.; Arkhypova, V. N.; Soldatkin, A. P.; El'skaya, A. V.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. *ITBM-RBM*, 29 (2008) 171-180.
- [Engelhard, 2004]: Engelhard, S.; Löhmannsröben, H. G.; Schael, F. *Applied Spectroscopy*, 58 (10) (2004) 1205-1209.
- [Escarpa, 2012]: Escarpa, A. *The Chemical Record*, 12 (2012) 72-91.
- [Esteves, 2004]: Esteves, V. I.; Lima, S. S. F.; Lima, D. L. D.; Duarte, A. C. *Analytica Chimica Acta*, 513 (2004) 163-167.
- [Esti, 2004]: Esti, M.; Volpe, G.; Micheli, L.; Delibato, E.; Compagnone, D.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Analytica Chimica Acta*, 513 (2004) 357-364.
- [Eyéghé-Bickong, 2012]: Eyéghé-Bickong, H. A.; Alexandersson, E. O.; Gouws, L. M.; Young, P. R.; Vivier, M. A. *Journal of Chromatography B*, 885-886 (2012) 43-49.
- [Ferreira, 2003]: Ferreira, L. S.; De Souza Jr, M. B.; Trierweiler, J. O.; Broxtermann, O.; Folly, R. O. M.; Hitzmann, B. *Computers and Chemical Engineering*, 27 (2003) 1165-1173.
- [Gales, 1990]: Gales, P. W. Chapter 27 "Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists" (1990). "Malt beverages and brewing materials". Ed. Helrick, K.
- [Galignani, 2005]: Galignani, M.; Ayala, C.; Brunetto, M. R.; Burguera, J. L.; Burguera, M. *Talanta*, 68 (2005) 470-479.
- [Gamella, 2008]: Gamella, M.; Campuzano, S.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Analytica Chimica Acta*, 609 (2008) 201-209.
- [Gamella, 2010^A]: Gamella, M.; Campuzano, S.; Conzuelo, F.; Curiel, J. A.; Muñoz, R.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Talanta*, 81 (2010) 925-933.

- [Gamella, 2010^B]: Gamella, M. Tesis Doctoral "Sistemas (bio)sensores para la monitorización de parámetros químicos asociados a la calidad y seguridad alimentaria", (2010).
- [Gamella, 2014]: Gamella, M.; Campuzano, S.; Manso, J.; González de Rivera, G.; López-Colino, F.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Analytica Chimica Acta*, 806 (2014) 1-7.
- [Ghaffar, 2014]: Ghaffar, T.; Irshad, M.; Anwar, Z.; Aqil, T.; Zulifqar, Z.; Tariq, A.; Kamran, M.; Ehsan, N.; Mehmood, S. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7 (2014) 222-229.
- [Girotti, 2000]: Girotti, S.; Muratori, M.; Fini, F.; Ferri, E. N.; Carrea, G.; Koran, M.; Rauch, P. *European Food Research and Technology*, 210 (2000) 216-219.
- [González, 2003]: González, J. Tesis Doctoral "Nuevas aportaciones a la automatización analítica y a la tecnología de las bebidas alcohólicas e industrias derivadas", (2003).
- [González, 2005]: González, V.; García, E.; Ruiz, O.; Gago, L. Informe de Vigilancia Tecnológica "Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria", (2005). (www.madrid.org).
- [Gooding, 2000]: Gooding, J. J. *Grape and Wine Research & Development Corporation*. Final Report (2000).
- [Goriushkina, 2009]: Goriushkina, T. B.; Soldatkin, A. P.; Dzyadevych, S. V. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 6528-6535.
- [Gramsbergen, 2004]: Gramsbergen, J. B.; Skjoth-Rasmussen, J.; Rasmussen, C.; Lambertsen, K. L. *Journal of Neuroscience Methods*, 140 (2004) 93-101.
- [Grassi, 2014]: Grassi, S.; Amigo, J. M.; Lyndgaard, C. B.; Foschino, R.; Casiraghi, E. *Food Chemistry*, 155 (2014) 279-286.
- [Gros, 2000]: Gros, P.; Durliat, H.; Comtat, M. *Electrochimica Acta*, 46 (2000) 643-650.
- [Gros, 2004]: Gros, P.; Comtat, M. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2) (2004) 204-210.
- [Gué, 2002]: Gué, A. M.; Tap, H.; Gros, P.; Maury, F. *Sensors and Actuators B*, 82 (2-3) (2002) 227-232.
- [Gurban, 2006]: Gurban, A. M.; Prieto-Simón, B.; Marty, J. L.; Noguera, T. *Analytical Letters*, 39 (2006) 1543-1558.

