



**Desarrollo de un prototipo de laboratorio de biosensor
para la cuantificación de lactosa presente en el
lactosuero residual de la industria láctea, como
alternativa para el monitoreo de sus vertimientos en el
Municipio de Sopó (Cundinamarca)**

Julieth Carolina Montes Forigua

Universidad El Bosque
Facultad de Ingeniería
Programa de Bioingeniería
Bogotá D.C, Colombia
2020

**Desarrollo de un prototipo de laboratorio de biosensor
para la cuantificación de lactosa presente en el
lactosuero residual de la industria láctea, como
alternativa para el monitoreo de sus vertimientos en el
Municipio de Sopó (Cundinamarca)**

Julieth Carolina Montes Forigua

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Bioingeniero

Tutor:

James Guevara Pulido D.Sc

Cotutora:

Lizeth Johanna Vega Medina M.Sc

Universidad El Bosque
Facultad de Ingeniería
Programa de Bioingeniería
Bogotá D.C, Colombia
2020

Dedicada

A Dios y a la Virgen, ya que gracias a sus bendiciones he logrado concluir mi carrera.

A mis padres, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos a pesar de las circunstancias y luchas diarias, lo logramos juntos.

A mis padrinos, por depositar su confianza en mi, creer en mis capacidades y sueños, por apoyarme con recursos para seguir adelante. Al angelito que Dios me envió, quién ha estado conmigo en la salud y en la enfermedad, en la riqueza y en la pobreza, en los triunfos y en las derrotas. Mi angelito, este es un paso más cerca a una vida eterna a tu lado.

A los angelitos que están en el cielo y no pudieron celebrar este logro conmigo, sus inexistencias en el mundo terrenal fueron mi motivo de perseverancia.

Carolina Montes

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a Dios y a la Virgen, quienes han llenado mi vida de bendiciones y a mi familia por estar presente en todo mi proceso académico y formativo.

De igual manera, agradezco a la Universidad El Bosque, a toda la Facultad de Bioingeniería, a mi cotutora Lizeth Johanna Vega Medina M.Sc y, jurados evaluadores, los docentes Francisco Ibla y Brayan Valencia; quienes con sus valiosos conocimientos, paciencia, dedicación y apoyo incondicional hicieron que día a día creciera como profesional.

Finalmente, a mi tutor James Guevara Pulido D.Sc quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo y fue el principal colaborador durante todo este proceso.

Contenido

Agradecimientos	IV
Lista de tablas	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de ecuaciones	XX
Resumen	2
Introducción	3
1 Definición del Problema	6
2 Justificación	10
3 Objetivos	12
3.1 Objetivo general	12
3.2 Objetivos específicos	12
4 Marco Referencial	13
4.1 Marco Teórico	13
4.1.1 Etapa de reconocimiento biológico	13
4.1.2 Etapa de instrumentación	18
4.2 Marco Conceptual	23
4.2.1 Etapa de reconocimiento biológico	25
4.2.2 Etapa de instrumentación	26
4.3 Antecedentes	34
4.3.1 Antecedentes de los métodos tradicionales para la detección o cuantificación de lactosa	35

4.3.2	Antecedentes de los biosensores utilizados para cuantificar el disacárido lactosa o alguno de sus sacáridos	37
4.3.3	Biosensor desarrollado en la actualidad para la cuantificación de lactosa en matrices lácteas (competencia en el mercado)	40
4.4	Marco Geográfico	40
4.4.1	Contexto arqueológico de Sopó	41
4.4.2	Contexto territorial del municipio de Sopó	41
4.4.3	Demografía y división político administrativa del municipio de Sopó	41
4.4.4	Condiciones económicas del municipio de Sopó	42
4.4.5	Condiciones ecosistémicas del municipio de Sopó	44
4.4.6	Sistema Físico Natural de Sopó	44
4.5	Marco Normativo	47
4.5.1	Resolución 631 de 2015, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible	47
4.5.2	Decreto número 616 de 2006, Ministerio de Protección Social	47
5	Metodología	49
5.1	Fase I. Metodología de detección selectiva de lactosa	49
5.1.1	Metodologías implementadas para detección de lactosa	51
5.1.2	Estequiometría de las cantidades del agente hidrolizante y oxidante	51
5.1.3	Selección del agente oxidante	55
5.1.4	Lineamientos de control de calidad analíticos para corroborar la metodología selectiva en lactosuero residual	57
5.2	Fase II. Caracterización del transductor	58
5.2.1	Posibles pares de electrodos que constituyan el electrodo combinado	59
5.2.2	Selección de un par de electrodos	59
5.2.3	Lineamientos de control de calidad analíticos para caracterizar los electrodos grafito-grafito	63
5.3	Fase III. Diseño e implementación del prototipo de laboratorio de biosensor	65
5.3.1	Diseño implementado de un electrodo combinado	65
5.3.2	Levantamiento de requerimientos	68
5.3.3	Diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio	73
5.3.4	Diseño en ingeniería de la etapa instrumental	82
5.3.5	Montaje en protoboard, sistema de dosificación y evaluación de la etapa de instrumentación	91
5.4	Fase IV. Formulación de un protocolo de evaluación del funcionamiento del biosensor	99
5.4.1	Introducción del protocolo a formular	99

5.4.2	Validación de la etapa de reconocimiento biológico	99
5.4.3	Validación de la etapa de instrumentación	101
5.4.4	Evaluación de las etapas en conjunto	102
6	Resultados y Discusión	103
6.1	Fase I. Metodología de detección selectiva de lactosa	103
6.1.1	Selección del agente oxidante	103
6.1.2	Lineamientos de control de calidad analíticos para corroborar la metodología selectiva en lactosuero residual	109
6.2	Fase II. Caracterización del transductor	132
6.2.1	Selección de un par de electrodos	132
6.2.2	Lineamientos de control de calidad analíticos para caracterizar los electrodos grafito-grafito	139
6.3	Fase III. Diseño e implementación del prototipo de laboratorio de biosensor .	149
6.3.1	Levantamiento de requerimientos	149
6.3.2	Diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio . .	151
6.3.3	Diseño en ingeniería de la etapa instrumental	169
6.3.4	Montaje y evaluación de la etapa de instrumentación	174
6.3.5	Montaje y programación del sistema de dosificación de la solución del agente oxidante	180
6.4	Fase IV. Formulación de un protocolo de evaluación del funcionamiento del biosensor	182
6.4.1	Introducción del protocolo a formular	182
6.4.2	Validación de la etapa de reconocimiento biológico	183
6.4.3	Validación de la etapa de instrumentación	185
6.4.4	Evaluación de las etapas en conjunto	190
7	Conclusiones	194
8	Recomendaciones	196
A	Anexo: Levantamiento de Requerimientos.	198
B	Anexo: QFD para el desarrollo del prototipo de laboratorio de biosensor.	206
C	Anexo: Tablas y gráficas, estandarización de la metodología selectiva para detectar lactosa.	207

D Anexo: Tablas y gráficas, caracterización del par de electrodos que permite transformar la señal química en eléctrica.	208
E Anexo: Matriz de decisión para la selección de cada uno de los componentes del prototipo laboratorio de biosensor.	209
F Anexo: Planos técnicos de la estructura funcional del prototipo de laboratorio, luego de su diseño detallado en el software SolidWorks 2018.	215
G Anexo: Simulación o video de la vista explosionada del prototipo de laboratorio de biosensor, SolidWorks 2018.	225
H Anexo: Formatos propuestos en el protocolo para la evaluación del funcionamiento del prototipo de laboratorio de biosensor de manera integra	226
I Anexo: Video funcionamiento paso a paso del prototipo de laboratorio de biosensor de lactosa	227
J Anexo: Manual del usuario.	228
K Bibliografía	261

Lista de Tablas

4-1	Longitud corriente y área de las microcuencas y subcuencas del municipio de Sopó que conforman el Río Bogotá (Ramírez et al., 2018).	45
4-2	Oferta de caudales en la población de Sopó (Ramírez et al., 2018).	45
4-3	Cálculo del Balance Hídrico (Ramírez et al., 2018).	46
5-1	Relación estequiométrica de los compuestos químicos para la hidrólisis de la lactosa y oxidación de la glucosa en términos de relación molar. Fuente: Autor.	52
5-2	Lista de componentes utilizados en el funcionamiento del biosensor. Fuente: Autor.	76
5-3	Sistema de aseguramiento (Tapas de la estructura). Fuente: Autor.	77
5-4	Material de construcción de la estructura. Fuente: Autor.	78
5-5	Método de construcción de la estructura. Fuente: Autor.	80
5-6	Amplificador operacional. Fuente: Autor.	84
5-7	Fuentes de alimentación. Fuente: Autor.	87
5-8	Placa de desarrollo. Fuente: Autor.	88
5-9	Sistema de visualización resultados. Fuente: Autor.	90
5-10	Regulador menú de visualización. Fuente: Autor.	91
5-11	Sistema desplazamiento de jeringa. Fuente: Autor.	93
6-1	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	104
6-2	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CuSO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	105
6-3	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CaCl_2$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	106
6-4	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	109
6-5	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Fuente: Autor.	111

6-6	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Fuente: Autor.	114
6-7	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Fuente: Autor.	117
6-8	ANOVA para la interacción entre los triplicados. Análisis de varianza de la interacción por réplicas, lactosuero residual de queso campesino. Fuente: Autor.	119
6-9	Evaluación de la metodología selectiva, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Fuente: Autor.	120
6-10	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Fuente: Autor.	123
6-11	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Fuente: Autor.	126
6-12	ANOVA para la interacción entre los triplicados. Análisis de varianza de la interacción por réplicas. Lactosuero residual de queso doble crema. Fuente: Autor.	128
6-13	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.	132
6-14	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.	133
6-15	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-cobre. Fuente: Autor.	134
6-16	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con cobre-zinc. Fuente: Autor.	135
6-17	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.	137
6-18	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.	138
6-19	Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 1. Fuente: Autor.	140
6-20	Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Fuente: Autor.	142
6-21	Fase 5. Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Fuente: Autor.	145

6-22 ANOVA para la interacción entre los triplicados. Análisis de varianza de la interacción por réplicas.	147
6-23 Matriz de ponderación para la selección del diseño conceptual que mejor cumple con los requerimientos estipulados por el método QFD. Fuente: Autor. . .	163
6-24 Evaluación de la etapa de instrumentación a partir de la simulación del lactosuero residual mediante la rotación de un potenciómetro. Fuente: Autor. . .	179
6-25 Ficha técnica lactosuero residual queso campesino. Fuente: Autor.	190
6-26 Ficha técnica lactosuero residual queso doble crema. Fuente: Autor.	191

Lista de Figuras

1-1	Árbol del problema, concentración de lactosuero presente en los vertimientos del municipio de Sopó (Cundinamarca).	9
4-1	Estructura molecular de la lactosa basado en Amman & Fransaer, 2010 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.	14
4-2	Hidrólisis de la lactosa. La lactosa actúa como sustrato para la enzima, que permite dar lugar a los azúcares glucosa y galactosa basado en Sánchez, Rosales, & Bustamante, 2015 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.	15
4-3	Estructura química de la glucosa basado en Sosa & Galvis, 2010 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.	16
4-4	Reacción de la glucosa oxidasa basado en Sosa & Galvis, 2010 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.	16
4-5	Reacción del peróxido de hidrógeno a partir de la peroxidasa (Rivas, Baltasar, & Moreno, 2016).	17
4-6	Curva de calibración para lactosa mediante el método analítico tradicional DNS (Campuzano, 2013).	18
4-7	Esquema de los dos electrodos usados para medir pH (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).	19
4-8	Adhesión de las enzimas β -galactosidasa, glucosa oxidasa y peroxidasa por adsorción física simple para detección de lactosa y luego generación de conductividad para cuantificar lactosa (Stoica et al., 2005).	20
4-9	Esquema de los biosensores potenciométricos de glucosa y lactato (Montero, 2019).	21
4-10	Circuito amplificador de la señal de pH (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).	22
4-11	Etapas de inversión y amplificación de la señal de pH (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).	22
4-12	Potencial (pH) a la salida del amplificador LM741 (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).	23
4-13	Elementos y componentes seleccionados de un biosensor típico (Dorothee et al., 2008).	24

4-14 Estructura del biosensor, consta de tres componentes: captura bioespecífica, interfaz química y transductor. La captura bioespecífica es utilizada para la biodetección del analito (Ruíz, 2006).	25
4-15 Estructura biosensor, especificado en la fase de transducción donde se observa sus variables de entrada y salida, como los métodos y materiales. Basado en Ruíz, 2006 y realizado por autoría.	27
4-16 Variables que afectan las reacciones en un electrodo (Bonetto, 2013).	28
4-17 Esquema biosensor electroquímico (Montilla, 2015).	30
4-18 Amplificador operacional 1 (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).	31
4-19 Amplificador operacional 2 (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).	32
4-20 Amplificador operacional 3 (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).	32
4-21 Esquema amplificador instrumental (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).	33
4-22 Esquema general del sistema para adquisición y procesamiento de la señal (Jordá, 2018).	34
4-23 Ubicación del municipio de Sopó en Colombia y detalle con límites intermunicipales, veredales y ubicación del casco urbano (Jaramillo, 2015).	42
4-24 Ubicación del municipio de Sopó en Colombia y detalle con límites intermunicipales, veredales y ubicación del casco urbano (Jaramillo, 2015).	43
4-25 Porcentaje del valor agregado municipal por grandes ramas de actividad económica, basado en DANE, 2015 y realizado por autoría.	43
4-26 Mapa cartográfico del Municipio de Sopó, Cundinamarca (Ramírez et al., 2018).	44
5-1 Fase I. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el primer objetivo por cuatro secciones. Fuente: Autor.	50
5-2 Montaje inicial del electrodo combinado para la evaluación del Sulfato de Cobre (II) como agente oxidante. Fuente: Autor.	56
5-3 Montaje inicial del electrodo combinado que permitió la selección del permanganato de potasio como agente oxidante. Fuente: Autor.	57
5-4 Montaje para corroborar la metodología selectiva en lactosuero residual. Fuente: Autor.	58
5-5 Fase II. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el segundo objetivo por tres secciones. Fuente: Autor.	60
5-6 Montaje de prueba de electrodos. Fuente: Autor.	61
5-7 Montaje para la selección de electrodos. Fuente: Autor.	62
5-8 Montaje para evaluar los electrodos grafito-grafito en matriz simulada de lactosuero. Fuente: Autor.	64
5-9 Fase III. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el tercer objetivo por seis secciones. Fuente: Autor.	66

5-10	Montaje guía electrodo combinado, elaborado para cuantificación de cloruro de potasio y bromuro de potasio. (Pérez, Rincón, & Fuentes, 2014).	67
5-11	Montaje inicial electrodo combinado: electrodo indicador-cátodo (grafito) y electrodo de referencia-ánodo (grafito y agente oxidante). Fuente: Autor. . .	68
5-12	Diagrama de bloques levantamiento de requerimientos. Fuente: Autor.	68
5-13	Diagrama guía método de despliegue de la función calidad (QFD) (Bernal, 2012).	71
5-14	Diagrama de bloques diseño conceptual. Fuente: Autor.	73
5-15	Diagrama de bloques diseño detallado. Fuente: Autor.	75
5-16	Modelado de la estructura del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor. . . .	78
5-17	Primer prototipo de laboratorio en madera MDF. Fuente: Autor.	79
5-18	Construcción de la estructura final del biosensor. Fuente: Autor.	81
5-19	Diagrama de bloques diseño en ingeniería, etapa instrumental. Fuente: Autor.	82
5-20	Montaje de la etapa instrumental del software Proteus a protoboard. Fuente: Autor.	92
5-21	Montaje sistema de dosificación automático, solución del agente oxidante. Fuente: Autor.	94
5-22	Montaje para evaluar la etapa de instrumentación.	97
5-23	Diagrama de flujo, pseudo-código de la etapa instrumental del prototipo de laboratorio de biosensor en placa de desarrollo Arduino Nano. Código en lenguaje C, Software Arduino. Fuente: Autor.	98
5-24	Fase IV. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el cuarto objetivo por cuatro secciones. Fuente: Autor.	100
6-1	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	105
6-2	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CuSO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	106
6-3	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CaCl_2$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	107
6-4	Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.	108
6-5	Montaje para evaluar la metodología selectiva por lineamientos de control de calidad analíticos.	110
6-6	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Fuente: Autor.	111
6-7	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Réplica 1. Fuente: Autor.	112

-
- 6-8** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Réplica 2. Fuente: Autor. 112
- 6-9** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Réplica 3. Fuente: Autor. 113
- 6-10** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Fuente: Autor. 113
- 6-11** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Réplica 1. Fuente: Autor. 115
- 6-12** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Réplica 2. Fuente: Autor. 115
- 6-13** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Réplica 3. Fuente: Autor. 115
- 6-14** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Fuente: Autor. 116
- 6-15** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Réplica 1. Fuente: Autor. 118
- 6-16** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Réplica 2. Fuente: Autor. 118
- 6-17** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Réplica 3. Fuente: Autor. 118
- 6-18** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero doble crema. Triplicado 1. Fuente: Autor. 121
- 6-19** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Réplica 1. Fuente: Autor. 121
- 6-20** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Réplica 2. Fuente: Autor. 122
- 6-21** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Réplica 3. Fuente: Autor. 122
- 6-22** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Fuente: Autor. 123
- 6-23** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Réplica 1. Fuente: Autor. 124
- 6-24** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Réplica 2. Fuente: Autor. 124
- 6-25** Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Réplica 3. Fuente: Autor. 125

6-26	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Fuente: Autor.	125
6-27	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Réplica 1. Fuente: Autor.	127
6-28	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Réplica 2. Fuente: Autor.	127
6-29	Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Réplica 3. Fuente: Autor.	127
6-30	Fase 1. Metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual: Hidrólisis del disacárido lactosa en glucosa y galactosa mediante el agente hidrolizante (<i>HCl</i>). Fuente: Autor.	130
6-31	Fase 2. Metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual: Oxidación del monosacárido glucosa a ácido glucónico mediante el agente oxidante (<i>KMnO₄</i>). Fuente: Autor.	131
6-32	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.	133
6-33	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.	134
6-34	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-cobre. Fuente: Autor.	135
6-35	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con cobre-zinc. Fuente: Autor.	136
6-36	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.	137
6-37	Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.	138
6-38	Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor <i>KMnO₄</i> en lactosa pura. Triplicado 1. Fuente: Autor.	139
6-39	Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor <i>KMnO₄</i> en lactosa pura. Triplicado 1. Réplica 1. Fuente: Autor.	140
6-40	Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor <i>KMnO₄</i> en lactosa pura. Triplicado 1. Réplica 2. Fuente: Autor.	141

6-41 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 1. Réplica 3. Fuente: Autor.	141
6-42 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Fuente: Autor.	142
6-43 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Réplica 1. Fuente: Autor.	143
6-44 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Réplica 2. Fuente: Autor.	143
6-45 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Réplica 3. Fuente: Autor.	144
6-46 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Fuente: Autor.	145
6-47 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Réplica 1. Fuente: Autor. . . .	146
6-48 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Réplica 2. Fuente: Autor. . . .	146
6-49 Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Réplica 3. Fuente: Autor. . . .	146
6-50 Diseño 1. Caja gris. Fuente: Autor.	153
6-51 Diseño 1. Diseño conceptual. Fuente: Autor.	153
6-52 Diseño 2. Caja gris. Fuente: Autor.	154
6-53 Diseño 2. Diseño conceptual. Fuente: Autor.	154
6-54 Diseño 3. Caja gris. Fuente: Autor.	156
6-55 Diseño 3. Diseño conceptual. Fuente: Autor.	156
6-56 Diseño 4. Caja gris. Fuente: Autor.	157
6-57 Diseño 4. Diseño conceptual. Fuente: Autor.	157
6-58 Diseño 5. Caja gris. Fuente: Autor.	158
6-59 Diseño 5. Diseño conceptual. Fuente: Autor.	158

6-60 Diseño 6. Caja gris. Fuente: Autor.	159
6-61 Diseño 6. Diseño conceptual. Fuente: Autor.	159
6-62 Diseño 7. Caja gris. Fuente: Autor.	160
6-63 Diseño 7. Diseño conceptual, cara externa. Fuente: Autor.	161
6-64 Diseño 7. Diseño conceptual, cara interna. Fuente: Autor.	161
6-65 Construcción en madera MDF del modelado inicial del diseño. Fuente: Autor.	166
6-66 Diseño detallado en SolidWorks 2018 para Windows. Fuente: Autor.	167
6-67 Diseño detallado en SolidWorks 2018 para Windows. Fuente: Autor.	167
6-68 Plano técnico, recipiente removible. Diseño detallado en SolidWorks 2018. Fuente: Autor.	168
6-69 Prototipo de laboratorio. Diseño detallado construido por impresión 3D. Fuente: Fuente: Autor.	169
6-70 Montaje etapa de instrumentación completa del prototipo de laboratorio de biosensor final en el software Proteus 8 Professional, formato ISIS. Fuente: Autor.	170
6-71 Montaje en protoboard del sistema de amplificación de la señal útil. Fuente: Autor.	172
6-72 Montaje etapa de instrumentación completa en el software Proteus 8 Profes- sional, formato ARES. Fuente: Autor.	172
6-73 Simulación de la visualización del menú para interacción del biosensor con el usuario, software Proteus Professional 2018, formato ISIS. Fuente: Autor. . .	173
6-74 Visualización del menú para interacción del biosensor con el usuario. Montaje en Protoboard de la etapa de instrumentación. Fuente: Autor.	174
6-75 Prototipo de laboratorio de biosensor final, cara frontal etapa de instrumen- tación en Protoboard de la etapa de instrumentación implementado en lacto- suero residual. Fuente: Autor.	175
6-76 Visualización primera opción del menú mediante la pantalla LCD ubicada en la etapa instrumental del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor.	176
6-77 Visualización segunda opción del menú mediante la pantalla LCD ubicada en la etapa instrumental del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor.	176
6-78 Visualización tercera opción del menú mediante la pantalla LCD ubicada en la etapa instrumental del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor.	177
6-79 Prototipo de biosensor para la cuantificación de lactosa. Diseño detallado construido por impresión 3D. Fuente: Autor.	178
6-80 Evaluación de la etapa de instrumentación a partir de la simulación del lac- tosuero residual mediante la rotación de un potenciómetro.	178

6-81	Sistema de dosificación automático, etapa de reconocimiento, prototipo de laboratorio de biosensor, visualización interna.Fuente: Autor.	180
6-82	Sistema de dosificación automático, etapa de reconocimiento, prototipo de laboratorio de biosensor, visualización externa.	181
6-83	Diagrama de flujo, protocolo de validación de la etapa de reconocimiento biológico. Fuente: Autor.	183
6-84	Formato inventario de los componentes de reconocimiento biológico. Fuente: Autor.	184
6-85	Diagrama de flujo, protocolo de validación del electrodo combinado acoplado al transductor. Fuente: Autor.	185
6-86	Formato inventario de los componentes que conforman el transductor. Fuente: Autor.	186
6-87	Diagrama de flujo, protocolo de validación del sistema de acondicionamiento de la señal útil. Fuente: Autor.	187
6-88	Diagrama de flujo, protocolo de validación del sistema de procesamiento de la señal útil. Fuente: Autor.	188
6-89	Formato inventario de los componentes que conforman el sistema de amplificación de la etapa de instrumentación. Fuente: Autor.	188
6-90	Formato inventario de los componentes que conforman el sistema de acondicionamiento de la etapa de instrumentación. Fuente: Autor.	189
6-91	Matriz sensibilidad y especificidad. Fuente: Autor.	192

Lista de ecuaciones

4-1 Ecuación de una reacción redox	20
4-1 Ecuación de Nernst	20
4-2 Ecuación amplificación instrumental	31
4-3 Ecuación amplificación instrumental	32
4-4 Ecuación amplificación instrumental	33
5-1 Ecuación número de moles	53
5-2 Ecuación de molaridad	53
5-3 Ecuación moles (0.05 g de lactosa)	53
5-4 Ecuación Molaridad (0.05 g de lactosa)	53
5-5 Ecuación Agente Hidrolizante (gramos)	53
5-6 Ecuación Agente Hidrolizante (miligramos)	54
5-7 Ecuación $KMnO_4$ (gramos)	54
5-8 Ecuación $KMnO_4$ (miligramos)	54
5-9 Ecuación amplificador no inversor	85
5-11 Ecuación para el cálculo de resistencia	85
5-12 Ecuación resistencias divisor de voltaje	85
5-13 Ecuación pasos del motor	95
5-14 Ecuación relación mililitros de dosificación-pasos del motor	96
6-1 Ecuación exactitud	192
6-2 Ecuación precisión	192
6-3 Ecuación sensibilidad	193
6-4 Ecuación especificidad	193

Resumen

En el presente proyecto de grado cuyo objetivo es desarrollar un prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual de la industria láctea del Municipio de Sopó (Cundinamarca), se vio la necesidad de monitorear la lactosa de manera más efectiva a comparación de los métodos tradicionales, para asegurar una mejor calidad de sus vertimientos según la legislación colombiana.