- [Guzmán-Vázquez de Prada, 2003]: Guzmán-Vázquez de Prada, A.; Peña, N.; Mena, M. L.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Biosensors and Bioelectronics*, 18 (2003) 1279-1288.
- [Guzmán-Vázquez de Prada, 2004]: Guzmán-Vázquez de Prada, A.; Peña, N.; Parrado, C.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Talanta*, 62 (2004) 896-903.
- [Hansen, 2007]: Hansen, E. H.; Miró, M. *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (1) (2007) 18-26.
- [Hansen, 2009]: Hansen, E. H.; Miró, M. Chapter "Flow Injection Analysis in Industrial Biotechnology" (2009). "Encyclopedia of Industrial Biotechnology". Ed. John Wiley & Sons.
- [Horstkotte, 2008]: Horstkotte, B. Tesis Doctoral "Development of automated methods using syringe based flow analysis techniques and capillary electrophoresis for biotechnological process monitoring and environmental analysis", (2008).
- [Hylton, 2007]: Hylton, K.; Mitra, S. *Journal of Chromatography A*, 1152 (2007) 199-214.
- [I, 2002]: I, T. P.; Smith, R.; Guham, S.; Taksen, K.; Vavra, M.; Myers, D.; Hearn, M. T. W. *Journal of Chromatography A*, 972 (2002) 27-43.
- [Inczedy, 1998]: Inczedy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M. "Compendium of Analytical Nomenclature" 3rd edition. Blackwell Science (1998).
- [Iñón, 2005]: Iñón, F. A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 1549-1561.
- [Iñón, 2006]: Iñón, F. A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. *Analytica Chimica Acta*, 571 (2006) 167-174.
- [Jakubec, 2006]: Jakubec, P.; Bancirova, M.; Halouzka, V.; Lojek, A.; Ciz, M.; Denev, P.; Cibicek, N.; Vacek, J.; Vostalova, J.; Ulrichova, J.; Hrbac, J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2006) 7836-7843.
- [Jämsä-Jounela, 2007]: Jämsä-Jounela, S. L. *Annual Reviews in Control*, 31 (2007) 211-220.
- [Jawaheer, 2003]: Jawaheer, S.; White, S. F.; Rughooputh, S. D. D. V.; Cullen, D. C. *Biosensors and Bioelectronics*, 18 (2003) 1429-1437.
- [Jen, 2006]: Jen, J. F.; Liu, T. C. *Journal of Chromatography A*, 1130 (2006) 28-33.
- [Jia, 2013]: Jia, L. P.; Wang, H. S. *Sensors and Actuators B*, 177 (2013) 1035-1042.

- [Jin, 2008]: Jin, G.; Cheng, Q.; Feng, J.; Li, F. *Journal of Chromatographic Science*, 46 (2008) 276-286.
- [Kader, 2008]: Kader, A. A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (2008) 1863-1868.
- [Karoui, 2010]: Karoui, R.; Downey, G.; Blecker, C. *Chemical Reviews*, 110 (2010) 6144-6168.
- [Kekec, 2014]: Kekec, N. C.; Kanik, F. E.; Udum, Y. A.; Hizliates, C. G.; Ergun, Y.; Toppare, L. *Sensors and Actuators B*, 193 (2014) 306-314.
- [Kelebec, 2009]: Kelebec, H.; Selli, S.; Canbas, A.; Cabaroglu, T. *Microchemical Journal*, 91 (2009) 187-192.
- [Kiba, 1995]: Kiba, N.; Inagaki, J.; Furusawa, M. *Talanta*, 42 (1995) 1751-1755.
- [Kirgöz, 2006]: Kirgöz, Ü. A.; Odaci, D.; Timur, S.; Merkoçi, A.; Alegret, S.; Besün, N.; Telefoncu, A. *Analytica Chimica Acta*, 570 (2006) 165-169.
- [Kotani, 2004]: Kotani, A.; Miyaguchi, Y.; Tomita, E.; Takamura, K.; Kusu, F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 1440-1444.
- [Kritsunankul, 2009]: Kritsunankul, O.; Pramote, B.; Jakmunee, J. *Talanta*, 79 (2009) 1042-1049.
- [Kriz, 2002]: Kriz, K.; Kraft, L.; Krook, M.; Kriz, D. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (12) (2002) 3419-3424.
- [Kueppers, 2003]: Kueppers, S.; Haider, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376 (2003) 313-315.
- [Kumar, 2001]: Kumar, M. A.; Thakur, M. S.; Senthuran, A.; Senthuran, V.; Karanth, N. G.; Hatti-kaul, R.; Mattiasson, B. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17 (2001) 23-29.
- [Kumar, 2011]: Kumar, M. A. Tesis Doctoral "Biosensor and automation for bioprocess monitoring and control", (2011).
- [Kumar, 2012]: Kumar, M. A.; Mazlomi, M. A.; Hedström, M.; Mattiasson, B. *Sensors and Actuators, B* 161 (2012) 855-861.
- [Kutyla-Oleisiuk, 2012]: Kutyla-Oleisiuk, A.; Zaborowski, M.; Prokaryn, P.; Ciosek, P. *Bioelectrochemistry*, 87 (2012) 104-113.
- [Lachenmeier, 2005]: Lachenmeier, D. W.; Frank, W.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Keller, S.; Mörtter, M.; Spraul, M. *European Food Research and Technology*, 220 (2005) 215-221.