Se partió de establecer una metodología selectiva para la detección de lactosa por medio de la búsqueda, evaluación y selección de los agentes químicos mediante la aplicación de cálculos estequiométricos, dando como resultado la selección del ácido clorhídrico como agente hidrolizante y del permanganato de potasio como agente oxidante. Continuo a ello, se caracterizó el tipo de transductor que trasforma la señal generada por la reacción química en eléctrica a través de la evaluación de cuatro posibles pares de electrodos, quedando seleccionados los electrodos grafito-grafito. Estas dos fases fueron evaluadas por lineamientos de control de calidad analíticos y analizadas por el método estadístico ANOVA en muestras de lactosuero residual de queso campesino, queso doble crema y en una matriz simulada de lactosuero.

Posteriormente, se diseñó e implementó un prototipo de laboratorio de biosensor a partir del levantamiento de requerimientos del usuario clasificados en técnicos, funcionales y de calidad, todos estos evaluados en matrices de decisión para la selección de componentes requeridos en la construcción del prototipo, a excepción de los requisitos técnicos que además se evaluaron por el método QFD. Con lo anterior se realizó y seleccionó un bosquejo de la estructura del prototipo y se llevó a detalle en CAD, brindando sus planos técnicos para impresión 3D. Luego se llevó a acabo el diseño, montaje y programación de un amplificador operacional y de un sistema de dosificación unido a un Arduino Nano, todo esto fue evaluado a partir de un potenciómetro como simulador del lactosuero residual a estudiar. Finalizando, con la formulación de un protocolo de evaluación del funcionamiento del biosensor que contiene la introducción, validación de la etapa de reconocimiento e instrumentación, además de la evaluación del desempeño de una tecnología que le apuesta a la innovación de biosensores que cuantifiquen lactosa en aguas residuales.

Palabras clave: Etapa instrumental, Etapa reconocimiento, Ingeniería del detalle, Lactosa, Lactosuero, Metodología selectiva, Prototipo biosensor.

Abstract

In the present project of degree whose objective is to develop a prototype laboratory of biosensor for the quantification of lactose present in the residual whey of the dairy industry of the Municipality of Sopó (Cundinamarca), it was necessary to monitor lactose more effectively in comparison with traditional methods, in order to ensure a better quality of its discharges according to Colombian legislation.

The objective was to establish a selective methodology for the detection of lactose through the search, evaluation and selection of chemical agents through the application of stoichiometric calculations, resulting in the selection of hydrochloric acid as a hydrolysing agent and potassium permanganate as an oxidising agent. Continuous to this, was characterized the type of transducer that transforms the signal generated by the chemical reaction into electric through the evaluation of four possible pairs of electrodes, being selected the graphite-graphite electrodes. These two phases were evaluated by analytical quality control guidelines and analyzed by the statistical method ANOVA in samples of residual whey from peasant cheese, double cream cheese and in a simulated whey matrix.

Subsequently, a prototype biosensor laboratory was designed and implemented from the survey of user requirements classified in technical, functional and quality, all these evaluated in decision matrices for the selection of components required in the construction of the prototype, with the exception of the technical requirements which were also evaluated by the QFD method. With the above a sketch of the prototype structure was made and selected and carried out in detail in CAD, providing its technical drawings for 3D printing. Then the design, assembly and programming of an operational amplifier and a dosing system attached to an Arduino Nano were carried out, all this was evaluated from a potentiometer as a simulator of the residual whey to study. Concluding, with the formulation of a protocol for evaluating the functioning of the biosensor containing the introduction, validation of the recognition and instrumentation stage, in addition to evaluating the performance of a technology that relies on the innovation of biosensors that quantify lactose in wastewater.

Keywords: Biosensor prototype, Detail engineering, instrumental stage, Lactose, Recognition stage, Selective methodology, Whey.

Introducción

La mayoría de la contaminación de las fuentes hídricas en el municipio de Sopó (Cundinamarca), se origina por los vertimientos de las varias industrias lácteas que funcionan allí; considerándose hoy en día como una de las problemáticas ambientales más relevantes, debido a que, del volumen de las aguas residuales generado por una empresa láctea, aproximadamente entre el 85 o 90 % hace parte de las concentraciones de lactosuero residual (Shareaholic, 2014).

El lactosuero es el contaminante de mayor importancia en los vertimientos de las industrias lácteas, ya que de los compuestos químicos que lo conforman cerca del 95 % es lactosa; siendo esta un azúcar insoluble, no edulcorante y, por ende, no absorbida por los entes biológicos, como lo es el ser humano, los animales y el medio ambiente (Ruíz & Garcés, 2007). Además, se considera que de 82 millones de toneladas métricas de vertimientos producidos mundialmente por las industrias lácteas, el 47 % corresponde al lactosuero, un desecho que es vertido a las fuentes hídricas sin conocer de manera selectiva y confiable la cuantificación de la lactosa como compuesto contaminante y, por lo tanto, sin ningún tratamiento para prevenir el daño de los ecosistemas y de la salud de los entes biológicos (Correa & Mosquera, 2015).

El alto nivel de contaminación de dichos vertimientos de las industrias lácteas, es originado por la aplicación de métodos inadecuados de monitoreo previo del lactosuero residual y que actualmente consisten en la cuantificación de la lactosa presente en el lactosuero mediante métodos analíticos tradicionales, con limitaciones en cuanto a sensibilidad, poca especificidad, costos y tratamientos exhaustivos de la muestra (Jiménez & León, 2009). Por otro lado, existen dos normativas por parte del Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible y del Ministerio de Protección Social que obligan a las empresas lácteas a cumplir con un límite permisible de lactosa presente en el lactosuero residual, el cual debe ser menor a 5 g/dL , es decir, inferior a 400 mg de lactosa (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015), (Ministerio de protección social, 2006).

Es por lo anterior, que las industrias lácteas están enfrentadas a dos situaciones: en primer lugar, tienen la obligación de cumplir con la actual norma colombiana, porque están bajo el riesgo de ser sancionadas o penalizadas y; en segundo lugar, al no contar con datos oportunos y periódicos sobre la presencia real de la lactosa en los vertimientos, desconocen el grado de afectación de los entes biológicos y ecosistemas.

Por lo tanto, frente a este panorama se reconoció la necesidad de encontrar un método que permita

a las empresas de las industrias lácteas cuantificar la lactosa presente en el lactosuero residual de manera automatizada, continua, en menor tiempo, confiable y ambientalmente más efectiva para asegurar una mejor calidad de los vertimientos de las industrias lácteas cumpliendo la normatividad vigente (Jiménez & León, 2009). En la definición del método de cuantificación, los biosensores son una herramienta viable, para el monitoreo de aguas residuales; en particular, los biosensores electroquímicos, ya que permiten registrar medidas con muestras de mínimo volumen o en zonas reducidas, al igual que presentan unos límites de detección suficientes para muestras de interés analítico, y un intervalo de respuesta más amplio que la mayoría de sensores químicos basados en otros principios (Alegret, Del Valle, & Merkoci, 2004).

Todo lo anterior, conllevó al desarrollo del objetivo general del trabajo de grado, el cual consistió en desarrollar un prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual de la industria láctea, como alternativa para el monitoreo de sus vertimientos en el Municipio de Sopó (Cundinamarca); a través del cumplimiento de cuatro objetivos específicos. Dicha solución a la problemática descrita, se encuentra en el ámbito del trabajo profesional de un Bioingeniero, puesto que se requirió del conocimiento conceptual y práctico de las áreas integradas de química, ecosistemas, electrónica, sensórica, control y análisis de señales; y está dentro del foco misional relación hombre-agua del programa de Bioingeniería de la Universidad El Bosque.

Por consiguiente, dentro del desarrollo del trabajo de grado, se realizó una amplia revisión bibliográfica acerca de los antecedentes; composición, funcionamiento químico y electrónico de un biosensor; transductores electroquímicos; generalidades y aplicación del grafito como material conductor; generalidades, composición química y métodos tradicionales para cuantificación de lactosa y glucosa en laboratorio y en presencia de lactosuero residual. También se revisó dos normativas aplicables a los sistemas de medición y límite de lactosa presente en el lactosuero residual de los vertimientos generados por las industrias lácteas. Y finalmente, para la ejecución del trabajo, se definió una metodología consistente en cuatro fases donde cada fase está orientada al cumplimiento de uno de los objetivos específicos del proyecto, cuyos resultados se validaron con lineamientos de control de calidad analíticos y con lo planteado en la revisión bibliográfica.

1. Definición del Problema

En el municipio de Sopó (Cundinamarca) la contaminación de las fuentes hídricas se da en su mayoría por los vertimientos de las actividades industriales y agropecuarias, en especial de las industrias lácteas; considerado hoy en día como una de las problemáticas ambientales más relevantes, ya que el volumen de las aguas residuales generado por una empresa láctea puede oscilar entre 2 y 6L/L de leche procesada, de los cuales aproximadamente el 85 o 90 % hace parte de la concentración de lactosuero (Shareaholic, 2014).

Motivo que es corroborado según lo expresado por la industria láctea Alpina S.A en 2013, indicando que Sopó y seis municipios más constituyen la subcuenca hidrográfica del Río Teusacá, mediante el cual estos municipios se abastecen para consumo y otras actividades y, vierten sus aguas residuales en la mayoría de los casos sin tratamiento previo, lo que genera impactos negativos sobre este cuerpo de agua (Alpina S.A, 2013).

Además, de acuerdo al artículo publicado en el periódico El Tiempo en 2016, *“Contaminación acesa a Tocancipá y Sopó. A Tocancipá y Sopó la ronda ahora una crisis ambiental. Las autoridades sanitarias de esos municipios sabaneros advirtieron sobre la creciente contaminación de sus fuentes de agua y los riesgos para la salud de sus comunidades”*, se habla del asentamiento de 30 empresas, de las cuales la mayoría no tienen un riguroso tratamiento de aguas residuales; dato afirmado por la Corporación Autónoma Regional (CAR), quien indica que 10 de esas industrias no tienen permiso de vertimientos porque no cumplen con los requisitos ambientales y están afectando a las quebradas La Chucua y Mi Padre Jesús, que desembocan en los ríos Teusacá y Bogotá, y el embalse de Tibitó (Tiempo, 2016).

Por otro lado, la dirección del Hospital de Sopó envió una carta a la administración de ese municipio, en la que denunciaba el deterioro ambiental y le señaló el aumento de pacientes afectados por brotes de la piel y enfermedades gastrointestinales. Mientras, que dirigentes de Briceño señalan que antes era posible el uso de las aguas en tareas domésticas y para el ganado y, ahora se le da de beber de esa agua al ganado y se mueren (Tiempo, 2016).

El lactosuero se obtiene a partir de la fabricación del queso, es decir, cuando a la leche líquida se le añade el cuajo cuyo resultado es una masa semi sólida rica en caseína y grasa, la cual una vez retirada forma un líquido de color amarillo verdoso y de sabor ácido pero agradable. Sin embargo, el lactosuero como desecho de la industria láctea, es considerado un contaminante al ser vertido,

ya que, con una producción mundial de 82 millones de toneladas métricas, es el principal residuo de las industrias lácteas, en donde por cada kilogramo de queso se genera nueve litros de dicho efluente contaminante y se considera que el 47 % es tratado como un desecho vertido directamente a las fuentes hídricas (Correa & Mosquera, 2015).

Del mismo modo, los componentes principales del lactosuero son lactosa, calcio, sales minerales y proteínas lactoséricas de bajo peso molecular, en donde, el 55 % son retenidos debido a que no reaccionan con el cuajo y, por ende, son desechados. Por lo tanto, en términos de masa, el lactosuero contiene cerca del 50 % de sólidos totales de la leche, 25 % de proteínas, 7 % de grasa y cerca del 95 % de lactosa, además de contener cerca del 50 % de minerales. Siendo la lactosa un azúcar insoluble, no edulcorante y, por ende, no absorbida por los entes biológicos, como lo es el humano, los animales y el medio ambiente (Ruíz & Garcés, 2007).

La lactosa en forma hidrolizada es considerada un compuesto fundamental para todas las formas de vida, sin embargo, pequeños cambios en sus concentraciones y ningún proceso de descomposición previo pueden afectar en gran medida las condiciones de vida de los animales y plantas (Espinosa, León, & Rodríguez, 2013). Por ende, la lactosa es transformada en contaminante cuando el lactosuero es arrojado al ambiente con un mínimo índice de tratamiento de oxígeno disuelto en el agua, afectando los ecosistemas acuáticos y la reducción en la calidad del suelo, es decir, puede provocar acidez, eutrofización, incorporación de niveles tóxicos y lixiviación (Ruíz & Garcés, 2007). Lo cual, lleva a afectar de manera indirecta la sobrevivencia, crecimiento y capacidad reproductiva de algunos animales y riesgos para el ser humano por la ingesta o por contacto directo con toxinas, generadas por las floraciones de cianobacterias en ambientes eutrofizados (Cárdenas & Sánchez, 2013).

Por esto, es que han surgido varios métodos tradicionales para la determinación de lactosa, como lo son determinaciones gravimétricas, volumétricas y colorimétricas con niveles de sensibilidad limitados y con poca especificidad y, aunque constituyen herramientas robustas, reproducibles y con capacidad de alcanzar buenos niveles de detección, son costosos e implican tratamientos muy exhaustivos de la muestra (Jiménez & León, 2009). En especial, para la cuantificación de lactosa en aguas residuales se utiliza el método de DNS, pero presenta un porcentaje de error elevado, ya que no puede cuantificar el grado de hidrólisis de la lactosa, ya que ambos monosacáridos presentan coloración al reaccionar con el DNS, lo que genera un ruido y una imposibilidad de saber cuál de las dos biomoléculas se está cuantificando y no se puede saber con exactitud la cantidad de lactosa remanente luego de la hidrólisis (Campuzano, 2013).

Por otra parte, el primero de enero de 2016 entró en vigencia la Resolución 631 de 2015 como nueva norma de vertimiento nacional, expedida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, *"por la cual se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en los vertimientos puntuales a cuerpos de agua superficiales y a sistemas de alcantarillado público a nivel nacional, teniendo por objeto reducir y controlar la descarga de sustancias contaminantes, mediante 56*

parámetros que definen las características de los diferentes tipos de vertimientos según la actividad desarrollada y estableciendo como obligación del Estado, proteger la diversidad e integridad del ambiente, prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, imponer las sanciones legales y exigir la reparación de los daños causados” (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015).

Por consiguiente, el problema actual es que, para el monitoreo de los vertimientos de las industrias lácteas, se debe realizar previamente la cuantificación de la lactosa por métodos analíticos tradicionales, los cuales como se mencionaba anteriormente presentan limitaciones en niveles de sensibilidad, poca especificidad, costosos y tratamientos muy exhaustivos de la muestra, generando problemáticas posteriores al no asegurar una buena calidad del vertimiento (Jiménez & León, 2009). Lo cual tiene dos efectos indeseados: en primer lugar, las industrias se ven amenazadas frente a la necesidad de cumplir con la actual norma colombiana y corren un alto riesgo de ser sancionadas o tener penas legales por el incumplimiento de la misma, es decir, por sobrepasar el límite permisible de 5 g/dL de concentración de lactosa presente en el lactosuero residual de los vertimientos de las industrias lácteas (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015), (Ministerio de protección social, 2006); en segundo lugar, al no contar con datos concretos de la lactosa, se desconoce el nivel de afectación de los ecosistemas tan graves como se mencionaron en párrafos anteriores.

Frente a este panorama se ve la necesidad de buscar un mecanismo que permita cuantificar la lactosa presente en el lactosuero residual en el menor tiempo posible a su generación. A continuación, en la Figura 1-1 se presenta el árbol del problema en donde se evidencian causas y efectos de las limitaciones en la cuantificación de la lactosa presente en el lactosuero residual de los vertimientos de la industria láctea en el municipio de Sopó.

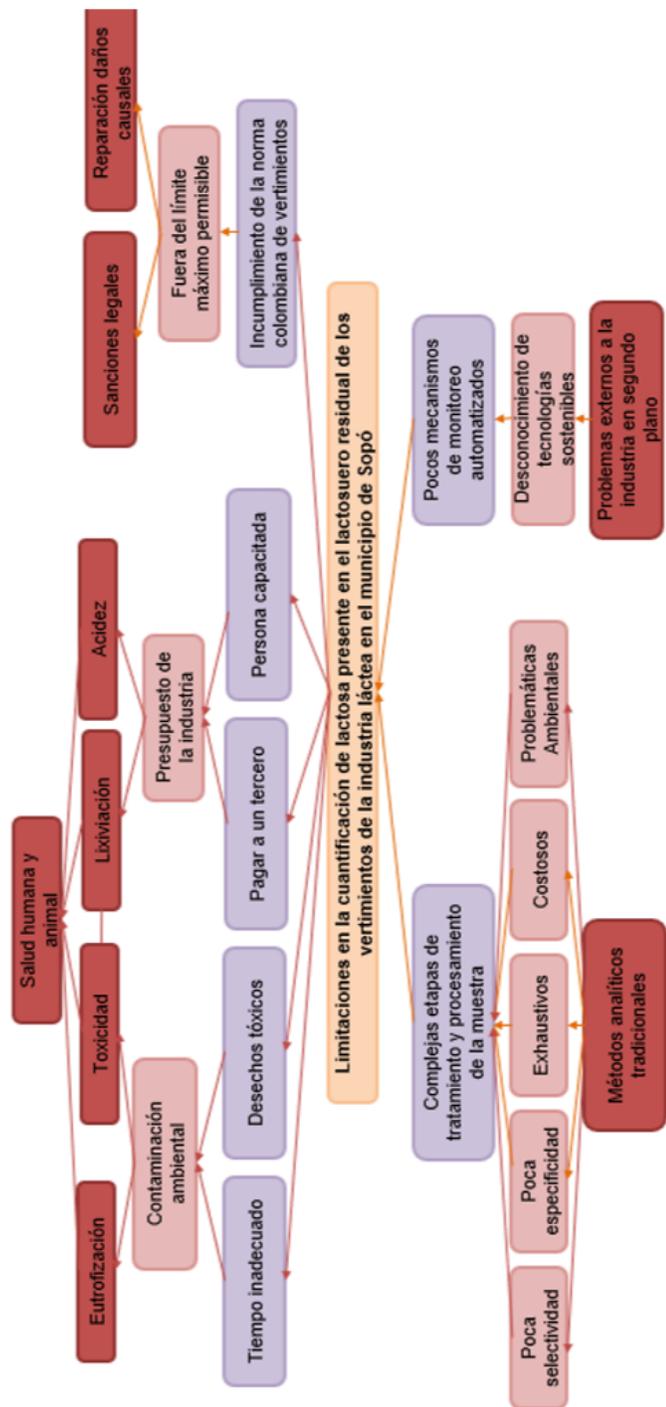


Figura 1-1.: Árbol del problema, concentración de lactosuero presente en los vertimientos del municipio de Sopó (Cundinamarca).

2. Justificación

Es claro que los componentes que constituyen el lactosuero, entre ellos la lactosa son considerados contaminantes ambientales de fuentes hídricas y del suelo, lo que está siendo controlado actualmente mediante la legislación colombiana. Sin embargo, frente a esto, hay una necesidad y es cómo cuantificar lactosa en el lactosuero residual de manera más tecnológica, confiable, ambientalmente más efectiva y en menor tiempo, para asegurar una mejor calidad del agua (Jiménez & León, 2009). Respecto a esto, es que los biosensores son una herramienta viable, para el monitoreo de aguas residuales.

Los biosensores *”son dispositivos analíticos capaces de traducir la información química o señal analítica de un elemento biológico de reconocimiento asociado a un mecanismo de detección en una señal eléctrica útil, constituyéndose en una herramienta para inspeccionar la calidad y los procesos con un panorama prometedor con respecto a los métodos tradicionales, en cuanto a especificidad, sencillez, respuesta clara y real en el área ambiental, clínica y de alimentos”*. Los biosensores, están conformados por dos componentes: un receptor y un transductor sobre el que se encuentra conectado el primero; por lo tanto, el receptor reconoce en la muestra la información química deseada, la convierte para que sea reconocida por el transductor y, éste la transforma de una señal primaria a una señal secundaria fácilmente procesable (Ruíz, 2006). Del mismo modo, los biosensores basados en receptores enzimáticos y transductores electroquímicos, han sido el foco de investigación en los últimos años, debido a algunas características como: menor costo, fácil manipulación, menor tiempo de respuesta, alta sensibilidad, reproducibilidad y selectividad (Ruíz, 2006). Por lo anterior, es que los biosensores electroquímicos son versátiles y eficientes, ya que una de las ventajas más trascendentales es que permiten obtener resultados en el menor tiempo posible, son automatizables, fáciles de operar, transportar e incorporables en sistemas microscópicos (Jiménez & León, 2009). Esto hace que los biosensores sean una herramienta más precisa que los métodos tradicionales por las desventajas ya mencionadas en el planteamiento del problema.

Indicando así, que los biosensores enzimáticos electroquímicos permiten registrar medidas con muestras de mínimo volumen o en zonas reducidas, al igual que presentan unos límites de detección suficientes para muestras de interés analítico, y un intervalo de respuesta más amplio que la mayoría de sensores químicos basados en otros principios (Alegret, Del Valle, & Merkoci, 2004).

Por ende, el prototipo de laboratorio de biosensor que se plantea recibe el aporte de los antecedentes mencionados en el trabajo como revisión bibliográfica para la determinación de la metodología

selectiva a realizar para cuantificar lactosa, a partir de la integración de algunas metodologías ya propuestas por los artículos, así como para la identificación de los tipos de enzimas y electrodos a manejar que de acuerdo a sus características brinden mayor eficiencia y respuesta. Razón por la cual, el prototipo de laboratorio de biosensor a desarrollar aportaría a las industrias lácteas una alternativa para monitorear sus vertimientos antes de ser tratados por métodos primarios y llevados a las fuentes hídricas, ya que así la industria láctea podrá tomar medidas del grado y método de tratamiento más adecuado para la degradación de lactosa de acuerdo al nivel de concentración cuantificado, cuando este se encuentre por fuera de los límites permisibles dados por la legislación colombiana de vertimientos. Con la finalidad de prevenir la penalización por la normativa y la contaminación ambiental que indirectamente afectaría a los entes biológicos.

Del mismo modo, desde la ingeniería el prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual en los vertimientos de las industrias lácteas, aportaría y apostaría al desarrollo tecnológico y de investigación en las áreas de la biotecnología en Colombia, ya que las industrias lácteas hacen parte de las actividades primordiales para el desarrollo económico, social y cultural de la población, por lo que, se deben buscar métodos para monitorear selectivamente y en menor tiempo los daños causados al entorno y, así, poder prevenir algunas problemáticas medio ambientales y de salud humana de manera rápida y eficiente.

Es por eso, que el desarrollo de un biosensor pertenece al trabajo profesional del Bioingeniero, puesto que requiere del conocimiento conceptual y práctico de las áreas integradas de química, biología, ecosistemas, electrónica, sensórica, control y análisis de señales, para la solución de esta problemática en su totalidad, lo cual no podría completar un profesional enfocado en solo una de estas áreas, ya que no todas son de su especialidad. Además, que tiene como finalidad, trabajar dentro de uno de los focos misionales de la Bioingeniería como lo es la relación hombre-agua; ya que tener acceso al agua es indispensable para sostener la “vida” y, es ahí donde el Bioingeniero ayuda a evaluar los recursos acuíferos, la cantidad y la calidad del agua para consumo humano y otros propósitos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Desarrollar un prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual de la industria láctea, como alternativa para el monitoreo de sus vertimientos en el Municipio de Sopó (Cundinamarca).

3.2. Objetivos específicos

- Establecer una metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual.
- Caracterizar el tipo de transductor que permita transformar la señal generada por la reacción química, en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa.
- Diseñar e implementar un prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación de lactosa en el lactosuero residual que se encuentra en los vertimientos de la industria láctea del municipio de Sopó.
- Formular un protocolo de evaluación del funcionamiento del biosensor basado en la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual de los vertimientos de la industria láctea en el municipio de Sopó.

4. Marco Referencial

El marco referencial del presente documento esta constituido por cinco subsecciones, dentro de las cuales se encuentran: los fundamentos teóricos y conceptuales que involucran el desarrollo de un biosensor electroquímico, los aportes realizados por otros autores sobre los métodos para la cuantificación de lactosa, la descripción geográfica del lugar de enfoque para la implementación del prototipo de laboratorio (Sopó-Cundinamarca), además, de las normativas colombianas tenidas en cuenta para la construcción del prototipo de laboratorio de un biosensor que cuantifique lactosa presente en muestras de lactosuero residual. Por ende, las subsecciones del marco referencial se encuentran en el siguiente orden:

- 4.1. Marco Teórico
- 4.2. Marco Conceptual
- 4.3. Antecedentes
- 4.4. Marco Geográfico
- 4.5. Marco Normativo

4.1. Marco Teórico

Durante el marco teórico se profundiza en el tema de la construcción de un biosensor electroquímico para la cuantificación de lactosa, mediante la explicación de los procesos químicos y el método tradicional DNS para la detección de lactosa, así como también el método más común para la cuantificación de un componente biológico aplicado en la construcción de biosensores electroquímicos. Por ende, el marco teórico esta dividido en dos secciones: etapa de reconocimiento biológico y etapa instrumental.

4.1.1. Etapa de reconocimiento biológico

La primera sección es la etapa de reconocimiento biológico donde se presenta las reacciones químicas necesarias para la identificación de lactosa y el método tradicional de laboratorio para la detección de lactosa en presencia de lactosuero residual.

Reacciones químicas necesarias para la identificación de lactosa

Para llevar a cabo la primera etapa del prototipo de laboratorio del biosensor de lactosa, es decir, el reconocimiento químico y selectivo del compuesto biológico, se recordó y profundizó los siguientes temas en dicho orden:

- Generalidades de la lactosa y su relación con las enzimas.
- Relación de la lactosa con la enzima β -galactosidasa.
- Generalidades de la glucosa y su relación con la enzima glucosa oxidasa.
- Relación entre peróxido de hidrógeno y la enzima peroxidasa.

Generalidades de la lactosa y su relación con las enzimas

La lactosa es un carbohidrato de tipo disacárido que consta de la unión de dos azúcares como lo son la galactosa y la glucosa mediante un enlace glucosídico β -1,4 (Figura 4-1). Este disacárido constituye aproximadamente del 2 al 8% de la leche, razón por la cual su identificación en la industria láctea es de gran importancia, ya que el contenido de lactosa es un índice que permite evaluar la calidad de la leche y detectar leche anormal (Amman & Fransaer, 2010).

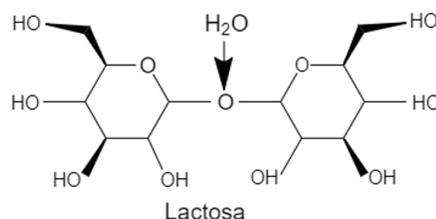


Figura 4-1.: Estructura molecular de la lactosa basado en Amman & Fransaer, 2010 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.

El control preciso de la cantidad de lactosa es muy importante en los productos lácteos ya que la mayoría de personas y animales no pueden digerirla; al igual de importante en los desechos de la industrias lácteas porque provoca daños en los ecosistemas. Las anteriores problemáticas se deben a la intolerancia de metabolizar los azúcares por deficiencia de la enzima lactasa y sus derivados. Es por lo anterior, que la lactosa debe ser hidrolizada en los seres humanos, por la enzima lactasa y en microorganismos por la β -galactosidasa, para poder asimilar los monómeros que se generan (Berg, Stryer, & Tymoczko, 2007).

Los microorganismos metabolizan los carbohidratos mediante el proceso de oxidación para obtener energía en forma de glucosa, porque es el monosacárido más frecuente en la naturaleza como azúcar libre. Por lo cual, los microorganismos para obtener glucosa en la leche deben hidrolizar la lactosa

en dos monosacáridos glucosa y galactosa por medio de la enzima β -galactosidasa (Figura 4-2). Para que dichas enzimas cumplan con su función se debe tener presente: pH, temperatura óptima, contraindicaciones, usos, y fuentes de origen (como por ejemplo a partir de los hongos *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*) (Sánchez, Rosales, & Bustamante, 2015).

Para complementar lo anteriormente dicho, se debe tener en cuenta que las características y propiedades de la enzima a escoger dependen de la fuente de origen (Sánchez, Rosales, & Bustamante, 2015):

1. Origen fúngico: sus enzimas presentan mayor termoestabilidad, el pH óptimo de actividad está en un rango ácido de 4.5-6.5 y la temperatura entre 35 y 55 °C.
2. Lactasas de levadura y bacterias: son enzimas medianamente termolábiles, con pH cercano al neutro y temperatura aproximada de 37 °C. Presentan una pérdida considerable de actividad con pH entre 5.3-4.5 y temperatura a 55 °C.

Relación de la lactosa con la enzima β -galactosidasa

La enzima β -galactosidasa se encuentra distribuida en la naturaleza incluyendo plantas, animales y diversos microorganismos como bacterias, levaduras, hongos y arqueobacterias. Comercialmente, la β -galactosidasa se obtiene a partir de microorganismos de diferentes géneros por fermentación de diferentes fuentes de carbono: *Kluyveromyces*, *Candida*, *Aspergillus*, *Bacillus* sp. y *Escherichia coli* (Sánchez, Rosales, & Bustamante, 2015).

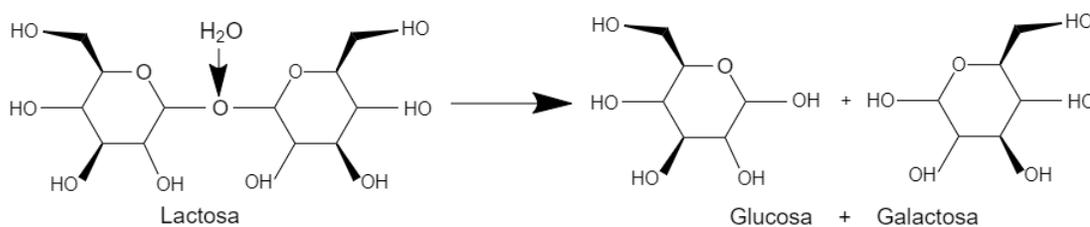


Figura 4-2.: Hidrólisis de la lactosa. La lactosa actúa como sustrato para la enzima, que permite dar lugar a los azúcares glucosa y galactosa basado en Sánchez, Rosales, & Bustamante, 2015 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.

De tal manera, la hidrólisis de la lactosa por medio de la enzima β -galactosidasa provoca una reacción química de descomposición de dicho disacárido por medio de una molécula de agua en dos monosacáridos o compuestos más simples de analizar y degradar como lo son la glucosa y la galactosa (Figura 4-2).

Generalidades de la glucosa y su relación con la enzima glucosa oxidasa

La glucosa es un monosacárido compuesto por una hexosa y una aldosa, sus propiedades se explican a partir de la presencia de un grupo de alcoholes y de un grupo aldehído (Figura 4-3). La glucosa es uno de los carbohidratos más importantes, ya que es un compuesto químico que actúa como medio biológico primario de almacenar o de consumir energía (Sosa & Galvis, 2010).

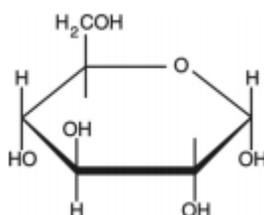


Figura 4-3.: Estructura química de la glucosa basado en Sosa & Galvis, 2010 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.

Teniendo en cuenta, que las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores altamente selectivos en el sustrato, se dice, que la enzima Glucosa oxidasa es una oxidoreductasa ya que oxida la glucosa y reduce el oxígeno a peróxido de hidrógeno (Figura 4-4). La Glucosa oxidasa se origina por algunos hongos como: *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *P. glaucum*, *P. amagasakiense*, *P. purpurogenum*, *P. variabile*, y *Alternaria alternata*; la función de estos hongos es antibacterial en presencia de glucosa y oxígeno debido al peróxido de hidrógeno producido, además, la Glucosa oxidasa estima la concentración de glucosa en la sangre o en la orina a partir de la coloración generada por el peróxido de hidrógeno. A nivel industrial es implementada para la determinación cuantitativa de glucosa en procesos como: fermentación y producción de ácido glucónico (Sosa & Galvis, 2010).

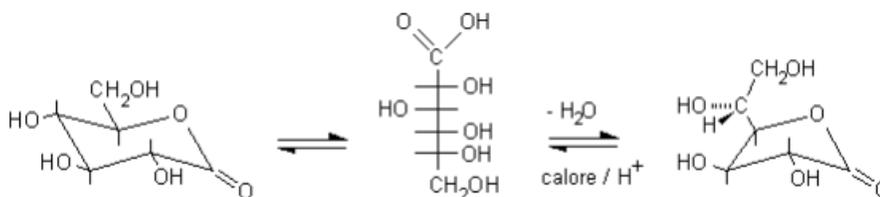


Figura 4-4.: Reacción de la glucosa oxidasa basado en Sosa & Galvis, 2010 y realizado por autoría, mediante ChemSketch.

De tal manera, la glucosa obtenida a partir de la hidrólisis de lactosa, posteriormente es catalizada por oxidación mediante la enzima glucosa oxidasa y dando como resultado peróxido de hidrógeno (Figura 4-4). Pero del resultado de dicha reacción se requiere usar únicamente el oxígeno molecular como aceptor final de electrones.

Relación entre peróxido de hidrógeno y la enzima peroxidasa

Las peroxidasa son enzimas ampliamente distribuidas en las plantas vegetales que catalizan la oxidación de varios fenoles donadores de electrones en presencia de peróxido de hidrógeno, generando radicales libres que reaccionan entre sí (Figura 4-5) (Rivas, Baltasar, & Moreno, 2016).

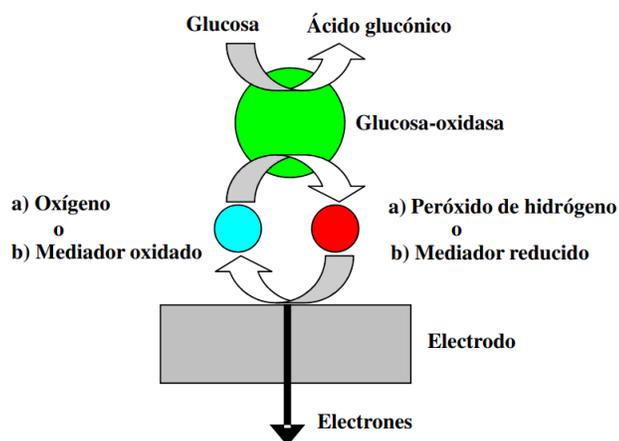


Figura 4-5.: Reacción del peróxido de hidrógeno a partir de la peroxidasa (Rivas, Baltasar, & Moreno, 2016).

Método tradicional para cuantificar lactosa presente en el lactosuero residual de algunos vertimientos

Para medir la lactosa por método de DNS es necesario realizar una desproteinización, así como una neutralización de la muestra a medir, se mezcla la muestra de lactosuero con el reactivo DNS y luego se diluye en 5 mL, la solución se mantiene en agua hirviendo por 5 min y es enfriada para medir la absorbancia a 540 nm (Campuzano, 2013).

Es necesario tener en cuenta para la cuantificación de la lactosa que el método posee un límite de cuantificación que es de 2 mg lactosa/mL, teniendo en cuenta eso se debe realizar una curva patrón con diferentes concentraciones de lactosa para tener así la correlación y saber al momento de la medición que cantidad de lactosa se tiene en la muestra (Figura 4-6) (Campuzano, 2013).

De acuerdo a la Figura 4-6 por el método del DNS no se puede cuantificar el grado de hidrólisis de la lactosa, por lo que el método tendría gran aplicación si se pudiera medir la absorbancia de uno de los azúcares a una longitud de onda diferente, ya que se evitarían los errores producidos por la medición a la misma longitud de onda, pero en ninguno de los casos hallados se reporta una longitud de onda diferente para cualquiera de las biomoléculas trabajadas. Por otro lado, en

la preparación previa de la muestra se debe tener en cuenta la procedencia de la materia prima, se debe asegurar que la muestra tenga las mismas características, es decir, en el caso del lactosuero provenga de la misma empresa y del mismo proceso de producción (Campuzano, 2013).

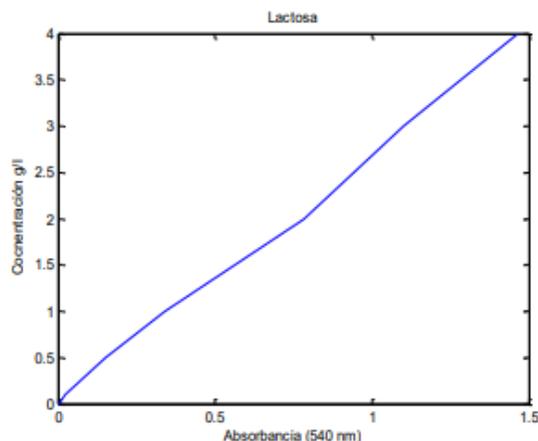


Figura 4-6.: Curva de calibración para lactosa mediante el método analítico tradicional DNS (Campuzano, 2013).

4.1.2. Etapa de instrumentación

La segunda sección es la etapa de instrumentación, donde se da a conocer los métodos implementados a la señal química para su lectura, acondicionamiento y procesamiento por medio de un transductor, un hardware y un software convirtiéndola en una señal analítica útil de fácil entendimiento para el usuario al momento de visualizarla como resultado cuantitativo del biosensor.

Método para cuantificar lactosa

Transductor electroquímico

En la etapa de reconocimiento biológico la señal resultante de la reacción redox es leída por medio de un par de electrodos, los cuales permiten medir el flujo de electrones desde el electrodo con mayor densidad de carga electrónica al de menor densidad, dando como resultado una diferencia de potencial, luego de un equilibrio de oxidación-reducción (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

Para realizar la medición de la diferencia de potencial, se conectan dos electrodos en forma de circuito continuo para generar un flujo de electrones, también conocido como migración de iones, cuyo contacto con la disolución es mediante un tapón poroso, dando lugar a una celda electroquímica con una señal cuantificable y de fácil procesamiento (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

Un ejemplo de la construcción de una celda electroquímica es el diseño de un electrodo combinado en vidrio para medir pH (Figura 4-7). Este consiste en un tubo de vidrio o plástico no conductor que sirve como soporte del electrodo y un vidrio polarizable con óxido de litio en el extremo sensible del electrodo. La estructura del vidrio permite el intercambio de iones de litio por iones de hidrógeno en solución acuosa, creando un potencial en milivoltios, el cual es comparado por un electrodo de referencia de calomel saturado con cloruro de potasio, que genera un potencial constante e independiente del pH. El electrodo de referencia sirve como puente salino que permite el paso de los milivoltios generados hacia el circuito de amplificación mediante un alambre (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

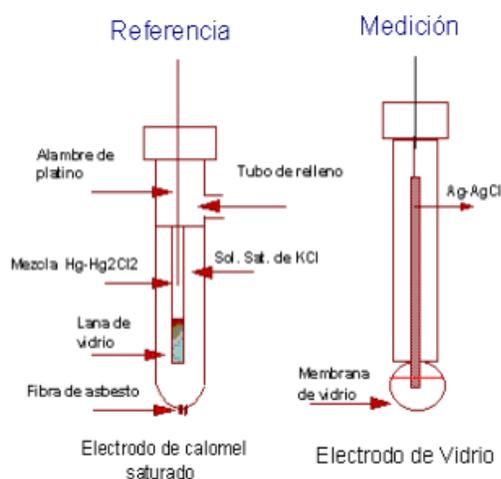


Figura 4-7.: Esquema de los dos electrodos usados para medir pH (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

Para biosensores de lactosa algunas investigaciones han basado sus estudios en la fabricación de electrodos o transductores electroquímicos voltamperométricos de grafito, nanotubos de carbono o algunos metales como cobre, zinc, platino, plata u oro (Goyal, Gupta, & Chatterjee, 2010).

El grafito está conformado por capas de anillos hexagonales de 6 átomos de carbono, en donde cada átomo de carbono se encuentra ligado por enlaces covalentes a los tres átomos más cercanos de la misma capa; quedando el cuarto átomo libre, para generar una carga eléctrica dispersa que le asigna al grafito una conductividad relativamente elevada (Goyal, Gupta, & Chatterjee, 2010).

Por tal motivo, teniendo en cuenta el artículo *“Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase”*, los electrodos de grafito espectrográfico permiten la transferencia de electrones generados por los procesos de reacción química ya antes mencionados a través de su membrana, los cuales interactúan con los electrodos libres en la superficie del grafito y generan energía en forma de conductividad (mV) (Figura 4-8), que posteriormente será leída

y acondicionada por un circuito amplificador de señales, además, mediante un multicontrolador o placa de desarrollo de Arduino dicha señal es acondicionada y llevada a un computador para ser procesada por el software y, así poder visualizar la concentración de lactosa (Stoica et al., 2005).

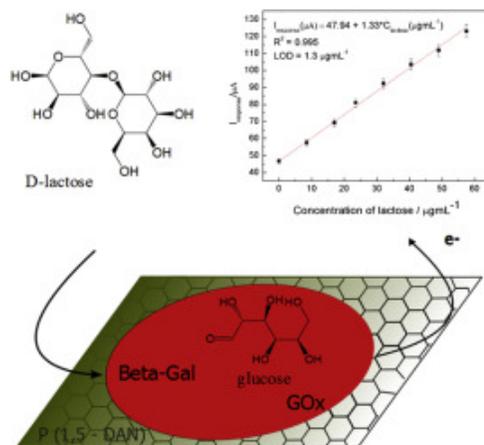


Figura 4-8.: Adhesión de las enzimas β -galactosidasa, glucosa oxidasa y peroxidasa por adsorción física simple para detección de lactosa y luego generación de conductividad para cuantificar lactosa (Stoica et al., 2005).

La descripción termodinámica para la reacción de un electrodo en equilibrio se describe a través de la ecuación de Nernst (Ecuación 4-2), la cual relaciona el potencial del electrodo con las concentraciones de los compuestos que participan en la reacción química de una solución (Bonetto, 2013).

”Para el caso general de una reacción redox del tipo” (Bonetto, 2013):



”siendo O la especie oxidada y R la especie reducida, la ecuación de Nernst es:” (Bonetto, 2013):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} * \ln \frac{C_O}{C_R} \quad (4-2)$$

”donde C_O y C_R es la concentración de la especie oxidada y de la especie reducida, respectivamente, en el seno de la solución. En el equilibrio, E^0 es el potencial de reducción de la cupla redox medido respecto del electrodo normal de hidrógeno, NHE ” (Bonetto, 2013).

Acondicionamiento y procesamiento de la señal útil

La diferencia de potencial resultante de la reacción redox medida por los electrodos es llevada a una fase de acondicionamiento y procesamiento, como se implementa en dos tipos de biosensores: el

primero un biosensor de sudor (etapa de instrumentación simple) y el segundo un potenciómetro de pH (etapa de instrumentación compleja). Los cuales fueron analizados debido a su similitud técnica y funcional con respecto al prototipo de laboratorio de biosensor de lactosa construido (Montero, 2019), (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

En primer lugar, los biosensores de sudor se encargan de analizar biomarcadores como la glucosa y el lactato, dando información sobre el contenido glucémico, la actividad muscular o la hidratación. Son sensores potenciométricos que emiten un pequeño voltaje proporcional a la concentración de glucosa o lactato presente en la muestra que se analiza y requiere de un hardware bastante simple, como puede ser un búfer de voltaje de bajo ruido, es decir, necesita de un seguidor de voltaje simple con filtros RF integrados, como se observa en la Figura 4-9 (Montero, 2019).

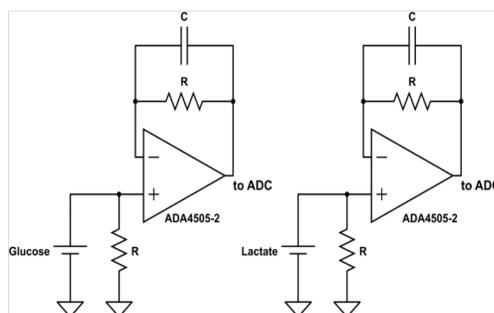


Figura 4-9.: Esquema de los biosensores potenciométricos de glucosa y lactato (Montero, 2019).

Además, incluye un capacitor en la red de retroalimentación del circuito seguidor para disminuir el ancho de banda y reducir el ruido, finalmente la señal es leída por un convertidor de analógico a digital de 14 bits (Montero, 2019).

En segundo lugar, el potenciómetro de pH es un biosensor que transforma el potencial del electrodo en una indicación de pH según la solución medida, por lo que es necesario caracterizar el biosensor con una curva lineal del respectivo electrodo. Para lograr su óptima funcionalidad hay múltiples circuitos eléctricos que permiten la adquisición, amplificación y tratamiento de la señal proveniente del electrodo (Figura 4-10). Los circuitos electrónicos propuestos se fundamentan en el uso de un seguidor de voltaje, tres potenciómetros para la calibración y amplificadores operacionales con una pequeña corriente de entrada, debido a que la señal es de bajo voltaje y los electrodos poseen una resistencia que varía entre 10 y 1000 Mega Ohm. Los potenciómetros a usar son: potenciómetro para el punto cero, potenciómetro para la pendiente y potenciómetro para la compensación de temperatura (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

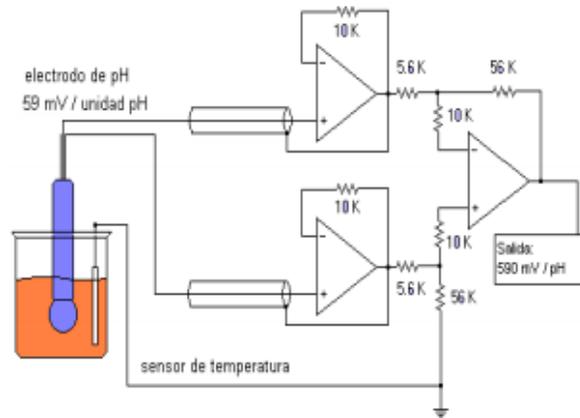


Figura 4-10.: Circuito amplificador de la señal de pH (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

En la Figura 4-11 se observa el circuito de acondicionamiento más utilizado para caracterizar un potenciómetro de pH, conformado por un amplificador operacional LM741 y los tres potenciómetros de precisión (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

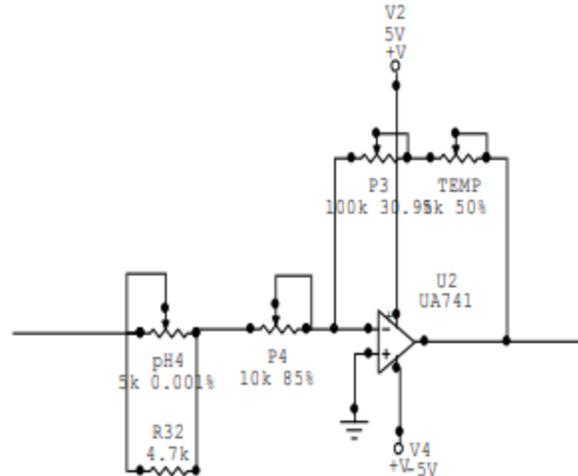


Figura 4-11.: Etapa de inversión y amplificación de la señal de pH (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

Para la adquisición y el procesamiento de la señal, se utiliza el hardware Arduino Mega 2560, al que esta conectado el potenciómetro de pH, con su respectivo circuito de acondicionamiento, y comunicación inalámbrica con el módulo XBee Shield, conectado a la interfaz de comunicación IEEE 802.15.4. (Jordá, 2018).