- [Lachenmeier, 2007]: Lachenmeier, D. W. *Food Chemistry*, 101 (2007) 825-832.
- [Lachenmeier, 2010]: Lachenmeier, D. W.; Godelmann, R.; Steiner, M.; Ansay, B.; Weigel, J.; Krieg, G. *Chemistry Central Journal*, 4 (5) (2010).
- [Lamberti, 2012]: Lamberti, F.; Luni, C.; Zambon, A.; Serra, P. A.; Giomo, M.; Elvassore, N. *Biomicrofluidics*, 6 024114 (2012).
- [Lange, 2013]: de Lange, E. C. M. Recovery and Calibration Techniques: Toward Quantitative Microdialysis, Müller, M. ed., *Microdialysis in Drug Development*, AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series, American Association of Pharmaceutical Scientists (2013) 13-33.
- [Lapa, 2003]: Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Pinto, I. V. O. S. *Food Chemistry*, 81 (2003) 141-146.
- [Lee, 2009]: Lee, C. A.; Tsai, Y. C. *Sensors and Actuators B*, 138 (2009) 518-523.
- [Li, 2002]: Li, B.; Zhang, Z.; Jin, Y. *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (2002) 585-589.
- [Li, 2008]: Li, Z.; Cui, Z. *Progress in Natural Science*, 18(2008) 503-511.
- [Li, 2013]: Li, L.; Lu, H.; Deng, L. *Talanta*, 113 (2013) 1-6.
- [Lima, 1998]: Lima, J. L. F. C.; Lopes, T. I. M. S.; Rangel, A. O. S. S. *Analytica Chimica Acta*, 366 (1998) 187-191.
- [Lima, 2004]: Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M.; Dias, A. C. B.; Ribeiro, M. F. T.; Zagatto, E. A. G. *Talanta*, 64 (2004) 1091-1098.
- [Limoges, 2006]: Limoges, B.; Marchal, D.; Mavr e, F.; Sav eant, J-M. *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 2084-2092.
- [Lin, 2010]: Lin, T. H.; Huang, J. W.; Kumar, P. V.; Jen, J. F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 4571-4575.
- [Liu, 2001]: Liu, Y. C.; Wang, F. S.; Lee, W. C. *Biochemical Engineering Journal*, 7 (2001) 17-25.
- [Liu, 2006]: Liu, Y.; Ying, Y.; Yu, H.; Fu, X. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 2810-2815.
- [Lowe, 2004]: Lowe, D. P.; Arendt, E. K. *Journal of the Institute of Brewing*, 110 (3) (2004) 163-180.
- [Lowinsohn, 2008]: Lowinsohn, D.; Bertotti, M. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19 (4) (2008) 637-642.

- [Lupu, 2004]: Lupu, A.; Compagnone, D.; Palleschi, G. *Analytica Chimica Acta*, 513 (2004) 67-72.
- [Lupu, 2004]: Lupu, A.; Compagnone, D.; Palleschi, G. *Analytica Chimica Acta*, 513 (2004) 67-72.
- [Luque de Castro, 2005]: Luque de Castro, M. D.; González-Rodríguez, J.; Pérez-Juan, P. *Food Reviews International*, 21 (2) (2005) 231-265.
- [Lvova, 2006]: Lvova, L.; Paolesse, R.; Di Natale, C.; D'Amico, A. *Sensors and Actuators B*, 118 (2006) 439-447.
- [Llario, 2006]: Llario, R.; Iñón, F. A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. *Talanta*, 69 (2006) 469-480.
- [Llorent-Martínez, 2013]: Llorent-Martínez, E. J.; Molina-García, L.; Kwiatkowski, R.; Ruiz-Medina, A. *Talanta*, 109 (2013) 203-208.
- [Ma, 2014]: Ma, C.; Sun, Z.; Chen, C.; Zhang, L.; Zhu, S. *Food Chemistry*, 145 (2014) 784-788.
- [Magwaza, 2012]: Magwaza, L. S.; Opara, U. L.; Nieuwoudt, H.; Cronje, P. J. R.; Saeys, W.; Nicolai, B. *Food Bioprocess and Technology*, 5 (2012) 425-444.
- [Maines, 2000]: Maines, A.; Prodromidis, M. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M.; Karayannis, M. I.; Ashworth, D.; Vadgama, P. *Analytica Chimica Acta*, 408 (2000) 217-224.
- [Manera, 2007]: Manera, M. Tesis Doctoral "Aplicaciones de interés medioambiental, clínico e industrial del análisis por inyección en flujo multiconmutado", (2007).
- [Manino, 1996]: Manino, S.; Cosio, M. S.; Zimei, P. *Electroanalysis*, 8 (4) (1996) 353-355.
- [Manino, 1997]: Manino, S.; Brenna, O.; Buratti, S.; Cosio, M. S. *Electroanalysis*, 9 (17) (1997) 1337-1340.
- [Manso, 2008]: Manso, J.; Mena, M. L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 4007-4012.
- [Manzoli, 2004]: Manzoli, A.; Tomita, I. N.; Fertoni, F. L.; Oliveira-Neto, G.; Mascini, M.; Yamanaka, H. *Analytical Letters*, 37 (9) (2004) 1823-1832.
- [Mao, 2008]: Mao, X-L.; Wu, J.; Ying, Y-B. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36 (12) (2008) 1749-1755.