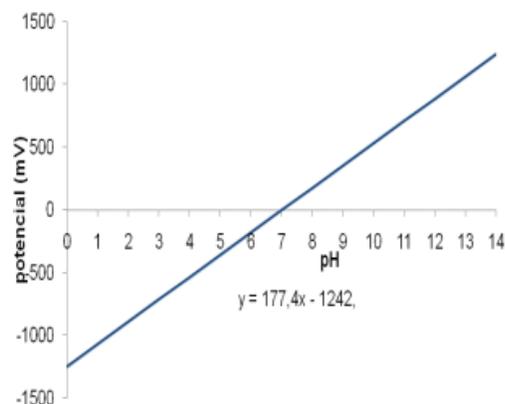


Figura 4-12.: Potencial (pH) a la salida del amplificador LM741 (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

La Figura 4-12, muestra los potenciales de salida del amplificador operacional en función del pH (Álzate, Montes, & Escobar, 2012).

4.2. Marco Conceptual

En el marco conceptual se da a conocer la definición, características, componentes y funcionamiento del biosensor electroquímico de acuerdo a las siguientes etapas: reconocimiento biológico e instrumentación. Las cuales se encuentran explicadas en subsecciones con sus respectivos fundamentos, etapas de composición, tipos de biosensores, comportamiento de la relación electrodo-solución, caracterización, instrumentación y acondicionamiento de la señal analítica útil. Sin embargo, previo a estudiar cada una de las subsecciones mencionadas, se debe entender el concepto, características y partes de un biosensor electroquímico.

Un *"biosensor ambiental es un sistema analítico que acopla un elemento biológico sensible con un transductor para obtener una rápida, proporcional, precisa y sensible detección de sustancias individuales o combinadas presentes en el ambiente, en especial para la detección de agentes químicos contaminantes"*, es decir, los biosensores son dispositivos que traducen la información química a partir de un elemento biológico mediante un mecanismo de detección e instrumentación en una señal analítica útil, siendo una herramienta prometedora para inspeccionar la calidad y los procesos a nivel ambiental, clínico y de alimentos; ya que con respecto a los métodos tradicionales estos brindan mayores beneficios como: sencillez, especificidad, respuesta real y clara (Castro, Luna, & Villalobos, 2007).

En los últimos 10 años los biosensores han sido implementados en dos sistemas de seguridad ambiental (Castro, Luna, & Villalobos, 2007):

1. Métodos de seguimiento: encargados de predecir el posible peligro de efectos biológicos como toxicidad, genotoxicidad o estrogenicidad de una mezcla de contaminantes medidos en cortos lapsos de tiempo (Castro, Luna, & Villalobos, 2007).
2. Métodos de cribado o screening: alertan la presencia de algún compuesto contaminante, además de usar métodos convencionales como cromatografía de gases o espectrofotometría de masas, para la identificación y confirmación de los compuestos causantes del daño (Castro, Luna, & Villalobos, 2007).

Los biosensores, están conformados por un sistema de reconocimiento y un transductor, en algunos casos se habla de un tercer componente conocido como captura bioespecífica (Figura 4-14) (Ruíz, 2006).

La Figura 4-13 menciona las partes que comprenden un biosensor típico, las cuales son: a) biorreceptores que se unen específicamente al analito; b) una arquitectura de interfaz donde tiene lugar un evento biológico específico y da lugar a una señal captada por c) el elemento transductor; la señal del transductor (que puede ser desde el ángulo de acoplamiento de un rayo láser a la corriente producida en un electrodo) se convierte en una señal electrónica y se amplifica mediante un circuito detector usando la referencia apropiada y se envía para su procesamiento, d) software de computadora para convertir a un parámetro físico significativo que describa el proceso que se está investigando; finalmente, la cantidad resultante debe presentarse a través de e) una interfaz para el operador humano. Los biosensores se pueden aplicar a una gran variedad de muestras que incluyen fluidos corporales, muestras de alimentos, cultivos celulares y se pueden usar para analizar muestras ambientales (Dorothee et al., 2008).

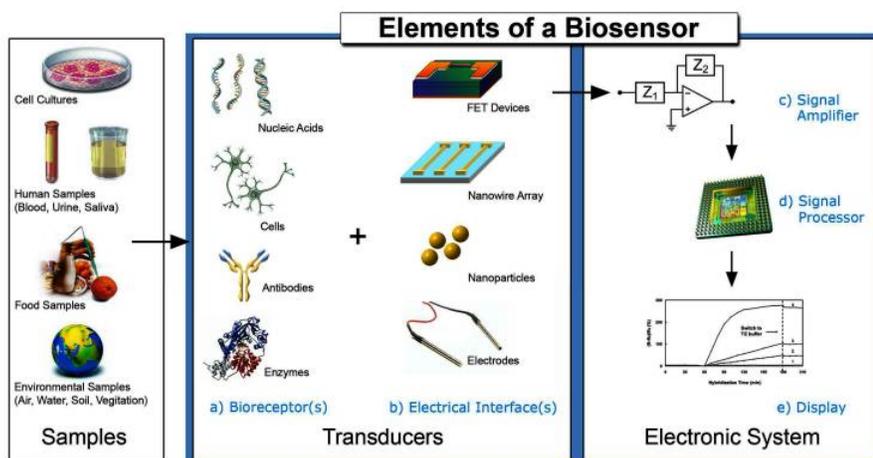


Figura 4-13.: Elementos y componentes seleccionados de un biosensor típico (Dorothee et al., 2008).

Los biosensores además de las características mencionadas anteriormente, pueden tener sensibili-

dad, selectividad, versatilidad, robustez y capacidad de monitoreo simultáneo, independiente de los parámetros físicos como el pH y la temperatura; son la mejor alternativa reutilizable para sustituir las técnicas convencionales que tienen la misma finalidad (Jiménez & León, 2009).

4.2.1. Etapa de reconocimiento biológico

La etapa de reconocimiento biológico es la primera fase que conforma el biosensor y permite reconocer selectivamente un componente biológico en una muestra que se desea estudiar, mediante la interacción de los agentes químicos según sea el caso.

El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor, que la transforma a su vez de una señal primaria a una señal secundaria fácilmente procesable, generalmente eléctrica u óptica” (Ruíz, 2006).

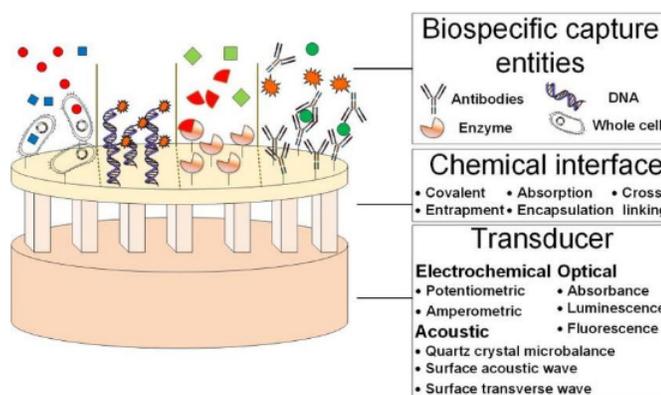


Figura 4-14.: Estructura del biosensor, consta de tres componentes: captura bioespecífica, interfaz química y transductor. La captura bioespecífica es utilizada para la biodetección del analito (Ruíz, 2006).

En la biodetección la medición de las propiedades eléctricas para extraer información de sistemas biológicos es normalmente de naturaleza electroquímica, por lo que un componente bioelectroquímico sirve como elemento de transducción principal. Aunque los biosensores como dispositivos emplean una variedad de elementos de reconocimiento, las técnicas de detección electroquímica utilizan predominantemente enzimas, esto se debe principalmente a sus capacidades específicas de unión y actividad biocatalítica (Bonetto, 2013).

Los biosensores enzimáticos se fundamentan en métodos de inmovilización, es decir, adsorción de enzimas por fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos o enlaces covalentes. Las enzimas más comunes para este propósito son oxidorreductasas, polifenol oxidasas, peroxidasas y amino oxidasas

(Jiménez & León, 2009). Para la etapa de reconocimiento, los elementos biológicos pueden dividirse en dos (Castro, Luna, & Villalobos, 2007):

1. Biocatalíticos (biosensores catalíticos): conformados por microorganismos, enzimas aisladas, tejidos y células completas, los cuales generan un producto detectable y medible mediante reacciones de catálisis del analito (Castro, Luna, & Villalobos, 2007).
2. Bioligandos (biosensores de afinidad): constituidos por ácidos nucleicos, péptidos, anticuerpos y lectinas, los cuales se caracterizan por tener una reacción de afinidad con el analito (Castro, Luna, & Villalobos, 2007).

Por lo tanto, los mecanismos de operación de los biorreceptores implican (Ruíz, 2006):

1. Conversión del analito en un producto detectable por el sensor.
2. Detección de un analito que actúa como inhibidor enzimático o activador.
3. Evaluación de la modificación de las propiedades enzimáticas tras la interacción con el analito.

Del mismo modo, la etapa del biorreceptor es controlada mediante una reacción química complementaria, las reacciones pueden ser: consumo de oxígeno, formación de peróxido de hidrógeno, cambios en la concentración de NADH, fluorescencia, absorción, pH, conductividad, temperatura o masa (Ruíz, 2006).

La interacción entre la etapa de reconocimiento y el analito conforma el factor determinante para la selección del sistema de transducción, sin el cual no se puede amplificar, registrar, sistematizar, almacenar e interpretar las señales dadas por el producto de la muestra. Motivo por el cual, la interacción electroquímica entre la reacción y el electrodo genera una señal cuantificable y acondicionada por los transductores electroquímicos, dispositivos más robustos, de fácil fabricación, mantenimiento, manejo y económicos con respecto al resto de los transductores. Lo anterior hace del biosensor un equipo llamativo por tener un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos (Ruíz, 2006).

4.2.2. Etapa de instrumentación

La etapa de instrumentación se divide en dos fases: transductor electroquímico y, procesamiento y acondicionamiento de la señal útil. El transductor electroquímico es la siguiente fase que constituye un biosensor, puesto que esta realiza la captura del resultado de la interacción química dada en la etapa de reconocimiento mediante un electrodo combinado. Mientras que la última fase permite la lectura, procesamiento y acondicionamiento de la señal registrada por los electrodos mediante el uso de la electrónica y la programación, concediendo al usuario visualizar la cuantificación del componente biológico que desea estudiar.

Transductor electroquímico

Los sensores electroquímicos reaccionan con el componente biológico de interés para producir una señal eléctrica proporcional a su concentración. Por lo anterior, es que un sensor electroquímico típico consiste en un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un agente químico, el cual genera una señal de respuesta ante la reacción química ocasionada en la muestra de estudio (Dorothee et al., 2008).

Los transductores electroquímicos se fundamentan en convertir la señal obtenida por una reacción química en una señal eléctrica (Alegret, Del Valle, & Merkoci, 2004), y tienen la ventaja de ser económicos y brindar respuesta rápida; además, de poseer la capacidad de automatización en una gran variedad de muestras (Ruíz, 2006). Estos se catalogan en: ópticos, piezoeléctricos, térmicos, colorimétricos, conductimétricos, impedimétricos, potenciométricos, amperométricos y voltamétricos (Figura 4-15) (Castro, Luna, & Villalobos, 2007).

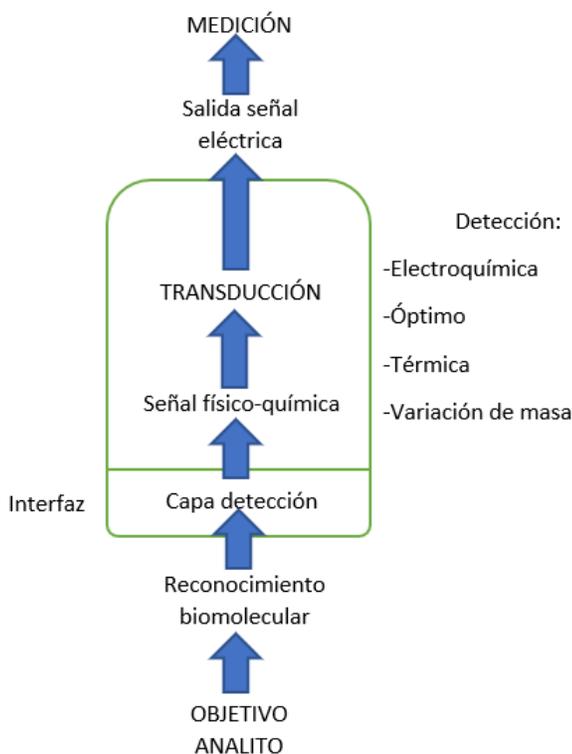


Figura 4-15.: Estructura biosensor, especificado en la fase de transducción donde se observa sus variables de entrada y salida, como los métodos y materiales. Basado en Ruíz, 2006 y realizado por autoría.

En especial, los transductores voltamperométricos se basan en la recepción de un potencial sobre un electrodo de trabajo. Se fundamentan en la proporción de la concentración existente de un deter-

minado compuesto biológico en una muestra de estudio y del voltaje registrado sobre la superficie del electrodo combinado al oxidarse (Alegret, Del Valle, & Merkoci, 2004).

Las mediciones electroquímicas en una reacción química estudian la termodinámica, las propiedades espectroscópicas de intermediarios inestables y analizan la cantidad de especies orgánicas en una solución. La aplicación de un método electroquímico necesita del conocimiento fundamental sobre las reacciones del electrodo, las propiedades eléctricas que se dan entre la interacción solución-electrodo y las variables que afectan la reacción, las cuales se observan en la Figura 4-16 (Bonetto, 2013).

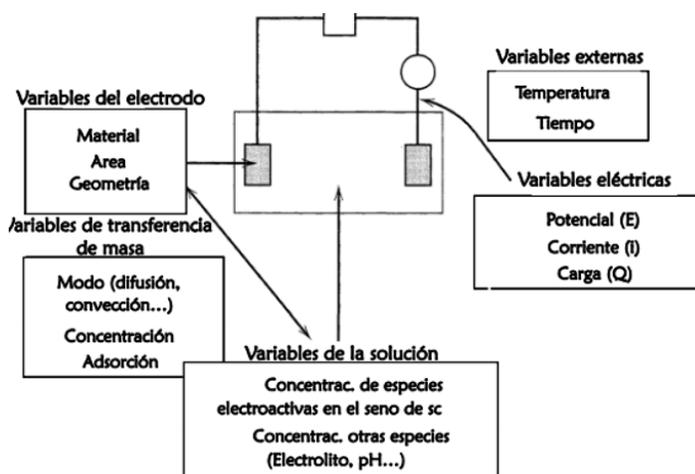


Figura 4-16.: Variables que afectan las reacciones en un electrodo (Bonetto, 2013).

La interacción solución-electrodo se caracteriza por presentar características diferentes del seno de la solución debido a la formación de lo que se conoce como la doble capa iónica y surge de la atracción electrostática de los iones de una solución hacia un electrodo cargado (Bonetto, 2013).

Existen dos tipos de procesos que dan lugar a corrientes en un electrodo:

1. Proceso faradaico: aquel que por medio de una reacción de oxidación-reducción en una muestra, la carga es transferida a través de un electrodo a un ion, proceso conocido como la Ley de Faraday, que postula que *"la extensión de una reacción química en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente; las corrientes resultantes se denominan corrientes faradaicas"* (Bonetto, 2013).
2. Proceso sin transferencia de carga: producido en la interfaz solución-electrodo debido a la inestabilidad de las condiciones cinéticas o termodinámicas, lo que ocasiona inestabilidad del potencial resultante de la solución, generando corrientes externas. En este caso se conoce como proceso no-faradaico, es decir, *"que a pesar de no haber transferencia de carga, existen"*

procesos de adsorción y desorción en la superficie de los electrodos que originan corrientes no-faradaicas” (Bonetto, 2013).

Dado que las reacciones generalmente se detectan muy cerca de la superficie del electrodo, los electrodos juegan un papel crucial en el rendimiento de los biosensores electroquímicos. En función de un electrodo específico, el material del electrodo, su modificación de superficie o sus dimensiones, su capacidad de detección influye enormemente. La detección electroquímica por lo general requiere de un electrodo de: referencia, auxiliar y trabajo (redox) (Dorothee et al., 2008).

El electrodo de referencia se mantiene a una distancia del sitio de reacción para mantener un potencial conocido y estable. El electrodo de trabajo sirve como el elemento de transducción en la reacción química, mientras que el electrodo auxiliar establece una conexión con la solución electrolítica para aplicar una corriente al electrodo de trabajo. Estos electrodos deben ser conductivos y químicamente estables. Por lo tanto, el platino, el oro, el carbono, el grafito y los compuestos de silicio se usan comúnmente, dependiendo del analito (Dorothee et al., 2008).

Sin embargo, el biosensor electroquímico cuenta con falencias en su superficie impidiendo una alta sensibilidad y selectividad del componente biológico deseado, porque como se explica en la Figura 4-16, el pH y la fuerza iónica en los biofluidos difieren significativamente. Razón por la cual, recientemente ha aumentado el uso de la nanotecnología para reducir las dimensiones de los elementos del sensor electroquímico a tamaños que puedan aumentar la relación señal/ruido y para encontrar formas de usarlo. Además, la combinación de conocimientos en bioquímica, electroquímica, física de superficie, estado sólido, bioingeniería, tecnología de silicio de circuitos integrados y procesamiento de datos ofrece la posibilidad de una nueva generación de sensores altamente específicos, sensibles, selectivos y confiables, así como, matrices de sensores que abordan estos problemas restantes (Bonetto, 2013).

Acondicionamiento y procesamiento de la señal útil

Jaroslav Heyrovský Premio Nobel de Química en 1959, descubrió y desarrolló métodos de análisis polarográficos. Demostró además que era posible reducir moléculas orgánicas en un electrodo de mercurio al aplicar un voltaje determinado, dando lugar a una corriente relacionada con la concentración de la sustancia que se estaba reduciendo. Además, la relación de la corriente observada con el potencial aplicado permitían identificar la sustancia. Por lo cual, lo anterior fundamenta los principios electroquímicos (amperométricos y voltamperométricos), sean aplicados hoy en día en varias aplicaciones (González & Darbyn, 2007).

El principio voltamperométrico, se caracteriza por una instrumentación de bajo costo que otorga una elevada sensibilidad y especificidad. La especificidad depende de las capacidades de enlace de las enzimas, mientras la sensibilidad depende del elemento biológico y del transductor encargado

para detectar la reacción (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

El procesamiento de señales en un biosensor electroquímico puede ser basado en hardware o software, puesto que las computadoras han impulsado la investigación y el desarrollo de los biosensores, debido al seguimiento y control continuo de los parámetros químicos de un proceso complejo. El procesamiento de la señal requiere de: computadora, interfaz, y software, ya que el sensor interactúa con la muestra y la transforma selectivamente en información química para que luego la interfaz la transforma en una la señal analítica útil. Finalmente, el software controla la interfaz y visualiza los resultados de la medición (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

Sin embargo, la señal eléctrica obtenida del biosensor no puede interactuar directamente con el dispositivo de salida (computador, interfaz o software), porque necesita de un proceso de acondicionamiento (amplificación, filtrado, linealización, aislamiento) para poder ser visualizada (Figura 4-17) (Montilla, 2015).

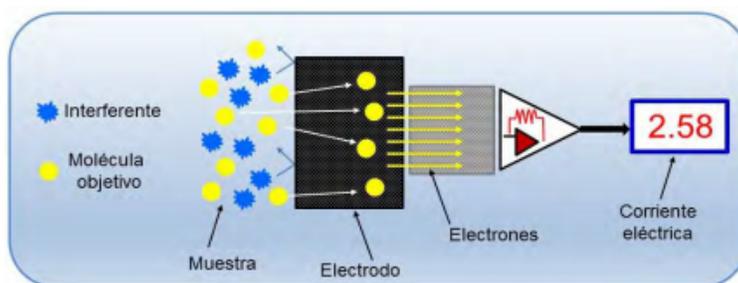


Figura 4-17.: Esquema biosensor electroquímico (Montilla, 2015).

El acondicionamiento de una señal se fundamenta en su manipulación electrónica aplicando elementos electrónicos para obtener los rangos de voltajes o corrientes deseados por el diseño. Es por ello, que la etapa de instrumentación tiene importancia en la construcción de un biosensor, debido que (González & Darbyn, 2007):

1. Las señales son muy débiles (corrientes de polarización y desequilibrio, derivas y ruido).
2. Las frecuencias son muy bajas y limita el uso de amplificadores en corriente alterna porque los condensadores son grandes.
3. La señal procede de una fuente de impedancia alta (impedancias parásitas).

Por lo tanto, los procesos para el acondicionamiento de una señal con implicaciones como las mencionadas anteriormente son (González & Darbyn, 2007):

1. Protección para evitar daño sobre los dispositivos o elementos de procesamiento de la señal.

2. Convertir una señal en otro tipo de señal (Ejemplo: voltaje a corriente).
3. Amplificar una señal para que esta pueda ser leída.
4. Eliminación o reducción de ruido, por filtros.
5. Manipulación de la señal (convertir una variable en una función lineal).

Los circuitos más utilizados para el acondicionamiento de una señal proveniente de un biosensor, se realiza por medio de amplificadores operacionales e instrumentales; así como también el uso del puente de Wheatstone, filtros paso-bajo, atenuadores y fuente de corriente. Siendo los de mayor importancia para el presente trabajo de grado (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017):

- Amplificadores Operacionales:

Para este tipo de amplificador la tensión de entrada es nula y la de salida no, por lo que se requiere someter la entrada a una diferencia de tensión (tensión offset, V_{os}) y anular la tensión de salida. Mientras que las corrientes de entrada son diferentes y no son nulas (corriente de offset, I_{os}) (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

Los anteriores desequilibrios se entienden con el amplificador inversor de la Figura 4-18, donde el amplificador operacional es ideal, la polaridad para I_1, I_2 y V_{os} puede ser cualquiera (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

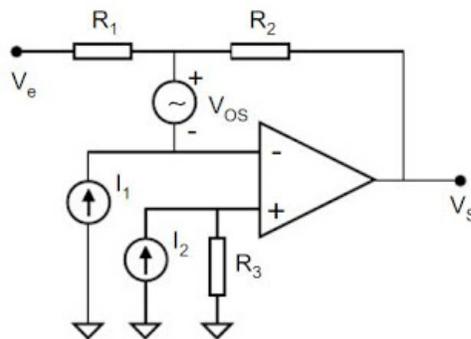


Figura 4-18.: Amplificador operacional 1 (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

La expresión de la tensión para el anterior amplificador operacional (Figura 4-18) es (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017):

$$V_0 = \left(\frac{R_3}{R_4} \right) \left(1 + \frac{2R_2}{R_1} \right) (V_2 - V_1) \quad (4-3)$$

Donde R_3 es innecesaria, sin embargo para la determinación de las resistencias se dice que: $R_3 = R_1 // R_2$ y la expresión reducida es (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017):

$$V_s = -\frac{R_2}{R_1}V_e + \left(1 + \frac{R_2}{R_1}\right)V_{os} + I_{os}R_2 \quad (4-4)$$

Por lo tanto, se ha reducido el error debido a que se cumple que I_{os} es menor a I_1, I_2 y que la impedancia y ganancia serán altas, pero que si se reduce el valor de todas las resistencias, el error se disminuye debido a I_{os} , pero como consecuencia negativa la impedancia de entrada se reduce, además de los siguientes efectos secundarios indeseados: se modifican las corrientes de polarización y desequilibrio y se incrementa la deriva térmica de la tensión de desequilibrio (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

Y por eso, que una alternativa para minimizar el efecto del desequilibrio de las corrientes de polarización como de la tensión de offset se fundamenta en la suma de una tensión externa al terminal de referencia. Además, permite corregir errores provenientes del biosensor con un ajuste en un amplio rango (Figura 4-19) (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

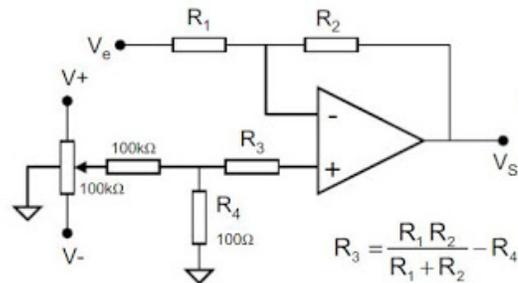


Figura 4-19.: Amplificador operacional 2 (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

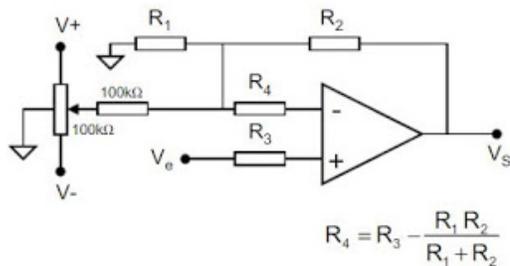


Figura 4-20.: Amplificador operacional 3 (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

Siendo así, el amplificador inversor cuenta con R_1 que incluye la resistencia de salida de V_e , y en el amplificador no inversor se considera que R_3 es fija y es la resistencia de V_e , como indica la Figura 4-20 (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

■ Amplificadores Instrumentales:

Estos amplificadores son usados cuando los voltajes y corrientes de salida de los transductores son señales pequeñas y deben ser transmitidas a un equipo de adquisición de datos o de control. En ambientes industriales el ruido eléctrico causa inconvenientes en circuitos de bajo nivel. Es por lo mencionado, que un amplificador instrumental (Figura 4-21) sirve para combatir el ruido mediante el aumento de la intensidad de las señales de bajo nivel antes de su transmisión (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

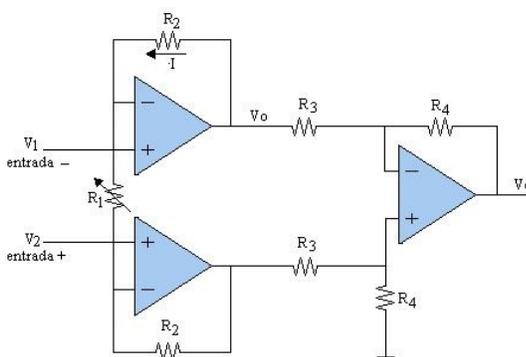


Figura 4-21.: Esquema amplificador instrumental (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017).