- [Martínez, 2001]: Martínez, J. R.; Villarino, A. L.; Cobo, J. M. "Cerveza sin alcohol. Sus propiedades". Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (SEDCA) (2001).
- [Mataix, 2001]: Mataix, E.; Luque de Castro, M. D. *Analytica Chimica Acta*, 428 (2001) 7-14.
- [Mato, 2005]: Mato, I.; Suárez-Luque, S.; Huidobro, J. F. *Food Research International*, 38 (2005) 1175-1188.
- [Mato, 2006]: Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T. *Analytica Chimica Acta*, 565 (2006) 190-197.
- [Mato, 2007]: Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T. *Analytica Chimica Acta*, 565 (2007) 190-197.
- [Maya, 2010]: Maya, F.; Estela, J. M.; Cerdá, V. *Talanta*, 81 (2010) 1-8.
- [Mazzei, 2007]: Mazzei, F.; Botrè, F.; Favero, G. *Microchemical Journal*, 87 (2007) 81-86.
- [Megazyme, 2004]: D-gluconic acid/D-glucono-lactone. Assay procedure. Megazyme International Ireland Limited (2004).
- [Mehrvar, 2004]: Mehrvar, M.; Abdi, M. *Analytical Sciences*, 20 (2004) 1113-1126.
- [Melo Ferreira, 2010]: Melo Ferreira, D. C.; Mello, L. D.; Mendes, R. K.; Kubota, L. T. Chapter 11 "Biosensors for fruit and vegetable processing" (2010). "Enzymes in fruit and vegetable processing: Chemistry and Engineering Applications". Ed. CRC Press. Taylor & Francis Group, LLC.
- [Mello, 2002]: Mello, L. D.; Kubota, L. T. *Food Chemistry*, 77 (2002) 237-256.
- [Mentana, 2013]: Mentana, A.; Palermo, C.; Nardiello, D.; Quinto, M.; Centonze, D. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (2013) 61-68.
- [Mignani, 2013]: Mignani, A. G.; Ciaccheri, L.; Mencaglia, A. A.; Ottevaere, H.; Báca, E. E. S.; Thienpont, H. *Sensors and Actuators B*, 179 (2013) 140-149.
- [Miller, 2002]: Miller, J. N.; Miller, J. C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Prentice Hall, Madrid (2002).
- [Miró, 2004]: Miró, M.; Frenzel, W. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (9) (2004) 624-636.
- [Miró, 2005]: Miró, M.; Frenzel, W. *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (4) (2005) 324-333.

- [Miró, 2008]: Miró, M.; Hansen, E. H. Chapter 11 "On-line sample processing methods in flow analysis" (2008). "Advances in Flow Analysis". Ed. WILEY-VCH. Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [Mohns, 1995]: Mohns, J.; Künnecke, W. *Analytica Chimica Acta*, 305 (1995) 241-247.
- [Molinero-Abad, 2014]: Molinero-Abad, B.; Alonso-Lomillo, M. A.; Domínguez-Renedo, O. *Sensors and Actuators B*, 202 (2014) 971-975.
- [Monosik, 2012^A]: Monosik, R.; Stredansky, M.; Greif, G.; Sturdik, E. *Food Control*, 23 (2012) 238-244.
- [Monosik, 2012^B]: Monosik, R.; Stredansky, M.; Greif, G.; Sturdik, E. *Central European Journal of Chemistry*, 10 (1) (2012) 157-164.
- [Monosik, 2012^C]: Monosik, R.; Stredansky, M.; Sturdik, E. *Acta Chimica Slovaca*, 5 (1) (2012) 109-120.
- [Monosik, 2013]: Monosik, R.; Magdolen, P.; Stredanský, M.; Sturdík, E. *Food Chemistry*, 138 (2013) 220-226.
- [Moreira, 2005]: Moreira, J. L.; Santos, L. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 421-425.
- [Moreno i Codinachs, 2008]: Moreno i Codinachs, L.; Kloock, J. P.; Schöning, M., J.; Baldi, A.; Ipatov, A.; Bratov, A.; Jiménez-Jorquera, C. *The Analyst*, 133 (2008) 1440-1448.
- [Nanjo, 2006]: Nanjo, Y.; Yano, T.; Hayashi, R.; Yao, T. *Analytical Sciences*, 22 (2006) 1135-1138.
- [Nicolai, 2007]: Nicolai, B. M.; Beullens, K.; Bobelyn, E.; Peirs, A.; Saeys, W.; Theron, K. I.; Lammertyn, J. *Postharvest Biology and Technology*, 46 (2007) 99-118.
- [Nikolaus, 2008]: Nikolaus, N.; Strehlitz, B. *Microchimica Acta*, 160 (2008) 15-55.
- [Olsson, 2010]: Olsson, G. Chapter "Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology" (2010). "Encyclopedia of Industrial Biotechnology". Ed. John Wiley & Sons.
- [Ough, 1996]: Ough, C. S. Tratado básico de enología. Ed. Acribia (1996).
- [Pais, 2013]: Pais, T. F. M.; Vidigal, S. S. M. P.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S. *Food Control*, 30 (2013) 616-620.