Y la expresión que lleva a la explicación y construcción del circuito de un amplificador instrumental es (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017):

$$V_0 = \left(\frac{R_3}{R_4} \right) \left(1 + \frac{2R_2}{R_1} \right) (V_2 - V_1) \quad (4-5)$$

De igual manera, las diferencias entre un amplificador de instrumentación y un amplificador operacional son (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017):

- Los amplificadores de instrumentación tienen ganancia finita. Un amplificador operacional tiene ganancia infinita y con retroalimentación externa logra una ganancia finita.
- El amplificador de instrumentación tiene entrada diferencial de alta impedancia. Mientras que el amplificador operacional también la tiene, pero cuando los elementos de

retroalimentación se adicionan al amplificador operacional, disminuye la impedancia de entrada.

La señal analítica útil resultante del proceso de acondicionamiento, es procesada por parte del método electroquímico de voltamperometría de barrido lineal, el cual consiste en medir la corriente del electrodo de trabajo y realizar un barrido lineal de potencial entre este electrodo y el electrodo de referencia; obteniendo como resultado un pico en la señal (potencial estable) por la oxidación y la reducción del analito. El método electroquímico de voltamperometría de barrido lineal parte de la adquisición y procesamiento de la señal mediante un microcontrolador o plataforma de desarrollo como Arduino (Hardware) (Figura 4-22) (Jordá, 2018).



Figura 4-22.: Esquema general del sistema para adquisición y procesamiento de la señal (Jordá, 2018).

Y luego, la implementación de un programa o software incorporado al hardware para la transmisión de información hacia el computador o interfaz inalámbrica, con la finalidad de dar por terminado la construcción del biosensor electroquímico y dar al usuario la visualización del resultado deseado, ya sea en gráfica o dato numérico.

4.3. Antecedentes

Los antecedentes se encuentran divididos en tres etapas: antecedentes de los métodos tradicionales para la detección o cuantificación de lactosa, antecedentes de los biosensores utilizados para cuantificar el disacárido lactosa o alguno de sus sacáridos y biosensor desarrollado en la actualidad para la cuantificación de lactosa en matrices lácteas (competencia en el mercado). Dentro de las etapas los antecedentes se encuentran organizados según el año de publicación de manera creciente, es decir, de los artículos más antiguos a los más recientes.

4.3.1. Antecedentes de los métodos tradicionales para la detección o cuantificación de lactosa

La mayoría de los contaminantes y compuestos tóxicos químicos tanto para el área de la salud como ambiental, requieren análisis no solo con mecanismos invasivos, sino complejas etapas de tratamiento y procesamiento de la muestra, con técnicas instrumentales de alto costo, como lo son el uso de algunos métodos tradicionales como: cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a diferentes sistemas de detección, fluorescencia, ultravioleta con arreglo de diodos (UV-DAD), o diferentes sistemas y filtros de masas (HPLC/MS, HPLC/MS/MS), electroforesis capilar o cromatografía gaseosa (GC) con detectores como fósforonitrógeno (GC-NPD), ionización de llama (GC-FID), captura de electrones (GC-ECD), espectrómetros de masas y masas tándem (GC-MS, GC/MS/MS) (Jiménez & León, 2009). Algunos de los métodos mencionados anteriormente son implementados en estudios realizados para la detección o cuantificación de lactosa, como se describe a continuación:

En primer lugar, en 2011 el artículo titulado *“Quantification of lactose content in human and cow’s milk using UPLC-tandem mass spectrometry”*, trata sobre el desarrollo del método de UPLC-MS / MS para la medición de lactosa en leche de vaca y humana con presencia de proteínas y grasas para análisis. Las principales ventajas del método desarrollado fueron: determinación completa de lactosa en 5 min, recuperación absoluta de 97-107 %, límite inferior de detección a 5 ng/L y 99 % de linealidad sobre el rango de concentración de 0.7-4.4 mg/L para leche de vaca y humana. Por lo tanto, el método descrito en el artículo representa un análisis de lactosa para determinación rutinaria en leche humana cruda (Fusch et al., 2011).

En segundo lugar, la revista FABICB publicó el artículo *“Identification and quantification of sugars by micellarelectrokinetic chromatography in reverse phase in modified milk”*, en el cual se habla acerca del desarrollo de un método por electroforesis electrocinética micelar para la identificación al tiempo de sacarosa, fructosa y glucosa en leches modificadas. Para llevar a cabo el método realizaron separación de los componentes estudiados empleando capilares de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y sílice como surfactante catiónico en el electrolito de corrida; obteniendo como resultado: *curvas de calibración lineales con R^2 mayor a 98.49, desviación estándar menor a 1.88 % y recuperación entre 95–114 % para la glucosa, 104–110 % para la fructosa, 93–113 % para la lactosa y 92–110 % para la sacarosa*. Por lo tanto, la exactitud, precisión y rapidez, lo hacen un método útil para la cuantificación de azúcares en leches modificadas de manera simultánea (Gerstner et al., 2014).

En tercer lugar, en el artículo *“A novel method for quantification of lactose in mammalian milk through HPTLC and determination by a mass spectrometric technique”* del 2014, los autores realizaron una introducción sobre las funciones que desempeña la lactosa en la salud de los mamíferos recién nacidos y, presentaron un nuevo método de cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) para la estimación de la concentración de lactosa presente en la leche de mamíferos. Los

componentes que utilizaron para ejecutar el método fueron *n*-butanolácido glacial acético-agua en gel de sílice para 254 placas de aluminio; proceso que también se confirmó mediante determinación de espectrometría de masas, y la determinación densitométría de las placas de HPTLC con reactivo de metanol-ácido sulfúrico. Finalmente, las concentraciones de lactosa en la leche de los mamíferos fueron del 2.16 %, 5.70 %, 6.70 %, 7.17 % y 6.38 %, respectivamente (Amit et al., 2014).

Por otro lado, más específicamente para detectar los contaminantes presentes en las aguas residuales se procede a realizar un análisis completo de sus compuestos, para lo cual, se ha desarrollado varios métodos de evaluación con la opción de ser utilizados como indicadores para el control de calidad de dichas aguas. Algunos de los métodos implementados son demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO) y nitrógeno total Kjeldahl, métodos enzimáticos, entre otros. En especial los métodos para cuantificar lactosa residual se fundamentan en la hidrólisis de la misma a δ -glucosa, δ -galactosa con β -galactosidasa y la determinación de cualquiera de los azúcares obtenidos (Espinosa, León, & Rodríguez, 2013). El método tradicional que se usa para la cuantificación de lactosa en la actualidad, se conoce como el método DNS, el cual se ejecuta para estudios en el siguiente artículo encontrado:

En cuarto lugar, de acuerdo a la revisión bibliográfica planteada en el documento “*Medida de la concentración de lactosa*” por el autor Campuzano el método DNS reacciona únicamente con los azúcares reductores. Por lo tanto, la lactosa luego de su hidrólisis en medio ácido se convierte en galactosa y glucosa, dos compuestos que son reductores y reaccionan con el DNS generando la coloración de un producto que de acuerdo a la concentración de lactosa es proporcional. Sin embargo, para medir la lactosa por el método de DNS se requiere de una desproteinización y una neutralización de la muestra a medir. Del mismo modo, de acuerdo a la literatura consultada en el documento, el método tiene un límite de cuantificación de 2 mg/mL lactosa, con lo cual se realiza una curva patrón con diferentes concentraciones de lactosa para conocer qué cantidad de lactosa tiene la muestra. Finalmente, se concluye que la cuantificación de lactosa por el método del DNS es en gran porcentaje errónea, ya que sus dos monosacáridos presentan coloración al reaccionar con el DNS y, por lo tanto, no se conoce cuál de las dos biomoléculas se está cuantificando (Campuzano, 2013).

En conclusión, el análisis cualitativo y cuantitativo de concentraciones de algunos compuestos se ha fortalecido mediante el análisis por técnicas instrumentales como los que se mencionaba anteriormente; sin embargo, lo engorroso de los procedimientos, los largos tiempos de análisis y los altos costos tecnológicos, llaman la atención para plantear estrategias innovadoras paralelas a las técnicas existentes (Espinosa, León, & Rodríguez, 2013).

4.3.2. Antecedentes de los biosensores utilizados para cuantificar el disacárido lactosa o alguno de sus sacáridos

Alrededor de 60 años los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización en aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico. En 1962, el sensor enzimático fue el primer desarrollo para determinar la concentración de glucosa en sangre a través de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa, acoplándola a un electrodo selectivo de oxígeno. Posteriormente, las enzimas inmovilizadas permitieron el desarrollo de biosensores para urea y su reconocimiento fue quince años más tarde con publicaciones de carácter científico (Malhotra et al., 2005).

A lo largo del tiempo ha aumentado los reportes sobre avances en biosensores, debido al rápido crecimiento de biomateriales, en donde, la respuesta generada como resultado de la reacción bioquímica es detectada por un transductor para dar una señal (óptica / eléctrica / térmica) que puede ser amplificada para la estimación de la concentración de un analito en una muestra determinada. Entre los diversos tipos de biosensores, los sensores electroquímicos, especialmente voltamperométricos, ocupan actualmente una posición de liderazgo (Malhotra et al., 2005).

En primer lugar, en el estudio nombrado “*Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, β -galactosidasa and mutarotase in β -cyclodextrin polymer*”, se desarrolló un biosensor amperométrico sensible a glucosa y lactosa, utilizando glucosa oxidasa, β -galactosidasa, mutarotasa y ferroceno en el polímero de β -ciclodextrina, los cuales se relacionan entre sí. Para evaluar el funcionamiento del biosensor tuvieron en cuenta: tiempo de respuesta, límite de detección, selectividad, dependencia del potencial aplicado, temperatura y pH, así como la estabilidad operativa y de almacenamiento; concluyendo que la estabilidad de la membrana enzimática parte del polímero de β -ciclodextrina, debido a la capacidad de absorción de agua del polímero (Liua et al., 1998). Motivo por el cual, el documento citado dio a conocer estrategias para la evaluación del rendimiento del biosensor a partir de parámetros característicos de la respuesta, indicando el mejoramiento y avance de los estudios en laboratorio realizados; además, que brindó un método de comparación y determinación de varios tipos de electrodos que son compatibles entre si.

En segundo lugar, fue publicado el artículo “*Single-wall carbon nanotubebased voltammetric sensor and biosensor*” en el año 2004, en el cual, a partir de la sensibilidad al pH del electrodo de nanotubos de carbono de pared simple se estudió la técnica de voltametría de pulso diferencial, obteniendo como resultado un valor en el orden de la potencia, que podría alcanzar el equilibrio dentro de los 5 primeros minutos junto con una buena estabilidad operativa. Los biosensores voltamétricos de ureasa y acetilcolinesterasa se construyeron inmovilizando las enzimas con material híbrido sol-gel, en donde, el desplazamiento potencial máximo podría alcanzar 0.130 V y 0.220 V para urea y acetiltiocolina (Xu et al., 2004). Entonces, dicha información se aplicó al presente trabajo de grado, para analizar los métodos desarrollados en la obtención de un voltaje como dato de cuantificación

de la lactosa.

En tercer lugar, en el año 2005 los autores del artículo "*Third Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase*", hablaron del principio de funcionamiento y de las características que posee un biosensor de lactosa basado en un diseño de tercera generación que implica la celobiosa deshidrogenasa, puesto que se fundamenta en la transferencia de electrones entre dos celobiose deshidrogenasas (CDH) recién descubiertas, de los hongos de pudrición blanca *Trametes villosay Phanerochaete*, y un electrodo de grafito espectrográfico. Al ser evaluado da como resultado un límite de detección para lactosa de $1 \mu\text{M}$, un tiempo de respuesta de 4 s y un rango lineal de 1 a $100 \mu\text{M}$ de lactosa. De tal manera, dichos resultados y simplicidad de la construcción hicieron que el detector de lactosa sea una buena alternativa para su uso en biosensores, como para cuantificar el contenido de lactosa en leche pasteurizada y suero de leche utilizando el método de adición estándar (Stoica et al., 2005). Este artículo fue de ayuda para el desarrollo de este proyecto de grado, ya que se pudo relacionar como una posible metodología selectiva para la detección de lactosa presente en lactosuero residual.

En cuarto lugar, en el estudio titulado "*Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by ACelectrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk*", se desarrolló la investigación de dos enzimas β -galactosidasa y glucosa oxidasa para fabricar un sensor detector de lactosa, mediante la deposición de estas por el método de electroforesis de corriente alterna. Luego de que construyeron el sensor, este les arrojó una sensibilidad de 111 nA/mMmm^2 , un tiempo de respuesta de aproximadamente 8 s en un rango de 14 mM de lactosa y una estabilidad razonable, ya que no implementa membranas externas. Por lo que, se evaluó el funcionamiento del sensor, dando respuesta precisa y siendo un instrumento económico y de fácil manejo (Amman & Fransaer, 2010). La metodología implementada en el estudio fue analizada a mayor profundidad, puesto que se evaluó y cumplió con los objetivos propuestos en el presente trabajo de grado.

En quinto lugar, en 2010 en el artículo "*An Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of Lactose in Milk and Dairy Products*", se da a conocer un biosensor amperométrico integrado para la determinación de lactosa, enfocado en un bioelectrodo de oro modificado con monocapas monomarcadas (SAM) de ácido 3-mercaptopropiónico (AMP) en el que las enzimas β -galactosidasa (β -Gal), glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (HRP) y el mediador tetratiafulvaleno (TTF) se co-inmovilizan mediante una membrana de diálisis, proceso en el cual ocurre hidrólisis de lactosa que da como resultado glucosa que es reducida enzimáticamente, dando lugar a una señal amperométrica proporcional a la concentración de lactosa que fue evaluada gráficamente. Las gráficas indicaron un rendimiento adecuado para que el biosensor sea implementado en la determinación de lactosa en leche y otros alimentos, además, corroboraron su uso en comparación a kits enzimáticos comerciales (F et al., 2010). El desarrollo mencionado anteriormente, permitió visualizar para el proyecto de grado qué campos de la química analítica se debían estudiar para entender el comportamiento de

los compuestos químicos con relación a la generación de hidrólisis y óxido-reducción, dependiendo de la metodología selectiva, del tipo de componente químico y del electrodo seleccionado para producir un cambio de voltaje significativo.

En sexto lugar, el documento de revisión con nombre *“Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry”* fue publicado por Aicheng Chen y Badal Shaha en 2013, en donde hablan a nivel conceptual sobre el estudio, comportamiento e implementación de la voltametría de onda cuadrada (SWV) para el desarrollo de biosensores electroquímicos en los últimos años debido a su selectividad y sensibilidad. Por ende, la voltametría se utiliza para el estudio de las reacciones enzimáticas, que conllevan a un diagnóstico y análisis ambiental, llevando a que los biosensores electroquímicos por voltametría de onda cuadrada sean innovadores y llamativos en el mercado (Chen & Shaha, 2013). Por lo anterior, el documento dio a conocer información acerca del uso y las ventajas de la voltametría de onda cuadrada para la construcción de biosensores de tipo electroquímico, como lo es en el área medio ambiental e industrial, teniendo como parámetros fundamentales la selectividad y sensibilidad para dar confiabilidad en sus resultados y haciendo de los biosensores electroquímicos productos con éxito en el mercado.

En séptimo lugar, según el artículo *“Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly (1,5 diaminonaphthalene) film”* publicado por la revista Current Applied Physics en 2015, se desarrolló un biosensor de lactosa por co-inmovilización de β -galactosidasa y glucosa oxidasa en microelementos modificados con platino y grafeno para la identificación de lactosa. El grafeno se sintetizó por vapor químico y fue insertado en la superficie de los electrodos por electropolimerización, proceso que fue analizado por voltametría cíclica para indicar que dicha película inducía mejor señal de corriente y, por consiguiente, es novedosa para el área de biosensores electroquímicos (HaiNguyen, ThanhNguyen,& Vu, 2015). Lo anterior, permitió identificar y analizar la manera en cómo los autores co-inmovilizaron las enzimas por grafeno para brindar una sensibilidad mayor en el biosensor de lactosa.

En último lugar, en 2017 se publicó el trabajo llamado *“Determination of lactose in milk products: a comparison of three-enzyme amperometric biosensor and gas chromatography/tandem mass spectrometry”*, el cual trata sobre la presentación de dos métodos para la determinación de lactosa. El desarrollo de este biosensor consistió en tres enzimas: β -galactosidasa, glucosa oxidasa y peroxidasa, por lo que, los primeros experimentos se llevaron a cabo con el biosensor de peroxidasa mediante voltametría cíclica, lo que concluyó que el ferroceno fue el mejor mediador para dicho estudio. Por otro lado, escogieron dos materiales de electrodos y el más eficiente fue el grafito electroscópico, ya que obtuvo mejor respuesta electroquímica. Y para la detección directa de lactosa utilizaron tres métodos: tampón de fosfato, cromatografía de gases y determinación directa de lactosa, de los cuales la cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas ofrece una mayor sensibilidad y selectividad ortogonal (Kučerová, Komenská, & Tomková, 2017). Dicho trabajo brindó herramientas para justificar el porqué del metodología selectiva establecida en el proyecto de grado

para la detección de lactosa y el cómo se evaluó su viabilidad y funcionamiento, en comparación con otros métodos comerciales.

4.3.3. Biosensor desarrollado en la actualidad para la cuantificación de lactosa en matrices lácteas (competencia en el mercado)

Hoy en día, existen grupos de investigación que ejercen control y seguimiento a las industrias para determinar si dentro de sus desechos industriales están liberando compuestos contaminantes en el medio ambiente. La labor de estos profesionales consiste en acompañar a la respectiva empresa en uno de sus sistemas de producción, analizar los residuos y determinar en qué niveles de contaminación están. Lo anterior es muy importante desde el punto de vista tecnológico, debido a la cantidad de empresas que están interesadas en conocer el impacto ambiental que realizan con su producción (Manizales, 2017).

Razón por la cual, actualmente hay grupos de investigación, empresas y multinacionales que se fundamentan en el desarrollo de biosensores de lactosa; como es el caso de la empresa Biolan creada en 2006 y considerada por la Comisión Europea como una de las 50 pymes más innovadoras, encargada de desarrollar biosensores para medir mediante reacciones biológicas los niveles de distintos elementos en productos alimenticios. Por lo que, esta empresa comercializará en todo el mundo su sensor para medir el nivel residual de lactosa en productos lácteos "sin lactosa.^a a través de la multinacional tecnológica DSM (Biolan, 2017).

El biosensor es conocido como BIOMILK 300, un *"dispositivo analítico compacto para la cuantificación de lactosa en matrices lácteas de una manera precisa, sencilla, rápida, con alta especificidad y selectividad de enzimas específicas con una transducción amperométrica de la señal, fácilmente detectable y cuantificable"*. De acuerdo a las características técnicas del funcionamiento del biosensor, los rangos del análisis se encuentran de acuerdo a las concentraciones de la muestra: 0-200 mg/L para muestras líquidas, rango de cuantificación 60-140 mg/L, error máximo del 15 %; 0-2 g/L para muestras tanto líquidas como sólidas, rango de cuantificación 0.6-1.4 g/L, error máximo del 15 %; 0-6 g/L para muestras tanto líquidas como sólidas, rango de cuantificación 1.8-4.2 g/L, error máximo del 15 % (Biolan, 2017).

4.4. Marco Geográfico

Sopó en lengua Chibcha "Piedra o Cerro Fuerte", es un municipio ubicado en una de las faldas de la Cordillera Oriental del departamento de Cundinamarca (Colombia) y localizado a 39 kilómetros al norte de la ciudad de Bogotá (Mapas y Guías, 2018).

Según el IDECUT, el 19 de noviembre de 1876 hubo un combate entre las fuerzas al mando del

General Alejo Morales y la Guerrilla de Guasca bajo ordenes del General José María Herrán en el puente de Sopó. El Valle de Sopó, políticamente estuvo conformado por tres territorios de la civilización muisca: El Cacicazgo de Sopó parte occidental del Valle, Cueca era la zona central y Meusa el área oriental. Y en la vereda de Pueblo Viejo (actualmente situada hacia al occidente del municipio), los españoles tenían un resguardo de indígenas con una capilla a cargo de los dominicos desde 1612. Por lo tanto, el nuevo pueblo de Sopó se fundó el 25 de mayo de 1653 por los indios muisca de Meusa, Cueca y Sopó (IDECUT, 2018).

A continuación se explica el contexto arqueológico, territorial, demografía y división político administrativa, condiciones económicas y ecosistémicas y, el sistema físico natural del municipio de Sopó, siendo el lugar geográfico donde se estudió la problemática que conllevó al desarrollo del presente trabajo de grado.

4.4.1. Contexto arqueológico de Sopó

El contexto arqueológico del municipio de Sopó se basa en los fundamentos de que esta población tiene una ubicación importante dentro de la geografía política de la sociedad muisca de los siglos XV y XVI ya que en este lugar se ubicaron los asentamientos indígenas principales de la región denominados Cueca, Sopó, Teusacá y Meusa (Figura 4-23); los cuales eran los asentamientos más cercanos al centro político de Bacatá, hoy en día conocido como el municipio de Funza y a lugares de importancia ritual como Guatavita y Chía, centros de producción de sal como Zipaquirá o de cerámica en la región de Tocancipá-Gachancipa (Jaramillo, 2015).

4.4.2. Contexto territorial del municipio de Sopó

El territorio de Sopó cuenta con una superficie de 111.5 kms^2 , una altitud de 2.585 m.s.n.m. , una temperatura media de $13 \text{ }^\circ\text{C}$ y sus coordenadas geográficas son: Latitud: 4.90933 , $4^\circ 54' 34''$ Norte; Longitud: -73.9408 , $73^\circ 56' 27''$ Oeste (Municipios de Colombia, 2020).