- [Paixao, 2002]: Paixao, T. R. L. C.; Corbo, D.; Bertotti, M. *Analytica Chimica Acta*, 472 (2002) 123-131.
- **Patente ES2351313 A1**: "Dispositivo sumergible de muestreo de compuestos o sustancias presentes en un fluido y procedimiento de muestreo de dichos compuestos o sustancias". Título N. de solicitud: 200801970. Fecha de publicación: 3/02/2011. Entidad titular: Labaqua S.A. Inventores: Julio Llorca Porcel, Lorena Sanjuan Tortosa, Ignacio Valor Herencia, Alicia Fuentes Docón.
- **Patente WO 2002012550 A1**: "Biosensor amperométrico compósito para la determinación de colesterol en alimentos". N. de solicitud: PCT/ES2001/000304. Fecha de publicación: 14/02/2002. País de prioridad: España. Entidad titular: Universidad Complutense de Madrid. Inventores: Nuria Peña García, Ángel Julio Reviejo García, José Manuel Pingarrón Carrazón.
- **Patente WO 2010010211 A3**: "Biosensor amperométrico desechable, método de fabricación del mismo y método de determinación de la presencia de analitos en alimentos". Título N. de solicitud: P200802211. Fecha de prioridad: 24/07/2008. País de prioridad: España. Entidad titular: InBea Biosensores S.L. Inventores: Ángel Julio Reviejo García, José Manuel Pingarrón Carrazón, Susana Campuzano Ruiz, María Gamella Carballo, Valentín Vicente García-Echave, Javier Manso Lorenzo, Ana Guzmán Vázquez de Prada, Francisco Javier Ferrero Martín, Juan Campo Rodríguez, Marta Valledor Llopis.
- [Patz, 2004]: Patz, C. D.; Blieke, A.; Ristow, R.; Dietrich, H. *Analytica Chimica Acta*, 513 (2004) 81-89.
- [Paz, 2010]: Paz, V.; López, B.; Labbé, P.; Solís, V. *Electroanalysis*, 22 (9) (2010) 946-954.
- [Paz, 2011]: Paz, V.; López, B.; Solís, V. *Sensors and Actuators B*, 155 (2011) 75-80.
- [Peinado, 2003]: Peinado, R. A.; Moreno, J. J.; Ortega, J. M.; Medina, M.; Mauricio, J. C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 6198-6203.
- [Peña, 2003]: Peña, N. Tesis Doctoral "Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos", (2003).
- [Pereira, 2010]: Pereira, V.; Câmara, J. S.; Cacho, J.; Marques, J. C. *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 1204-1215.
- [Peres, 2009]: Peres, R. G.; Moraes, E. P.; Micke, G. A.; Tonin, F. G.; Tavares, M. F. M.; Rodriguez-Amaya, D. B. *Food Control*, 20 (2009) 548-552.

- [Pérez, 2012^A]: Pérez, S.; Sánchez, S.; Fábregas, E. *Electroanalysis*, 24 (4) (2012) 967-974.
- [Pérez, 2012^B]: Pérez, S.; Fábregas, E. *Analyst*, 137 (2012) 3854-3861.
- [Pérez-Olmos, 2005]: Pérez-Olmos, R.; Soto, J. C.; Zárata, N.; Araújo, A. N.; Lima, J. L. F. C.; Saraiva, M. L. M. F. S. *Food Chemistry*, 90 (2005) 471-490.
- [Pérez-Ruiz, 2004]: Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Martín, J. *Journal of Chromatography A*, 1026 (2004) 57-64.
- [Pérez-Ruiz, 2005]: Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Iniesta, M. T. *Microchimica Acta*, 149 (2005) 67-72.
- [Peris, 2002]: Peris, M. *Analytica Chimica Acta*, 454 (2002) 1-11.
- [Peuker, 2004]: Peuker, T.; Riedel, M.; Kaiser, C.; Ellert, A.; Lenz, K.; Elsholz, O.; Luttmann, R. *Engineering in Life Sciences*, 4 (2) (2004) 138-143.
- [Pingarrón y Sánchez Batanero, 1999]: Pingarrón, J. M; Sánchez Batanero, P. (1999). "Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones". Ed. Síntesis.
- [Pinho, 2006]: Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O. *Journal of Chromatography A*, 1121 (2006) 145-153.
- [Pinyou, 2011]: Pinyou, P.; Youngvises, N.; Jakmunee, J. *Talanta*, 84 (2011) 745-751.
- [Pisoschi, 2012]: Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Serban, A. I.; Negulescu, G. P. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 671 (2012) 85-91.
- [Pohanka, 2008]: Pohanka, M.; Zboril, P. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (1) (2008) 107-110.
- [Polshin, 2010]: Polshin, E.; Rudnitskaya, A.; Kirsanov, D.; Legin, A.; Saison, D.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R.; Nicolai, B. M.; Lammertyn, J. *Talanta*, 81 (2010) 88-94.
- [Polshin, 2011]: Polshin, E.; Aernouts, B.; Saeys, W.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R.; Saison, D.; Hertog, M.; Nicolai, B. M.; Lammertyn, J. *Journal of Food Engineering*, 106 (2011) 188-198.
- [Pollard, 2001]: Pollard, M. *Organic Process Research & Development*, 5 (2001) 273-282.
- [Pons, 2004]: Pons, C.; Forteza, R.; Cerdá, V. *Analytica Chimica Acta*, 524 (2004) 79-88.
- [Pretorius, 2000]: Pretorius, I. S. *Yeast*, 16 (2000) 675-729.

- [Prodromidis, 2002]: Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. *Electroanalysis*, 14 (4) (2002) 241-261.
- [Prodromidis, 2004]: Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. I. *Journal of Flow Injection Analysis*, 21 (1) (2004) 5-10.
- [p. web 1]: www.masontechnology.ie
- [p. web 2]: www.roche-applied-science.com
- [p. web 3]: www.analytica-world.com
- [p. web 4]: www.dionex.com
- [p. web 5]: www.icsa.es
- [p. web 6]: www.koehlerinstrument.com
- [p. web 7]: www.ionicon.com
- [p. web 8]: www.YSI.com
- [p. web 9]: [www.cerveceros.org/pdf/CE Informe socioeconomico 2014.pdf](http://www.cerveceros.org/pdf/CE_Informe_socioeconomico_2014.pdf) (Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España).
- [p. web 10]: www.aditivos-alimentarios.com
- [p. web 11]: www.gon-cruz.com
- [p. web 12]: www.enologia.com
- [p. web 13]: www.enoforum.com
- [p. web 14]: www.worldbulkwine.com
- [p. web 15]: www.inbea.com/s_productos.php
- [p. web 16]: www.cervezaysalud.es
- [p. web 17]: www.revista.consumer.es
- [p. web 18]: www.oecd.org
- [p. web 19]: <http://www.eicom-usa.com>
- [Queji, 2010]: Queji, M. D.; Wosiacki, G.; Cordeiro, G. A.; Peralta-Zamora, P. G.; Nagata, N. *International Journal of Food Science & Technology*, 45 (2010) 602-609.
- [Quirós, 2009]: de Quirós, A. R. B.; Lage-Yusty, M. A.; López-Hernández, J. *Talanta*, 78 (2009) 643-646.
- [Radoi, 2010]: Radoi, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Analytical Letters*, 43 (2010) 1301-1309.

- [Ragazzo-Sanchez, 2008]: Ragazzo-Sanchez, J. A.; Chalier, P.; Chevalier, D.; Calderon-Santoyo, M.; Ghommidh, C. *Sensors and Actuators B*, 134 (2008) 43-48.
- [Rahman, 2009]: Rahman, M. M.; Shiddiky, M. J. A.; Rahman, M. A.; Shim, Y. B. *Analytical Biochemistry*, 384 (2009) 159-165.
- [Rajendran, 2002]: Rajendran, V.; Irudayaraj, J. *Journal of Dairy Science*, 85 (6) (2002) 1357-1361.
- [Rangel, 2000]: Rangel, A. O. S. S.; Tóth, I. V. *Analytica Chimica Acta*, 416 (2000) 205-210.
- [Rassaei, 2014]: Rassaei, L.; Olthuis, W.; Tsujimura, S.; Sudhölter, E. J. R.; van den Berg, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 123-137.
- [Regmi, 2012]: Regmi, U.; Palma, M.; Barroso, C. G. *Analytica Chimica Acta*, 732 (2012) 137-144.
- [Rhemrev-Boom, 2002]: Rhemrev-Boom, R. M.; Tiessen, R. G.; Jonker, A. A.; Venema, K.; Vadgama, P.; Korf, J. *Clinica Chimica Acta*, 316 (2002) 1-10.
- [Ricci, 2008]: Ricci, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. *IEEE Sensors Journal*, 8 (1) (2008) 63-70.
- [Ródenas, 2006]: Ródenas, E. Tesis Doctoral "Aplicaciones de la multiconmutación en química analítica", (2006).
- [Rovio, 2011]: Rovio, S.; Sirén, K.; Sirén, H. *Food Chemistry*, 124 (2011) 1194-1200.
- [Ruhai, 2012]: Ruhai, A.; Rana, J. S.; Kumar, S.; Kumar, A. *Cellular & Molecular Biology*, 58 (1) (2012) 15-20.
- [Saavedra, 2002]: Saavedra, L.; Barbas, C. *Journal of Chromatography B*, 766 (2002) 235-242.
- [Sandlin, 2005]: Sandlin, Z. D.; Shou, M.; Shackman, J. G.; Kennedy, R. T. *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 7702-7708.
- [Saninni, 2015]: Saninni, A.; Albanese, D.; Malvano, F.; Crescitelli, A.; Di Matteo, M. *Chemical Engineering Transactions*, 44 (2015) 283-288.
- [Santos, 2009]: Santos, J. R.; Segundo, M. A.; Lima, J. L. F. C.; Korn, M. *Microchemical Journal*, 92 (2009) 180-185.
- [Schindler, 1998]: Schindler, R.; Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 362 (1998) 130 - 136.