4.4.3. Demografía y división político administrativa del municipio de Sopó

El municipio de Sopó actualmente tiene una población de 21.014 *habitantes* con una densidad de población de $186,0 \text{ hab/km}^2$, el gentilicio de dichos habitantes es Soposeño/a. Por otro lado, los municipios vecinos de Sopó son: al Norte con Zipaquirá y Tocancipá, al Sur con La Calera, al Oriente con Guasca y Guatavita y al Occidente con Chía y Cajicá. E internamente, el municipio se encuentra constituido por 14 veredas y 2 centros urbanos, los cuales son: Briceño y Zona Centro (Figura 4-24) (Municipios de Colombia, 2020).

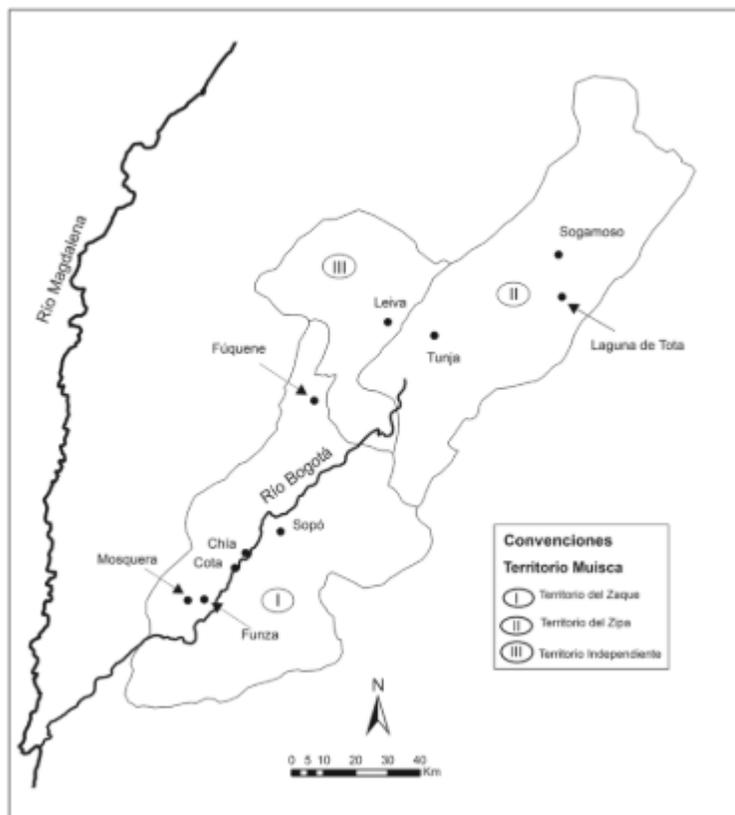


Figura 4-23.: Ubicación del municipio de Sopó en Colombia y detalle con límites intermunicipales, veredales y ubicación del casco urbano (Jaramillo, 2015).

4.4.4. Condiciones económicas del municipio de Sopó

En el municipio de Sopó la principal actividad económica es la agroindustria de derivados de lácteos, además algunas industrias dedicadas al sector de la construcción y la fabricación de fósforos, le sigue las actividades comerciales, de servicio y financieras. La representación porcentual de dichas actividades económicas en el municipio de Sopó son: Agroindustrial: 50 %, actividades de servicio, comerciales y financiera: 20 %, sector construcción: 20 % y otras: 10 % (DANE, 2015).

Argumentando lo anterior, en la gráfica circular de la Figura 4-25 se encuentran los porcentajes discriminados de la participación de cada sector económico en Sopó según el DANE, visualizando un mayor porcentaje en la industria manufacturera (agroindustria) con un porcentaje de 60.65 %, en la cual esta incluida la producción de lácteos (DANE, 2015).



Figura 4-24.: Ubicación del municipio de Sopó en Colombia y detalle con límites intermunicipales, veredales y ubicación del casco urbano (Jaramillo, 2015).

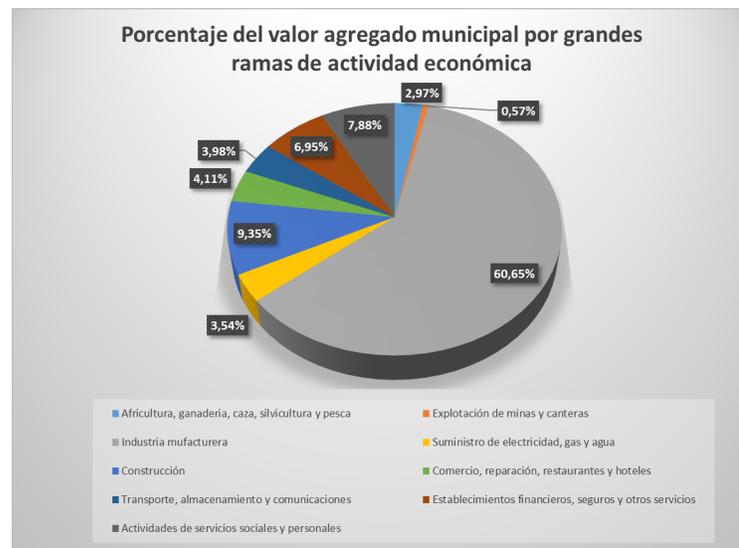


Figura 4-25.: Porcentaje del valor agregado municipal por grandes ramas de actividad económica, basado en DANE, 2015 y realizado por autoría.

4.4.5. Condiciones ecosistémicas del municipio de Sopó

El cerro Pionono es considerado el cerro más alto de Sopó, porque comprende alturas desde los 2.800 metros hasta los 3.250 metros, razón por la cual cuenta con unas características geomorfológicas como lo son: una reserva forestal; acuíferos; mamíferos como: liebres, zorrillo, armadillos, curíes; y aves como golondrinas, miras, copetones, reinitas, trogloditas, reptiles y anfibios (Alcaldía de Sopó, 2020).

La reserva forestal tiene un bosque montano bajo seco, subpáramos, bosque alto andino, bosques de encenillos y flora como: chite o escobo, raque, mora silvestre, chaque o roso, gaque ocucharo, chusque, ciro, uva camarona, uva de anís, manzano, retamo, hayuelo, cordoncillo, romero, briofitas y helechos; además de musgos y hepáticas que cumplen a función de esponja en la superficie del suelo (Alcaldía de Sopó, 2020).

4.4.6. Sistema Físico Natural de Sopó

El municipio de Sopó cuenta con la siguiente cartografía base de las cuencas, subcuencas, microcuencas (Figura 4-26) (Ramírez et al., 2018):

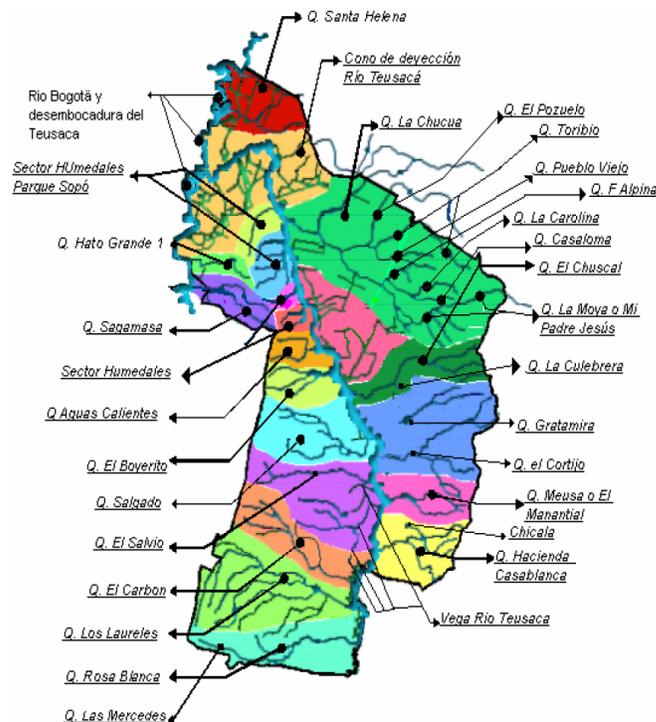


Figura 4-26.: Mapa cartográfico del Municipio de Sopó, Cundinamarca (Ramírez et al., 2018).

- Hidrología:

En la Tabla 4-1 se puede observar las mediciones que tienen que ver con la longitud corriente y área de las microcuencas y subcuencas del municipio de Sopó que conforman el Río Bogotá. En la cual se ve que la mayor longitud y área es el tramo 1 del río Teusacá con tributarios margen izquierda (23.1 km y 31.58 km^2), mientras que la microcuenca con menor longitud y área es la quebrada El Carbón (7.3 km y 10.9 km^2) (Ramírez et al., 2018).

Tabla 4-1.: Longitud corriente y área de las microcuencas y subcuencas del municipio de Sopó que conforman el Río Bogotá (Ramírez et al., 2018).

Cuenca	Subcuenca	Microcuenca	Longitud corriente (km)	Área (km^2)
Río Bogotá	Río Teusaca	Quebrada Los Laureles	7.3	10.9
Río Bogotá	Río Teusaca	Quebrada El Carbón	4.5	5.07
Río Bogotá	Río Teusaca	Tramo 1 río Teusaca con tributarios margen izquierda	23.1	31.58
Río Bogotá	Río Teusaca	Tramo 2 río Teusaca con tributarios margen derecha	14.3	29.14
Río Bogotá	Río Teusaca	Quebrada Los Laureles	6.4	25.38

Por otro lado, el caudal (Q) en un 50% es regulado por el embalse de San Rafael a 2795 *m.s.n.m.* con una capacidad útil de 62 Hm^3 . Dicho embalse hace parte del sistema de abastecimiento de agua del Chingaza, mediante túneles hasta la planta de tratamiento Wiesner (Ramírez et al., 2018).

Tabla 4-2.: Oferta de caudales en la población de Sopó (Ramírez et al., 2018).

Q1 (m^3/s)*	Q2 (m^3/s)*	Q3 (m^3/s)*	Q4 (m^3/s)*
4.58	1.49	2.76	6.23

Donde: Q1 Caudal de oferta medio anual generado. Q2 Caudal de oferta mes más seco. Q3 Caudal de oferta promedio meses más seco. Q4 Caudal de oferta meses más húmedos (Ramírez et al., 2018).

* La oferta de agua del río Teusacá proviene del aporte conjunto de las aguas que corren en superficies subterráneas que contiene y las aguas lluvias que recibe (Ramírez et al., 2018).

- Oferta y demanda hídrica: Para la oferta y demanda hídrica se analiza el cálculo del balance hídrico, donde se ve la columna de las ofertas y del promedio anual del caudal (m^3/s), de donde se puede decir que la mayor oferta es $4.58 m^3/s$ para el agua superficial de la cuenca, la cual es utilizada en su mayoría para el uso agropecuario con $4.96 m^3/s$ de demanda (Ramírez et al., 2018).

Tabla 4-3.: Cálculo del Balance Hídrico
(Ramírez et al., 2018).

OFERTA	CAUDAL PRO- MEDIO ANUAL (m^3/s)
Agua superficial de la cuenca	4.58
Aguas lluvias	2.9
Aguas subterráneas	0.15
Total oferta	7.63
DEMANDA	
Uso agropecuario	4.96
Uso industrial	0.002
Uso domestico	0.103
Total Demanda	5.065
BALANCE	2.565

Teniendo en cuenta la hidrología del municipio de Sopó, se pudo ubicar geográficamente la problemática planteada por varios medios de comunicación acerca del inadecuado monitoreo y control de las aguas residuales vertidas a las subcuencas y microcuencas del municipio por parte de más de 30 empresas asentadas allí, ya que parte de esas empresas según la CAR, no cuentan con el permiso de vertimientos por la normativa colombiana. Esta afectación se da en las quebradas La Chucua y Mi Padre Jesús, que conducen a los ríos Teusacá y Bogotá, y el embalse de Tibitó (Tiempo, 2016).

4.5. Marco Normativo

Dentro del contenido del marco normativo se da a conocer las dos normativas colombianas encargadas de la regulación y monitoreo de los vertimientos industriales, como se observa en el índice 4.3.1. Resolución 631 de 2015, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Y en especial en el índice 4.3.2. Decreto número 616 de 2006, Ministerio de Protección Social, donde se habla de los requisitos y límites permisibles de algunos componentes contaminantes presentes en el lactosuero residual de las industrias lácteas, siendo de mayor importancia el límite de lactosa permisible para los vertimientos de lactosuero.

4.5.1. Resolución 631 de 2015, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible

La resolución tiene presente el arreglo del sistema de medición para los factores contaminantes que se pueden dar en las aguas residuales, por lo que definen unos límites máximos de concentraciones para cada uno de los parámetros contaminantes según la empresa que los genere. Es por lo anterior, que la normativa debe ser aplicada por todos los que realicen vertimientos a alcantarillados públicos y a aguas superficiales, especialmente, por las empresas, las cuales deben solicitar permisos que serán otorgados cuando se presenten análisis del balance de materia y caracterización del agua de captación y de vertimiento y, estos se encuentren dentro del rango dado por el estado, de acuerdo a la actividad económica desarrollada (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015).

”Siendo responsabilidad de las empresas efectuar los estudios necesarios y entregar resultados a la autoridad ambiental, quienes reportarán la información al Sistema de Información de Recurso Hídrico”. Posteriormente, con esos resultados la empresa debe establecer planes de acción para asegurar el cumplimiento de la gestión ambiental y de la resolución de vertimientos (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015).

4.5.2. Decreto número 616 de 2006, Ministerio de Protección Social

El decreto número 616 de 2006, establece el reglamento técnico acerca de los requisitos que debe cumplir la leche extraída de animales bovinos, caprinos y bufalinos destinada para consumo humano, protegiendo la seguridad humana, la salud y previniendo que las prácticas industriales generen error, confusión o engaño a los consumidores (Ministerio de protección social, 2006).

Las reglamentaciones técnicas del decreto se aplican a:

1. *”La leche, obtenida de animales de la especie bovina, bufalina y caprina destinada a la producción de la misma, para consumo humano”* (Ministerio de protección social, 2006).

2. *"Todos los establecimientos donde se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice y expendan leche destinada para consumo humano en el territorio nacional"* (Ministerio de protección social, 2006).
3. *"Las actividades de inspección, vigilancia y control que ejerzan las autoridades sanitarias sobre obtención, procesamiento, envase, almacenamiento, transporte, distribución, importación, exportación y comercialización de leche"* (Ministerio de protección social, 2006).

Por lo tanto, de acuerdo a las anteriores normativas mencionadas, el límite permisible de lactosa presente en el lactosuero residual de los vertimientos generados por las industrias lácteas debe ser menor a 5 g/dL , es decir, inferior al 8.5% m/m (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015), (Ministerio de protección social, 2006).

5. Metodología

Para llevar a cabo el desarrollo de un prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual de la industria láctea, como alternativa para el monitoreo de sus vertimientos en el Municipio de Sopó, se tuvo en cuenta el cumplimiento de una serie de procesos que fueron realizados en los laboratorios de: química, electrónica y prototipado de la Universidad El Bosque.

A continuación, se explica de manera detallada cada una de las fases que dieron cumplimiento a los objetivos del presente proyecto, la metodología está fundamentada en el modelo de metodología de prototipos incrementales. Los procesos realizados en cada una de las fases, fueron corroborados por lineamientos de control de calidad analíticos para verificar la eficiencia de la metodología establecida.

5.1. Fase I. Metodología de detección selectiva de lactosa

Para llevar a cabo el desarrollo del primer objetivo, la fase se dividió en cuatro secciones (Figura 5-1):

- Búsqueda bibliográfica de metodologías implementadas para detección de lactosa;
- Cálculo de las cantidades de los componentes químicos a utilizar mediante estequiometría;
- Selección del agente oxidante que interactuó de la mejor manera con el compuesto hidrolizante y la matriz simulada de lactosuero;
- Evaluación mediante lineamientos de control de calidad de los componentes y metodología seleccionada para su implementación en lactosuero residual de la industria láctea.

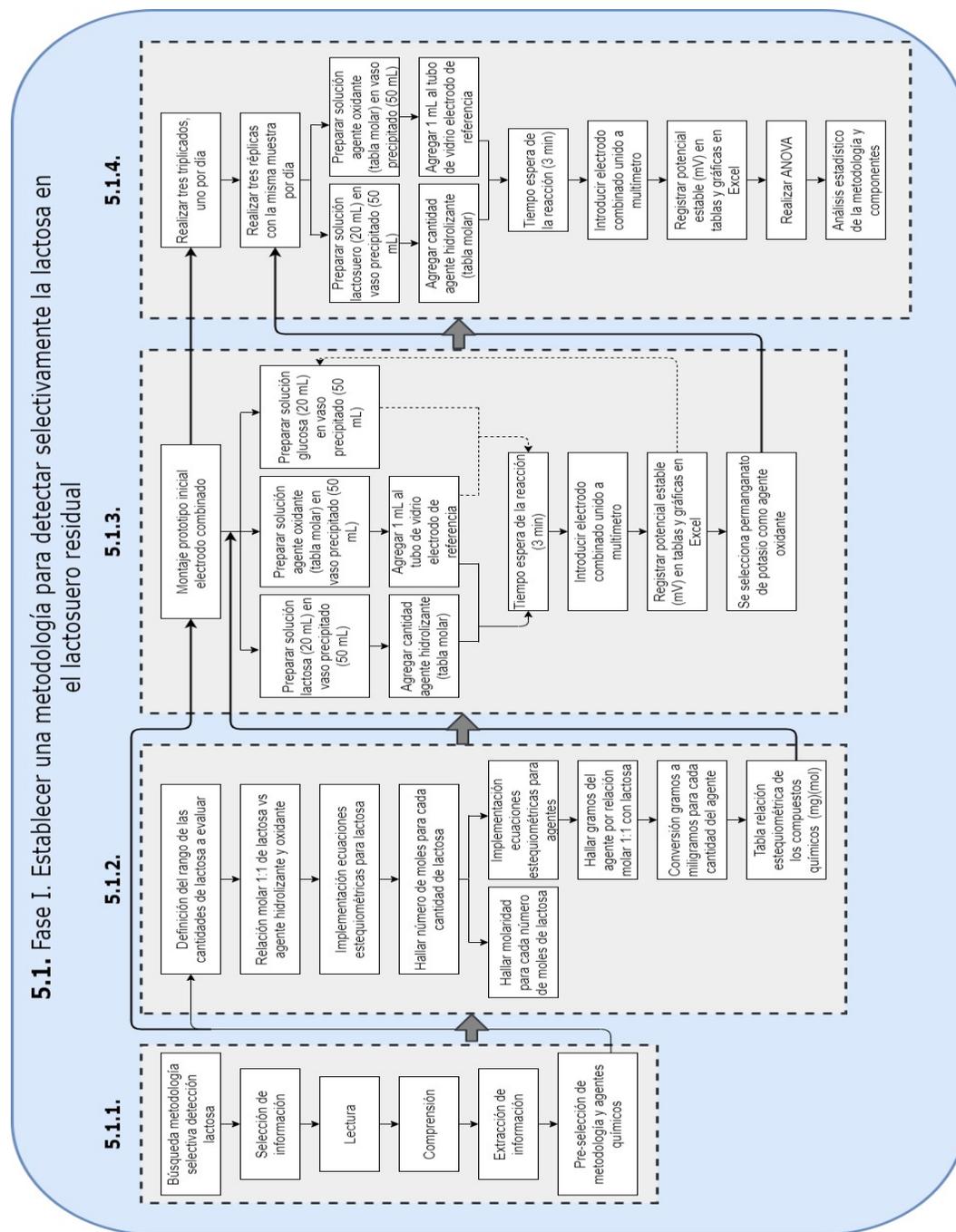


Figura 5-1.: Fase I. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el primer objetivo por cuatro secciones. Fuente: Autor.

5.1.1. Metodologías implementadas para detección de lactosa

Se realizó la búsqueda de una metodología selectiva para la detección de lactosa presente en el lactosuero residual, partiendo de la revisión bibliográfica de algunos antecedentes (Ver Sección 4.3), que previamente fueron investigados, seleccionados y analizados, con el fin de extraer información relevante que condujera a la construcción de la metodología implementada, teniendo en cuenta que hasta el momento no se han realizado biosensores para detectar lactosa en aguas residuales, sino únicamente en compuestos alimenticios.

Una vez filtrada la información, esta es acondicionada para llevar a cabo la detección únicamente de la lactosa por parte del prototipo de laboratorio de biosensor; sin embargo, no solo se tuvo que realizar la búsqueda de antecedentes sino también de un marco geográfico, conceptual, teórico y legal (Ver Secciones 4.3, 4.4, 4.2, 4.1 y 4.5), para adquirir un conocimiento sobre: el funcionamiento, composición, ventajas y desventajas de un biosensor electroquímico, así como de la interacción de la lactosa con componentes químicos y electrónicos para su detección y cuantificación, sin necesidad de ser inhibida por otros compuestos presentes en el lactosuero residual o interferida por el prototipo de laboratorio del biosensor construido; teniendo presente que su respuesta debe ser selectiva, en el menor tiempo posible, con rangos de detección dados por la normativa colombiana y las condiciones geográficas del municipio de donde proviene la muestra de estudio (Sopó, Cundinamarca).

Llegando así, a la conclusión de evaluar la metodología selectiva establecida bibliográficamente para la detección de lactosa en el lactosuero residual. Esta consistió en hidrolizar el disacárido lactosa en glucosa y galactosa por medio del compuesto ácido clorhídrico, luego se procedió a la oxidación del monosacárido glucosa mediante un agente oxidante como: permanganato de potasio, Sulfato de Cobre (II) o cloruro de calcio a ácido glucónico; obteniendo una reacción química espontánea que genera energía eléctrica, la cual fue transferida a una etapa de instrumentación por medio de un par de electrodos, para que fuera registrada, acondicionada y visualizada al usuario.

5.1.2. Estequiometría de las cantidades del agente hidrolizante y oxidante

El análisis estadístico para establecer la metodología selectiva, parte de un sistema de evaluación de cantidades de lactosa en un medio acuoso por medio de los componentes químicos y electrodos pre-seleccionados que conforman el electrodo combinado. Por ende, el sistema de evaluación consistió en un aumento proporcional de la cantidad de lactosa, del compuesto hidrolizante y del agente oxidante, es decir, si se aumentaba la cantidad de la muestra de lactosa entonces se debía aumentar en igual cantidad la muestra del compuesto hidrolizante y del agente oxidante en términos de

relación molar (Química. American Chemical, 2005).

Por tal motivo, todas las pruebas de laboratorio fueron realizadas bajo una relación estequiométrica de la cantidad de lactosa y los compuestos químicos a implementar, como se indica en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1.: Relación estequiométrica de los compuestos químicos para la hidrólisis de la lactosa y oxidación de la glucosa en términos de relación molar. Fuente: Autor.

Cantidad de lactosa (<i>mg</i>)(<i>mol</i>)	Ácido clorhídrico (<i>mg</i>)(<i>mol</i>)	Permanganato de potasio (<i>mg</i>)(<i>mol</i>)
50($1,46 \times 10^{-4}$)	5,32($1,46 \times 10^{-4}$)	23,07($1,46 \times 10^{-4}$)
100($2,92 \times 10^{-4}$)	10,64($2,92 \times 10^{-4}$)	46,14($2,92 \times 10^{-4}$)
150($4,38 \times 10^{-4}$)	15,96($4,38 \times 10^{-4}$)	69,22($4,38 \times 10^{-4}$)
200($5,84 \times 10^{-4}$)	21,29($5,84 \times 10^{-4}$)	92,29($5,84 \times 10^{-4}$)
250($7,30 \times 10^{-4}$)	26,66($7,30 \times 10^{-4}$)	115,36($7,30 \times 10^{-4}$)
300($8,76 \times 10^{-4}$)	31,94($8,76 \times 10^{-4}$)	138,44($8,76 \times 10^{-4}$)
350($1,02 \times 10^{-3}$)	37,18($1,02 \times 10^{-3}$)	161,19($1,02 \times 10^{-3}$)
400($1,17 \times 10^{-3}$)	42,65($1,17 \times 10^{-3}$)	184,89($1,17 \times 10^{-3}$)
450($1,31 \times 10^{-3}$)	47,76($1,31 \times 10^{-3}$)	207,02($1,31 \times 10^{-3}$)
500($1,46 \times 10^{-3}$)	53,23($1,46 \times 10^{-3}$)	230,73($1,46 \times 10^{-3}$)

En la Tabla 5-1, las cantidades en el orden de los *mg* de cada compuesto químico se obtuvieron a partir de la relación estequiométrica de las cantidades entre los reactivos y productos que llevan a la hidrólisis de la lactosa y luego a la oxidación de la glucosa en un medio acuoso. Para lo cual, se tuvo que evaluar la ecuación química de cada reacción, el número de moles y la cantidad de productos a obtener, llegando a proponerse una relación de masa de cada reactivo y producto que interviene en las reacciones en función de su cantidad de moles. La relación molar que se obtuvo entre los productos y reactivos, permitió conocer la cantidad del reactivo que se utilizó y la cantidad del producto que se generó; lo que hizo que el rendimiento y resultados de la reacción fuera lo requerido, confiable y eficiente, sin tener que desperdiciar materia prima u obtener datos erróneos y poco proporcionales.