- [Segundo, 2003]: Segundo, M. A.; Rangel, A. O. S. S. *Analytica Chimica Acta*, 499 (2003) 99-106.
- [Segundo, 2004]: Segundo, M. A.; Lima, J. L. F. C.; Rangel, A. O. S. S. *Analytica Chimica Acta*, 513 (1) (2004) 3-9.
- [Serna, 2009]: Serna, L.; Zetty, A. M.; Ayala, A. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69 (2) (2009) 270-280.
- [Serra, 2007]: Serra, B.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. Chapter 13 "Application of electrochemical enzyme biosensors for food quality control" (2007). "Comprehensive Analytical Chemistry" 49. Ed. Alegret & Merkoçi.
- [Shan, 2010]: Shan, C.; Yang, H.; Han, D.; Zhang, Q.; Ivaska, A.; Niu, L. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 1504-1508.
- [Shaw, 2012]: Shaw, L. H.; Tsai, T. H. *Journal of Chromatography B*, 895-896 (2012) 31-38.
- [Shkotova, 2008]: Shkotova, L. V.; Goriushkina, T. B.; Tran-Minh, C.; Chovelon, J. M.; Soldatkin, A. P.; Dzyadevych, S. V. *Material Science and Engineering C*, 28 (2008) 943-948.
- [Smutok, 2008]: Smutok, O. V.; Dmytruk, K. V.; Karkovska, M. I.; Schuhmann, W.; Gonchar, M. V.; Sibirny, A. A. *Talanta*, 125 (2008) 227-232.
- [Sohrabvandi, 2010]: Sohrabvandi, S.; Mousavi, S. M.; Razavi, S. H.; Mortazavian, A. M. *International Journal of Food Properties*, 13 (2010) 744-759.
- [Sohrabvandi, 2011]: Sohrabvandi, S.; Mortazavian, A. M.; Rezaei, K. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19 (2) (2011) 202-222.
- [Sturm, 2003]: Sturm, K.; Koron, D.; Stampar, F. *Food Chemistry*, 83 (2003) 417-422.
- [Sulyok, 2005]: Sulyok, M.; Miró, M.; Stingeder, G.; Koellensperger, G. *Analytica Chimica Acta*, 546 (2005) 1-10.
- [Takagi, 2010]: Takagi, M.; Yoshioka, H.; Wakitani, S. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109 (1) (2010) 73-74.
- [Tan, 2005]: Tan, L.; Wang, Y.; Liu, X.; Ju, H.; Li, J. *Journal of Chromatography B*, 814 (2005) 393-398.
- [Tap, 2000]: Tap, H.; Gros, P.; Gué, A. M. *Sensors and Actuators B*, 68 (2000) 123-127.

- [Tarkiainen, 2005]: Tarkiainen, V.; Kotiaho, T.; Mattila, I.; Virkajärvi, I.; Aristidou, A.; Ketola, R. A. *Talanta*, 65 (2005) 1254-1263.
- [Terry, 2005]: Terry, L. A.; White, S. F.; Tigwell, L. J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 1309-1316.
- [Tewari, 2008]: Tewari, J. C.; Dixit, V.; Cho, B. K.; Malik, K. A. *Spectrochimica Acta Part A*, 71 (2008) 1119-1127.
- [Thévenot, 2001]: Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. *Biosensors and Bioelectronics*, 16 (2001) 121-131.
- [Tonelli, 2009]: Tonelli, D. Chapter 102 "Methods for Determining Ethanol in Beer" (2009). "Beer in Health and Disease Prevention". Ed. Victor R. Preedy.
- [Torto, 2000]: Torto, N.; Lobelo, B.; Gorton, L. *The Analyst*, 125 (2000) 1379-1381.
- [Torto, 2002]: Torto, N.; Mwatseteza, J.; Sawula, G. *Analytica Chimica Acta*, 456 (2002) 253-261.
- [Trojanowicz, 2013]: Torjanowicz, M. *Modern Chemistry & Applications*, 1 (3) (2013).
- [Tumang, 2001]: Tumang, C. A.; Borges, E. P.; Reis, B. F. *Analytica Chimica Acta*, 438 (2001) 59-65.
- [Ukeda, 1995]: Ukeda, H.; Yamamoto, N.; Sawamura, M.; Kusunose, H. *Analytical Sciences*, 11 (1995) 941-945.
- [Urbano, 2006]: Urbano, M.; Luque de Castro, M. D.; Gómez-Nieto, M. A. *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (1) (2006) 66-76.
- [Usenik, 2008]: Usenik, V.; Fabčić, J.; Stampar, F. *Food Chemistry*, 107 (2008) 185-192.
- [Uturbia, 2012]: Uturbia, A.; Hernández, G.; Roger, J. M. *Journal of Biotechnology*, 159 (2012) 336-341.
- [Valach, 2009]: Valach, M.; Katrlík, J.; Strurdík, E.; Gemeiner, P. *Sensors and Actuators B*, 138 (2009) 581-586.
- [Valcárcel, 2000]: Valcárcel, M.; Cárdenas, M. S. Capítulo V "Automatización integral: Analizadores" (2000). "Automatización y Miniaturización en Química Analítica". Ed. Springer-Verlag Ibérica S.A.
- [Van Staden, 2002]: van Staden, J. F. *Analytica Chimica Acta*, 467 (2002) 61-73.
- [Vargas, 2013]: Vargas, E.; Gamella, M.; Campuzano, S.; Guzmán-Vázquez de Prada, A.; Ruiz, M. A.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Talanta*, 105 (2013) 93-100.