De acuerdo a los datos presentes en la Tabla 5-1 y a la relación molar 1:1 de las reacciones químicas (hidrólisis y oxidación), se realizó la determinación de las concentraciones de lactosa (*mol/L*) y las cantidades de ácido clorhídrico y permanganato de potasio (*mg*) (Química. American Chemical, 2005). Para lo cual, se implementaron las siguientes ecuaciones estequiométricas:

$$\text{Número de moles (mol)} = \frac{\text{masa en gramos (g)}}{\text{peso molecular } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} \quad (\text{Bonetto, 2013}) \quad (5-1)$$

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{\text{numero moles soluto (mol)}}{\text{volumen disolucion (L)}} \quad (\text{Bonetto, 2013}) \quad (5-2)$$

En primer lugar, se desarrollaron las ecuaciones anteriormente mencionadas (Ecuaciones 5-1 y 5-2) de acuerdo a las masas de lactosa a pesar en la balanza digital y que se encuentran dentro del rango dado por la normativa colombiana, con las cuales se evaluó y caracterizó el prototipo de laboratorio de biosensor (Ecuaciones 5-3 y 5-4).

$$\text{moles (mol)} = \frac{0,05 \text{ g}}{342,30 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 1,46 \times 10^{-4} \text{ mol Moles (0.05 g de lactosa)} \quad (5-3)$$

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{1,46 \times 10^{-4} \text{ mol}}{0,02 \text{ L}} = 7,3 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ Molaridad (0.05 g de lactosa)} \quad (5-4)$$

Después de tener las concentraciones de lactosa en términos de mol/L , en segundo lugar, se determinó los miligramos a aplicar del agente hidrolizante (ácido clorhídrico) para cada concentración de lactosa. Teniendo en cuenta, que como se mencionó en el marco teórico el agente hidrolizante descompone el disacárido en glucosa y galactosa, siendo la glucosa el producto necesario para la siguiente etapa de relación molar (Ver sección 4.1).

Es por lo anterior, que las ecuaciones estequiométricas para determinar los miligramos correspondientes del agente hidrolizante son las siguientes:

$$\text{gramos HCl (g)} = 1,46 \times 10^{-4} \text{ mol(HCl)} \times \left(\frac{36,46 \text{ g HCl}}{1 \text{ mol HCl}} \right)$$

$$\text{gramos HCl (g)} = 5,32 \times 10^{-3} \text{ g(HCl)} \quad (5-5)$$

$$\text{miligramos } HCl (mg) = 5,32 \times 10^{-3} g(HCl) \times \left(\frac{1000 mg}{1 g} \right)$$

$$\text{miligramos } HCl (mg) = 5,32 mg(HCl) \quad (5-6)$$

La Ecuación 5-5 permitió determinar los gramos de ácido clorhídrico para $50 mg$ o $1,46 \times 10^{-4} mol$ de lactosa, teniendo presente que es una relación 1:1, es decir, los números de moles de lactosa son los mismos de ácido clorhídrico y por ende de glucosa. Entonces $1,46 \times 10^{-4} mol$ de ácido clorhídrico por el peso molecular del ácido clorhídrico ($36,46 g/mol$), da como resultado $5,32 \times 10^{-3} g$ de ácido clorhídrico. Con la Ecuación 5-6 se hallaron los miligramos de ácido clorhídrico necesarios para realizar la hidrólisis de lactosa en la matriz de lactosuero residual, multiplicando los gramos de ácido clorhídrico por la fracción de conversión de gramos a miligramos.

En tercer lugar, se determinó la concentración del agente oxidante (permanganato de potasio) porque este es el componente químico que permite la oxidación de la glucosa. Para ello, se procedió a utilizar las mismas ecuaciones estequiométricas usadas en la determinación de los miligramos del agente hidrolizante, ya que es una reacción química con relación 1:1 (Ver Ecuaciones 5-7 y 5-8).

$$\text{gramos } KMnO_4 (g) = 1,46 \times 10^{-4} mol(KMnO_4) \times \left(\frac{158,034 g KMnO_4}{1 mol KMnO_4} \right)$$

$$\text{gramos } KMnO_4 (g) = 2,31 \times 10^{-2} g(KMnO_4) \quad (5-7)$$

$$\text{miligramos } KMnO_4 (mg) = 2,31 \times 10^{-2} g(KMnO_4) \times \left(\frac{1000 mg}{1 g} \right)$$

$$\text{miligramos } KMnO_4 (mg) = 23,1, mg(KMnO_4) \quad (5-8)$$

Como se observa en la Ecuación 5-7, se determinó los gramos de permanganato de potasio a utilizar para $1,46 \times 10^{-4} mol$ de glucosa y por ende de permanganato de potasio y en la Ecuación 5-8 se

realizó la conversión de gramos a miligramos de la cantidad requerida del agente oxidante para oxidar la glucosa presente en la matriz de lactosuero residual.

Por ende, la relación molar que se realizó para las ecuaciones químicas de la hidrólisis de lactosa y oxidación de la glucosa, permitieron realizar unas pruebas de laboratorio seguras, con el uso eficiente de los compuestos químicos en el menor tiempo posible, sin errores prácticos y arrojando datos confiables para su análisis estadístico. De igual manera, la aplicación de la estequiometría para el desarrollo de un biosensor permite que el producto sea eficaz y económico en cuanto al uso de los compuestos químicos, además, que se manejan bajo una tabla de cantidades ya establecidas de acuerdo a la calidad del lactosuero residual a evaluar, permitiendo selectividad y fácil uso del biosensor sin necesidad de que el usuario sea capacitado o tenga experiencia en el manejo de este tipo de herramientas.

Ya habiendo pre-establecido y pre-seleccionado una metodología selectiva para detección de lactosa, unos pares de electrodos y agentes químicos a partir de referencias bibliográficas; así como habiendo creado la tabla estequiométrica que cuenta con un rango de cantidades de lactosa según la normativa colombiana y de los agentes químicos utilizados para el reconocimiento selectivo de la misma en términos de relación molar; se prosiguió con la evaluación y puesta en práctica de los resultados arrojados por los procesos anteriores, con la finalidad de establecer y evaluar una metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, al igual que caracterizar el tipo de transductor que permita transformar la señal generada por la reacción química en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa (Proceso realizado en el Laboratorio de Química de la Universidad El Bosque).

5.1.3. Selección del agente oxidante

Antes de proceder a evaluar la metodología selectiva y los agentes químicos preseleccionados, se realizó el montaje de un prototipo inicial de electrodo combinado que permitió realizar las pruebas químicas para evaluar la metodología selectiva pre-seleccionada por referencias bibliográficas y determinar los agentes químicos y electrodos que acompañan el biosensor; según los resultados arrojados por un multímetro o etapa de instrumentación (Figura 5-3). Los resultados fueron registrados en Excel, mediante tablas y curvas de calibración en términos de voltaje (mV) y concentración de lactosa o glucosa pura (mol/L), siendo luego analizadas estadísticamente, para permitir la elección de cada uno de los componentes y asegurar la eficiencia y selectividad del producto en cuanto al rango, varianza, regresión lineal y coeficiente de correlación de los valores obtenidos.

Se determinó el tipo de cofactor o agente oxidante que mejor interactúa con el proceso de oxidación

de la glucosa, mediante el análisis de los mismos en una matriz simulada de glucosa y lactosa y, con electrodos de grafito-grafito (más óptimos según referencias bibliográficas por el momento) para comparar la eficiencia y selectividad del agente oxidante al momento de entrar en contacto con la glucosa ya hidrolizada y con la glucosa pura sin necesidad de ser hidrolizada. Los cofactores que se evaluaron fueron: permanganato de potasio, Sulfato de Cobre (II) y cloruro de calcio.

El procedimiento implementado, para la evaluación de los tres cofactores, consistió en agregar a un vaso de precipitado de 50 mL: 20 mL de agua de la llave, 50 mg de glucosa pesados previamente en una balanza digital; junto con un vidrio reloj y una espátula cuchara. Y en otro vaso de precipitado de 50 mL: 20 mL de agua de la llave y 46.14 mg del cofactor correspondiente a evaluar, medido por una pipeta de Pasteur o una balanza digital según su estado físico (líquido o sólido). A continuación, se agregó 1 mL de la solución del cofactor en el interior del tubo de vidrio del electrodo de referencia, se selló con silicón y se introdujo el electrodo combinado (hace relación al electrodo de referencia e indicador) a la solución de glucosa preparada en el vaso de precipitado, generando un cambio de potencial al entrar en contacto el cofactor con la glucosa y realizando una reacción de tipo oxidación (Figura 5-2).

El cambio de potencial fue cuantificado por el multímetro, dato numérico en el orden de los milivolios que se llevó a una tabla en Excel de acuerdo a las concentraciones de glucosa evaluadas. Dicho procedimiento, se repitió para 100 mg, 150 mg y 200 mg de glucosa, con la respectiva cantidad del agente oxidante según estequiometría (Ver Tabla 5-1).



Figura 5-2.: Montaje inicial del electrodo combinado para la evaluación del Sulfato de Cobre (II) como agente oxidante. Fuente: Autor.

De igual manera, se realizó el mismo procedimiento químico con lactosa pura, componente que luego de disolverse en la solución acuosa junto con el compuesto hidrolizante, químicamente se descompuso en glucosa y galactosa, para luego oxidar la glucosa por el agente oxidante y ser detectada por los electrodos grafito-grafito.

Razón por la cual, se aplicaron 5.32 mg del compuesto hidrolizante ácido clorhídrico en un vaso de precipitado de 50 mL con 20 mL de agua de la llave y 50 mg de lactosa pesados previamente

en una balanza digital junto con un vidrio reloj y una espátula cuchara. La solución se disolvió y dejó actuar por 3 *min* antes de introducir el electrodo combinado (grafito-grafito) con cada uno de los cofactores pre-seleccionados para medir nuevamente voltajes (*mV*) por medio del multímetro, tabular los datos y poder realizar el análisis gráfico de los mismos, a partir del coeficiente de correlación dado en Excel.

A continuación, se analizaron los resultados obtenidos a partir de las gráficas generadas en Excel para cada cofactor de acuerdo al compuesto biológico usado (glucosa o lactosa). Se analizó el coeficiente de correlación para cada gráfica y se seleccionó el cofactor con mayor linealidad y menor porcentaje de error, dando como resultado el permanganato de potasio (Figura 5-3).

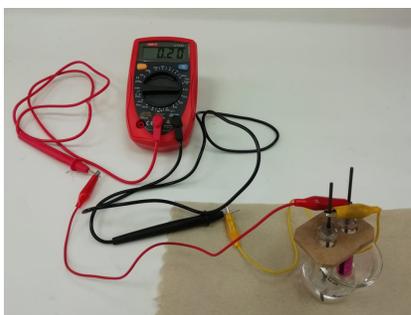


Figura 5-3.: Montaje inicial del electrodo combinado que permitió la selección del permanganato de potasio como agente oxidante. Fuente: Autor.

5.1.4. Lineamientos de control de calidad analíticos para corroborar la metodología selectiva en lactosuero residual

Habiendo seleccionado y evaluado el agente oxidante y el par de electrodos en una matriz simulada de lactosuero, se procedió a realizar los lineamientos de control de calidad analíticos en el lactosuero residual proveniente de queso campesino y doble crema de la industria láctea, con la finalidad de corroborar que los valores arrojados por el electrodo combinado sean lineales y proporcionales a los obtenidos con la matriz de lactosuero desarrollada en el laboratorio.

El procedimiento para llevar a cabo la corroboración de la linealización y caracterización de la etapa de reconocimiento, partió de tres triplicados durante tres días, donde cada triplicado estaba compuesto por tres réplicas de la muestra de lactosuero residual con una concentración incógnita de lactosa, la cual fue detectada a partir de la preparación de la reacción química según estequiometría (Ver Tabla 5-1) en tres vasos de precipitado de 50 *mL* y cuantificada por medio del montaje inicial del electrodo combinado (grafito-grafito) unido al multímetro (Figura 5-4).

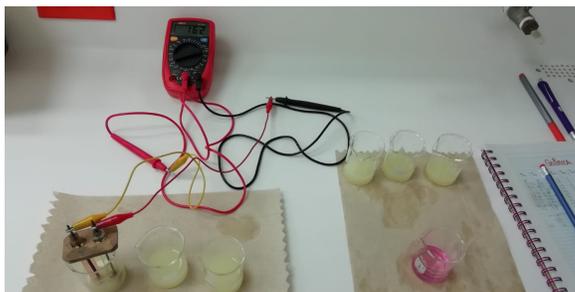


Figura 5-4.: Montaje para corroborar la metodología selectiva en lactosuero residual. Fuente: Autor.

En éste caso, para realizar la cuantificación de lactosa directamente de los dos tipos de lactosuero residual de la industria láctea, el montaje consistió en: tomar 20 *mL* del lactosuero campesino y agregarle 5.32 *mg* de ácido clorhídrico en un vaso de precipitado de 50 *mL*, disolverlo con una espátula cuchara y dejarlo actuar por 3 *min*. Al mismo tiempo, en otro vaso de precipitado de 50 *mL* se adicionaron 20 *mL* de agua de la llave con 23.07 *mg* del agente oxidante permanganato de potasio, se diluyó y se agregó 1 *mL* de esta solución al tubo de vidrio del electrodo de referencia, se selló con la tapa en silicón y se colocó el electrodo combinado (grafito-grafito) en la solución de lactosuero preparado. Luego, con ayuda del multímetro se midió los voltajes dados por la oxidación de la solución en milivoltios (Figura 5-4).

El procedimiento mencionado se repitió para las cantidades de los agentes químicos dadas por la tabla estequiométrica realizada en la sección 5.1.2. (Ver Tabla 5-1). Los valores arrojados durante el estudio de lineamiento de control de calidad analítico fueron ubicados en tablas y gráficas en Excel según el día de la medición de cada triplicado. Con las tablas obtenidas se procedió a realizar el análisis estadístico ANOVA. Concluyendo, que la etapa de reconocimiento del prototipo de biosensor se obtuvo linealizada y caracterizada como se deseaba desde un principio.

De acuerdo a los resultados dados por el análisis estadístico, se optó por diseñar y construir una etapa de instrumentación electrónica donde se realizó el acondicionamiento de la señal electroquímica, con la finalidad de estabilizar y calibrar mejor la medición obtenida en cada muestra de lactosuero residual de la industria láctea.

5.2. Fase II. Caracterización del transductor

El segundo objetivo o fase del proyecto de grado, se cumplió mediante el desarrollo de tres secciones (Figura 5-5):

- Búsqueda bibliográfica de varios pares de electrodos que pudieran constituir junto con el agente hidrolizante ácido clorhídrico y oxidante permanganato de potasio el electrodo combinado.
- Selección de un par de electrodos que interactuaran con los componentes biológicos resultantes de la reacción química del primer objetivo.
- Ejecución de los lineamientos de control de calidad analíticos para caracterizar los electrodos seleccionados en una matriz simulada de lactosuero.

5.2.1. Posibles pares de electrodos que constituyan el electrodo combinado

A partir de la revisión bibliográfica (Ver Sección 4.3) se realizó la selección de diversos pares de electrodos (electrodo indicador (cátodo) y electrodo de referencia (ánodo)), teniendo en cuenta que la reacción química obtenida del proceso de oxidación de la glucosa debe ser complementada con el proceso de transferencia de cargas o funcionamiento óptimo por potencial de contacto. Razón por la cual, inicialmente se escogió los electrodos de grafito-grafito, así como en segunda instancia grafito-zinc, grafito-cobre y cobre-zinc; ya que de acuerdo a sus propiedades tienen un nivel alto de selectividad, respuesta electroquímica y propagación de la diferencia de potencial.

5.2.2. Selección de un par de electrodos

Se realizó la selección del par de electrodos que constituyen el electrodo combinado, cuyo procedimiento consistió en tomar las cuatro combinaciones de electrodos pre-seleccionados (grafito-grafito, grafito-zinc, grafito-cobre y cobre-zinc), acondicionarlos al montaje inicial del electrodo combinado, preparar la matriz simulada del lactosuero residual con concentraciones conocidas por estequiometría (Ver Tabla 5-1), sumergir el electrodo combinado con el respectivo par de electrodos a la matriz de lactosuero y posteriormente tomar registro de los voltajes (mV) obtenidos mediante un multímetro.

Por lo tanto, en un vaso de precipitado de 50 mL se agregó 20 mL de agua de la llave, 50 mg de lactosa pesados por una balanza digital y 5.32 mg del agente hidrolizante ácido clorhídrico medidos por una pipeta de Pasteur; se agitó con una espátula cuchara y dejó actuar por 3 min , descomponiéndose el disacárido lactosa en los monosacáridos glucosa y galactosa. Luego se procedió a oxidar la glucosa para facilitar su detección por parte de los electrodos.

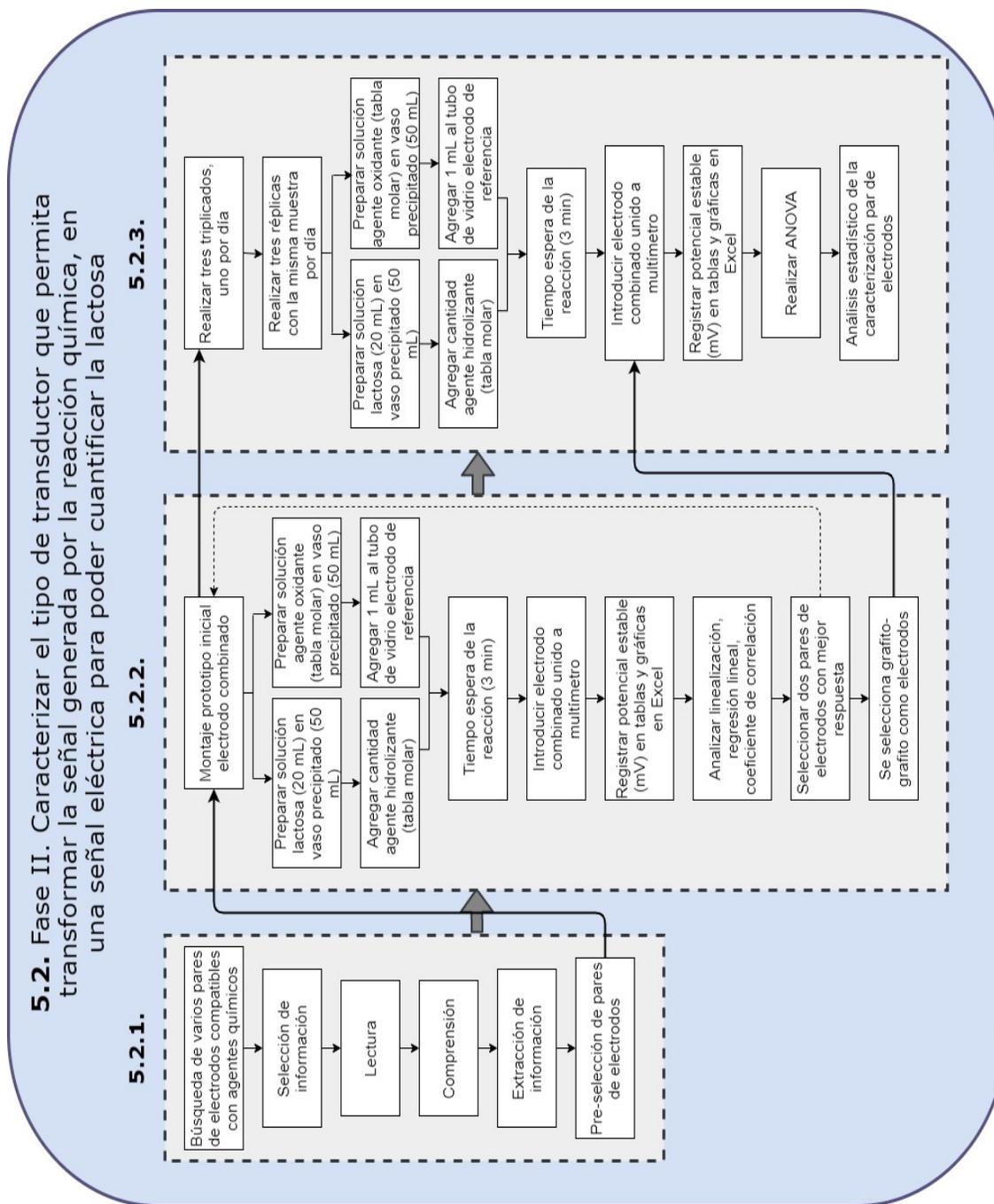
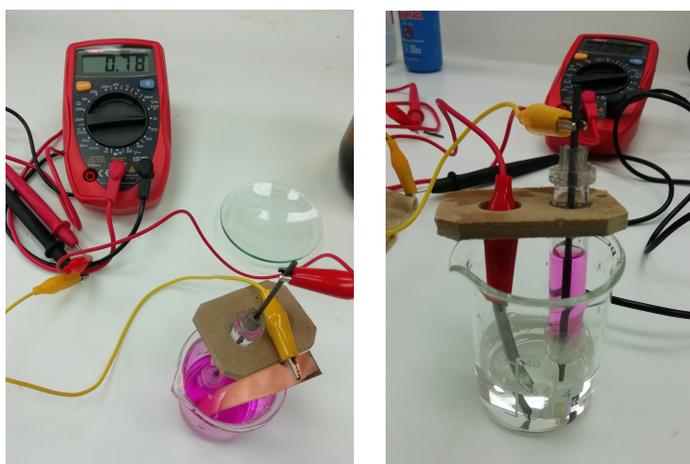


Figura 5-5.: Fase II. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el segundo objetivo por tres secciones. Fuente: Autor.

Mientras transcurrieron los minutos, en otro vaso de precipitado de 50 mL se adicionaron: 20 mL de agua de la llave y con ayuda de una pipeta de Pasteur 23.07 mg de permanganato de potasio como agente oxidante, se disolvió la solución con una espátula cuchara hasta quedar homogénea. Después, se agregó 1 mL de la solución homogénea del agente oxidante al electrodo de referencia, por el extremo inferior del tubo de vidrio, se selló con silicón y se verificó que no haya ningún escape del reactivo. Se introdujo el electrodo combinado al vaso de precipitado con la matriz de lactosuero simulada, observando en el multímetro un aumento inmediato en la diferencia de potencial (mV) y transcurridos unos minutos la estabilidad de dicho potencial; valores que fueron registrados en una tabla en términos de voltaje (mV) con relación a la cantidad de lactosa a evaluar (mol/L) (Figuras 5-6).

Cabe mencionar, que el tiempo en el que se estabiliza el valor dado por el multímetro varía según la cantidad estequiométrica de los reactivos, es decir, entre mayor sean las cantidades de los agentes químicos, mayor es el tiempo de equilibrio de la reacción. Por lo tanto, el tiempo puede variar de 2 a 10 min según sea el caso estequiométrico a evaluar.



(a) Montaje electrodos grafito - cobre

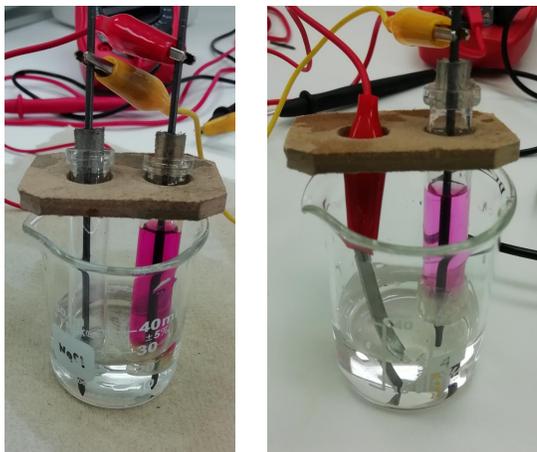
(b) Montaje electrodos grafito - zinc

Figura 5-6.: Montaje de prueba de electrodos. Fuente: Autor.