- [Vautz, 2006]: Vautz, W.; Baumbach, J. I.; Jung, J. *Journal of the Institute of Brewing*, 112 (2) (2006) 157-164.
- [Velasco-García, 2003]: Velasco-García, M. N.; Mottram, T. *Biosystems Engineering*, 84 (1) (2003) 1-12.
- [Vidigal, 2008]: Vidigal, S. S. M. P.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O.S. S. *Talanta*, 77 (2008) 494-499.
- [Viljoen, 2006]: Viljoen, B. C. Chapter 4 "Yeast Ecological Interactions. Yeast-Yeast, Yeast-Bacteria, Yeast-Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents" (2006). "Yeast in Food and Beverages. The Yeast Handbook. Vol. 2". Ed. Querol, A.; Fleet, G. H.
- [Vojinović, 2006]: Vojinović, V.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. *Sensors and Actuators, B* 114 (2006) 1083-1091.
- [Vojinović, 2007]: Vojinović, V.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 13 (2) (2007) 103-116.
- [Volschenk, 2006]: Volschenk, H.; van Vuuren, H. J. J.; Viljoen-Bloom, M. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27 (2) (2006) 123-136.
- [Wang, 2003]: Wang, J.; Hansen, E. H. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (4) (2003) 225-231.
- [Workman, 2001]: Workman, J.; Creasy, K. E.; Doherty, S.; Bond, L.; Koch, M.; Ullman, A.; Veltkamp, D. J. *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 2705-2718.
- [Workman, 2005]: Workman, J.; Koch, M.; Veltkamp, D. J. *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 3789-3806.
- [Yang, 2008]: Yang, M.; Wang, J.; Li, H.; Zheng, J. G.; Wu, N. N. *Nanotechnology*, 19 (2008) 1-6.
- [Yao, 2004]: Yao, T.; Yano, T.; Nishino, H. *Analytica Chimica Acta*, 510 (2004) 53-59.
- [Zapata, 2012]: Zapata, J.; Mateo-Vivaracho, L.; Lopez, R.; Ferreira, V. *Journal of Chromatography A*, 1230 (2012) 1-7.
- [Zhu, 2014]: Zhu, J.; Wu, X. Y.; Shan, D.; Yuan, P. X.; Zhang, X. J. *Talanta*, 130 (2014) 96-102.
- [Zotou, 2004]: Zotou, A.; Loukou, Z.; Karava, O. *Chromatographia*, 60 (2004) 39-44.

6. Glosario de abreviaturas

- ADH: alcohol deshidrogenasa.
- AOD: alcohol oxidasa.
- AsOx: ascorbato oxidasa.
- ATR: espectroscopía de reflectancia total atenuada.
- AuE: electrodo de oro.
- AuNPs: nanopartículas de oro.
- BSA: albúmina sérica bovina.
- CFA: análisis en flujo continuo.
- CNTs: nanotubos de carbono.
- CPG: vidrio de poro controlado.
- DLCR: D-lactato citocromo C oxidorreductasa.
- DLDH: D-lactato deshidrogenasa.
- DP: diaforasa.
- DPIP: 2,6-diclorofenol indofenol.
- E_{ap} : potencial aplicado.
- EDC: hidrocloreuro de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
- ELSD: detección de dispersión de luz evaporativa.
- E_r : error relativo.
- Fc: ferroceno.
- FIA: análisis por inyección en flujo.
- FID: detector de ionización de llama.
- FTIR: infrarrojo con transformada de Fourier.
- FT-NIR: espectroscopía de infrarrojo cercano con transformada de Fourier.
- GA: glutaraldehído.
- GC: cromatografía de gases.
- GCE: electrodo de carbono vitrificado.

- GD: difusión gaseosa.
- GOD: glucosa oxidasa.
- HPAEC: cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia.
- HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia.
- HRP: peroxidasa de rábano.
- IC: cromatografía de intercambio iónico.
- IL: intervalo lineal.
- IP: par iónico.
- IPED: detección electroquímica pulsada integrada.
- IR: infrarrojo.
- IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
- LAB: bacterias del ácido láctico.
- LC: límite de cuantificación.
- LD: límite de detección.
- LLDH: L-lactato deshidrogenasa.
- LOD: lactato oxidasa.
- LOV: "lab-on-valve".
- MB: azul de Méldola.
- MCFIA: análisis por flujo multiconmutado.
- MDH: malato deshidrogenasa.
- ME: enzima málica.
- MIR: infrarrojo medio.
- MPA: ácido 3-mercaptopropanoico.
- MPFS: sistema de flujo multibomba.
- MQO: malatoquinona oxidorreductasa.
- M-SFA: análisis en flujo segmentado con multiconmutación.

- MSFIA: análisis por inyección en flujo multijeringa.
- MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple.
- NAD⁺/NADH: forma oxidada y reducida del cofactor dinucleótido de adenina y nicotinamida.
- NADHox: oxidasa de la forma reducida del cofactor NAD⁺.
- NADP⁺: dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato.
- NHS: N-hidroxisuccinimida.
- NIR: infrarrojo cercano.
- NMR: resonancia magnética nuclear.
- PB: azul de Prusia.
- PMS: metasulfato de fenazina.
- POD: enzima peroxidasa.
- PTFE: politetrafluoroetileno.
- PVA-AWP: polivinilalcohol fotopolimerizable soluble en agua.
- PVA-SbQ: polivinilalcohol fotoentrecruzable que contiene grupos stilbazolium.
- PyOx: piruvato oxidasa.
- RI: índice de refracción.
- RP: fase inversa.
- RR: recuperación relativa de analito.
- RS: sal de Reinecke.
- RSD: desviación estándar relativa.
- SAM: monocapa autoensamblada.
- SCE: electrodo de calomelanos saturado.
- SFA: análisis en flujo segmentado.
- SIA: análisis por inyección secuencial.
- SPE: electrodo impreso.

- SWNTs: nanotubos de carbono de pared simple.
- t_{exp} : valor de la t de Student determinado experimentalmente.
- t_{tab} : valor de la t de Student tabulado.
- TTF: tetratiafulvaleno.
- UV: ultravioleta.
- VIS: visible.