El procedimiento fue realizado para cada combinación de electrodos a cantidades de 50 mg , 100 mg , 150 mg y 200 mg de lactosa con las respectivas relaciones molares de los compuestos químicos (ver Tabla 5-1). Finalmente, los datos registrados en tablas fueron graficados en Excel, para discernir el par de electrodos a trabajar y si el agente oxidante debía estar en el exterior o interior del electrodo de referencia. Las tablas y gráficas se realizaron con los datos arrojados por cada par de electrodos pre-seleccionados, según los voltajes obtenidos en el multímetro en función de cada concentración

de lactosa (mol/L).

En las gráficas se observó el lineamiento, regresión lineal y coeficiente de correlación que permitieron ver la veracidad del funcionamiento de los electrodos con relación a la matriz de lactosuero. Es decir, cuando el coeficiente de correlación (R^2) es más cercano a 1, indica que la variación entre cada muestra evaluada es directamente proporcional y la selectividad del electrodo es más limitada.



(a) Montaje electrodos grafito - grafito
(b) Montaje electrodos grafito - zinc

Figura 5-7.: Montaje para la selección de electrodos. Fuente: Autor.

Razón por la cual, los resultados del anterior procedimiento llevaron a ejecutarlo nuevamente, pero esta vez únicamente para los electrodos de grafito-grafito y grafito-zinc (ver Figura 5-7), ya que sus coeficientes de correlación, fueron los mejores en relación a la varianza estadística de los demás pares de electrodos. Así que, el procedimiento para definir por último el par de electrodos consistió en realizar el mismo procedimiento que para el primer discernimiento de los cuatro pares de electrodos, es decir, se continuó con el montaje previo de los pares de electrodos en la estructura inicial del electrodo combinado, la preparación estequiométrica de la matriz simulada de lactosuero, la ubicación del cofactor permanganato de potasio en el interior del electrodo de referencia y, la relación molar de los componentes químicos adicionados para la realización de la hidrólisis de la lactosa y oxidación de la glucosa según las concentraciones de lactosa a evaluar.

Sin embargo, en este caso se amplió el número de cantidades de lactosa a evaluar, los cuales se encuentran dentro de los límites de lactosa permitidos en el lactosuero residual de los vertimientos generados por las industrias lácteas (menor a 5 g/dL o 400 mg de lactosa). Por ende, las cantidades de lactosa a evaluar son las siguientes: 50 mg , 100 mg , 150 mg , 200 mg , 250 mg , 300 mg , 350 mg ,

400 *mg*, 450 *mg* y 500 *mg* (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2015), (Ministerio de protección social, 2006).

La cantidad de muestreo se amplió debido a que se requirió obtener mayores datos de la diferencia de potencial registrados por el multímetro, para una adecuada selección de los pares de electrodos a implementar en el prototipo del biosensor; a partir de un análisis gráfico más confiable, un coeficiente de correlación más acertado y proporcional a la tendencia lineal teórica del voltaje en función de concentración de lactosa.

Una vez realizado el mismo procedimiento para los cuatro pares de electrodos pre-seleccionados, esta vez se realizó tan sólo para los dos mejores pares de electrodos seleccionados de acuerdo a la varianza y linealidad entre sus datos; se realizó el análisis gráfico del coeficiente de correlación y se determinó que los electrodos con los cuales se desarrollaría el prototipo de biosensor serían de grafito-grafito y la ubicación del cofactor sería en el interior del electrodo de referencia, porque los datos registrados son coherentes y proporcionales con la reacción estequiométrica, además, que la solución de lactosa no se ve interferida o sometida a cambios inesperados en su reacción química por motivo de la dilución del agente hidrolizante junto con el oxidante en la misma matriz y al mismo tiempo.

A diferencia de tener el agente oxidante o cofactor separado de la matriz del lactosuero, permitiendo una hidrólisis completa de la lactosa con el ácido clorhídrico y únicamente entrando en contacto con esta cuando se requiere de la oxidación de la glucosa para cuantificar la energía eléctrica generada por la reacción química, dejando intacta la muestra de lactosuero residual.

5.2.3. Lineamientos de control de calidad analíticos para caracterizar los electrodos grafito-grafito

Habiendo establecido una metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, a partir de la búsqueda bibliográfica, selección y evaluación de los electrodos y cofactores pre-seleccionados; se llevó a cabo la caracterización del transductor (grafito-grafito) que permite transformar la señal generada por la reacción química, en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa.

Razón por la cual se realizó un análisis estadístico, partiendo de lineamientos de control de calidad analíticos en el orden científico y experimental, como lo es con la obtención, procesamiento y análisis de datos en milivoltios a partir de dos lineamientos principales: triplicados y réplicas.

Por ello, el procedimiento para llevar a cabo el análisis estadístico, consistió en realizar tres tri-

plicados o tres tomas de mediciones en diferentes días, donde cada triplicado se fundamenta en la toma de mediciones consecutivas o réplicas para la misma concentración de lactosa en tres vasos de precipitado de 50 *mL* y, usando el montaje inicial del electrodo combinado se miden los valores en términos de voltaje con la implementación instrumental del multímetro (ver Figura 5-8).

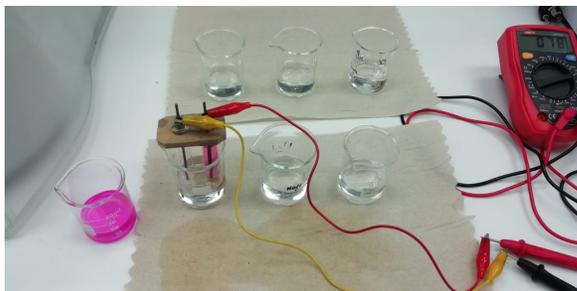


Figura 5-8.: Montaje para evaluar los electrodos grafito-grafito en matriz simulada de lactosuero. Fuente: Autor.

Cada muestra para la toma de datos y su posterior análisis estadístico fue montada de acuerdo a la relación estequiométrica de los componentes químicos ya establecidos para cada concentración de lactosa (de 50 *mg* a 500 *mg*) (ver Tabla 5-1).

Por ende, el montaje de cada muestra fue ejecutado de la siguiente manera: se tomaron 20 *mL* de agua de la llave con 50 *mg* de lactosa pesados por una balanza digital, los cuales fueron adicionados a un vaso de precipitado de 50 *mL*; a continuación se agregaron 5.32 *mg* de ácido clorhídrico, se disolvió con una espátula cuchara y se dejó actuar por 3 min. Mientras tanto, en otro vaso de precipitado de 50 *mL* se adicionaron 20 *mL* de agua de la llave con 23.07 *mg* del agente oxidante permanganato de potasio, se diluyó y se agregó 1 *mL* de esta solución al tubo de vidrio del electrodo de referencia, se selló y se colocó el electrodo combinado (grafito-grafito) en la solución de lactosa preparada. Posteriormente, se midieron los voltajes dados por la oxidación de la glucosa con ayuda del multímetro, registrando los respectivos valores en milivoltios.

Luego de haber registrado las mediciones dadas por el multímetro, se procedió a realizar en Excel tablas y curvas de calibración para cada triplicado, donde se analizó la varianza entre los valores de voltaje obtenidos por las mediciones de los electrodos en presencia de reacciones químicas, mediante regresión lineal. Después, se evaluaba y consideraba el uso o no de una etapa de instrumentación, es decir, de acuerdo a la literatura si entre un valor y otro de voltaje se presentan cambios mínimos, menores a 0.1 *mV* (Arduino, 2008).

5.3. Fase III. Diseño e implementación del prototipo de laboratorio de biosensor

La metodología del tercer objetivo se dividió de acuerdo a las seis áreas principales que lo abarcan, las cuales son (Figura 5-9):

- Búsqueda bibliográfica del diseño de una estructura que permita la ubicación del par de electrodos y como producto facilitara la medición de la muestra de estudio.
- Levantamiento de requerimientos según la relación del producto con la necesidad, uso y restricciones a nivel técnico, funcional y de calidad.
- Diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio de biosensor(subdividido en diseño conceptual, diseño detallado y construcción).
- Diseño en ingeniería de la etapa instrumental (subdividido en búsqueda bibliográfica, matrices de decisión de los componentes, acondicionamiento y procesamiento de la señal útil).
- Montaje en protoboard y evaluación de la etapa de instrumentación del prototipo de laboratorio de biosensor;
- Montaje y programación del sistema de dosificación del agente oxidante a través de un software y en protoboard por medio de un elemento vareador de voltaje.

5.3.1. Diseño implementado de un electrodo combinado

Se realizó la búsqueda y lectura de algunos artículos científicos encontrados en la sección 4.3, que tratan del diseño, construcción e implementación de una estructura física para ubicar el par de electrodos (grafito-grafito) dentro del prototipo de laboratorio de biosensor, teniendo en cuenta que fuera innovador, portátil, de fácil fabricación y uso. Por lo que, se seleccionó, comprendió y extrajo información de un artículo científico que trata del diseño y construcción de celdas voltaicas mediante un sistema denominado electrodo combinado, diseño que en la actualidad se encuentra dentro de los principales avances tecnológicos para lo relacionado con biosensores electroquímicos (ver Figura 5-10) (Pérez, Rincón, & Fuentes, 2014).

Por ende, dicha referencia bibliográfica fue tomada y acondicionada de acuerdo a los requerimientos del diseño en ingeniería (Ver sección 5.3.2). El diseño y montaje inicial del electrodo combinado fue

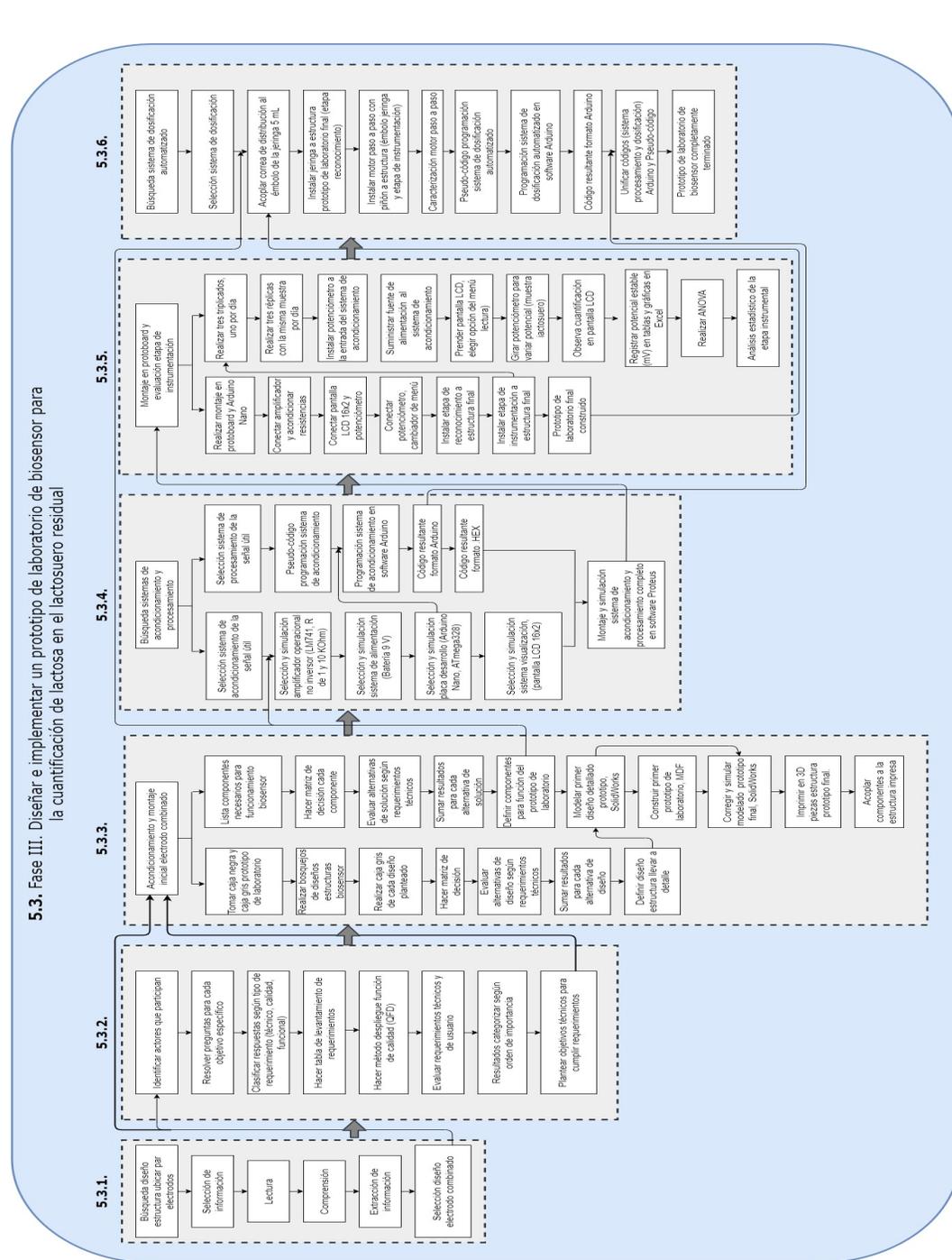


Figura 5-9.: Fase III. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el tercer objetivo por seis secciones. Fuente: Autor.

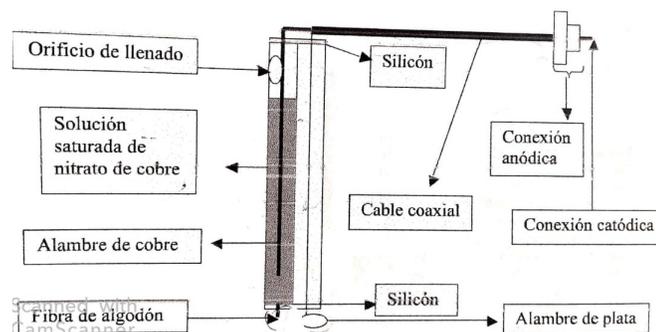


Figura 5-10.: Montaje guía electrodo combinado, elaborado para cuantificación de cloruro de potasio y bromuro de potasio. (Pérez, Rincón, & Fuentes, 2014).

el punto de partida para el desarrollo de las metodologías de cada objetivo específico, en especial del presente objetivo, ya que en este la construcción del electrodo combinado inicial fue llevada al prototipo de laboratorio y prototipo final. Quedando como diseño y montaje inicial del electrodo combinado, la siguiente descripción:

1. Electrodo indicador: Una mina de grafito de 2 mm de diámetro por 90 mm de largo fue unida en uno de sus extremos al alambre interno de un cable coaxial e introducida a un tubo de vidrio de 13 mm de diámetro y 60 mm de altura, el cual fue sellado en sus extremos con silicón; el silicón cuenta con un agujero de 2 mm de diámetro en su centro, por el cual sobresale 10 mm de cada extremo de la mina.
2. Electrodo de referencia: A un segundo tubo de vidrio de las mismas características que el anterior, se le introdujo una mina de grafito de 2 mm de diámetro por 90 mm de largo, la cual en uno de sus extremos fue unida al alambre de la cubierta del cable coaxial. Al tubo se le agregó el agente oxidante permanganato de potasio y se selló con silicón en sus extremos, el silicón cuenta con un agujero de 2 mm para permitir que la mina de grafito sobresalga 10 mm.
3. Los dos tubos se depositaron en una estructura rectangular en madera MDF que fue acondicionada con las siguientes medidas: 110 mm de largo, 26 mm de ancho, 10 mm de alto y dos orificios centrados con diámetro de 13 mm (ver Figura 5-11).

Una vez se realizó la búsqueda y construcción de la estructura que contiene el par de electrodos o transductor, más conocida según referencia bibliográfica como electrodo combinado (ver Figura 5-11), se efectuó el método de despliegue de la función calidad (QFD) a partir del levantamiento de requerimientos realizado en el anteproyecto.



Figura 5-11.: Montaje inicial electrodo combinado: electrodo indicador-cátodo (grafito) y electrodo de referencia-ánodo (grafito y agente oxidante). Fuente: Autor.

5.3.2. Levantamiento de requerimientos

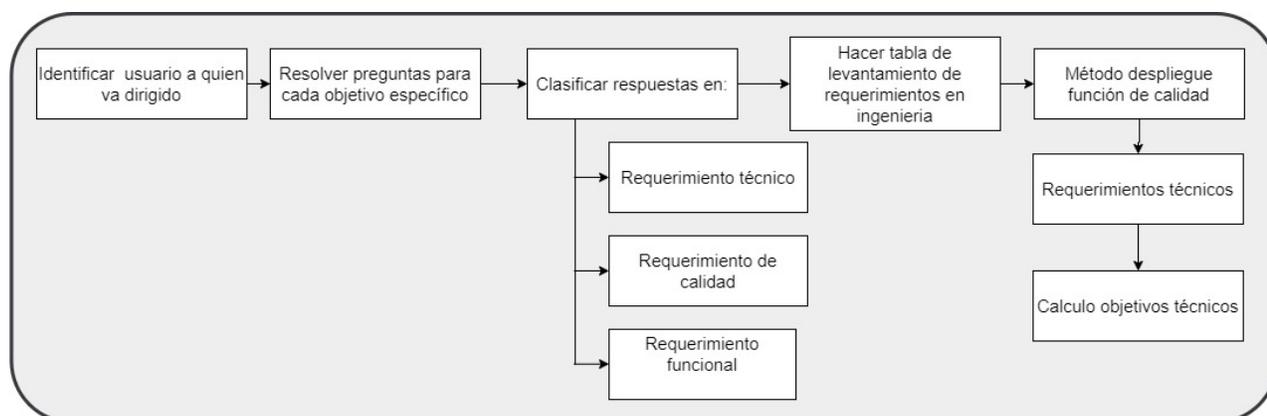


Figura 5-12.: Diagrama de bloques levantamiento de requerimientos. Fuente: Autor.

Para llegar al levantamiento de requerimientos, en el anteproyecto se partió del análisis de los factores que podrían restringir el desarrollo del prototipo de laboratorio de biosensor y las necesidades del operario (usuario) con respecto a lo que se esperaba ver al momento de su construcción e implementación. Además, teniendo en cuenta que el proyecto de grado es modalidad producto y no servicio, el planteamiento de los requerimientos se ejecutó a partir de lo que posiblemente podría esperar el usuario u operario de producción de productos lácteos, quien no estaría capacitado ni tendría el nivel de conocimiento integro para su mantenimiento y aplicación, así como también de la visualización a largo plazo de las exigencias que fueron solventadas para llevar al cumplimiento en su totalidad de cada uno de los objetivos específicos.

Por lo cual, de acuerdo al usuario identificado y al objetivo específico a cumplir se resolvió las siguientes preguntas: ¿qué requiere el operario acerca de la solución? y ¿qué necesita la solución

para el operario?, cuyas respuestas son ubicadas en tablas de acuerdo al tipo de requerimiento: técnico, de calidad y funcional. Para lo cual, se tuvo en cuenta el concepto de cada requerimiento: técnico es sinónimo de operatividad, usabilidad y cosas tangibles; calidad es cuando se requiere que un proceso o resultado sea estadísticamente comparable y funcione bajo una normativa; y funcional cuando se resuelve a la pregunta ¿cómo se sabe que funciona bien?.

El resultado del trabajo anterior se encuentra de manera detallada en cuatro tablas, cada una para un objetivo específico, organizada según tipo de requerimiento y complementado en las columnas: tarea, requerimiento y entregable (Ver Anexo A). Sin embargo, a continuación se encuentra la descripción general, listada y actualizada del levantamiento de requerimientos que se llevó a cabo en el anteproyecto con el objetivo de desarrollar el prototipo de laboratorio de un biosensor para la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual:

1. Técnicos:

- a) La etapa de reconocimiento requiere de unos rangos patrón de detección de concentración de lactosa de 0.0073 mol/L (50 mg) a 0.073 mol/L (500 mg), para establecer y validar la metodología seleccionada.
- b) Los agentes químicos deben cumplir con un coeficiente de correlación lo más cercano a 1, al igual que una mínima variación entre sus datos cuando son sometidos a oxidoreducción en lactosuero para detectar lactosa, los resultados deben ser linealmente proporcionales (potencial (mV) en función de concentración de lactosa (mol/L)).
- c) El resultado de los lineamientos de control de calidad para la evaluación de los agentes químicos y electrodos debe ser proporcional y tener un patrón de comportamiento, puesto que la compatibilidad entre estos se refleja en los coeficientes de correlación y variación.
- d) Se debe valorar la calidad del agua sin procesar, para obtener una ficha técnica de la calidad del agua.
- e) Seleccionar los componentes electrónicos que permitan satisfacer la caracterización de los electrodos y el cumplimiento de la estequiometría, recibiendo voltajes medibles en el rango eléctrico de 100 mV a 600 mV , amplificarlos de 1 V a 6 V , para asegurar una etapa instrumental lineal, sin errores de ruido, voltajes en unidades pequeñas y poca confiabilidad.
- f) El sistema requiere de una estructura ligera, compacta, impermeable, portable, de fácil manejo, con materiales económicos, biodegradables, reutilizables.

- g) El prototipo de laboratorio debe ser de fácil mantenimiento y calibración, brindar seguridad, ser llamativo y contar con un plano técnico previamente diseñado.
- h) La pantalla LCD 16x2 debe presentar al usuario el valor de la concentración de lactosa presente en la muestra de lactosuero residual en términos de *mg*, con un porcentaje de confiabilidad del 95 %.
- i) El sistema debe integrar las etapas de reconocimiento y de instrumentación, por lo que debe contener un sistema que permita agregar la solución del agente oxidante.

2. Calidad:

- a) Realizar un método estadístico que permita encontrar invarianza y error porcentual con relación del dato requerido y el obtenido, dicho rango de error debe ser menor al 3 %.
- b) Indicar al usuario si la muestra de lactosuero presenta una concentración de lactosa por encima del límite permisible (400 *mg*) de este disacárido en los vertimientos de la industria láctea, mediante una señal de alarma dada en la pantalla LCD 16x2.
- c) El sistema requiere de un menor grado de afectación e intervención del material de la estructura en la funcionalidad del prototipo de biosensor.
- d) El sistema no debe presentar interferencias del medio en la señal, ni cambiar su medida por cambios de temperatura u otra variable ambiental.

3. Funcionales:

- a) El sistema requiere del establecimiento de una metodología selectiva para la etapa de reconocimiento y de una metodología para la caracterización, acondicionamiento y procesamiento de la señal útil.
- b) El sistema requiere de unos límites de cuantificación para evaluar el funcionamiento del prototipo de biosensor, los cuales son de 100 *mV* a 600 *mV* o en términos de cantidad de lactosa de 50 *mg* a 500 *mg*.
- c) Se requiere formular un plan de pruebas mediante un protocolo para la evaluación del funcionamiento del prototipo de biosensor final.
- d) Tener una correlación de datos tomados del proceso, antes y después de la etapa de instrumentación.

Los requerimientos mencionados anteriormente, se definieron debido a que son restricciones que necesitaban de una solución concreta y limitada para asegurar la construcción y funcionamiento del prototipo de manera eficiente, confiable y segura, así como la satisfacción del operario (usuario).

Para implementar y cumplir los requerimientos, se desarrolló el método de despliegue de la función calidad (QFD), el cual consiste en una metodología usada por la ingeniería de la calidad para fabricar productos que satisfagan los requerimientos del usuario. En este caso, la metodología calculó de forma matemática las características primordiales que se debían adicionar al diseño del prototipo de laboratorio y una visión general de los aspectos a mejorar en el producto frente a la competencia (Bernal, 2012).

Para llevar a cabo el QFD, se realizó en Excel una matriz de calidad en la cual se colocó una lista en orden de importancia de los qué, cómo y sus relaciones; para el cumplimiento de los requerimientos técnicos y del usuario dados en el anteproyecto. Por lo tanto, para el desarrollo del método se siguió el orden dado por el diagrama QFD de la Figura 5-13 y es explicado a continuación:

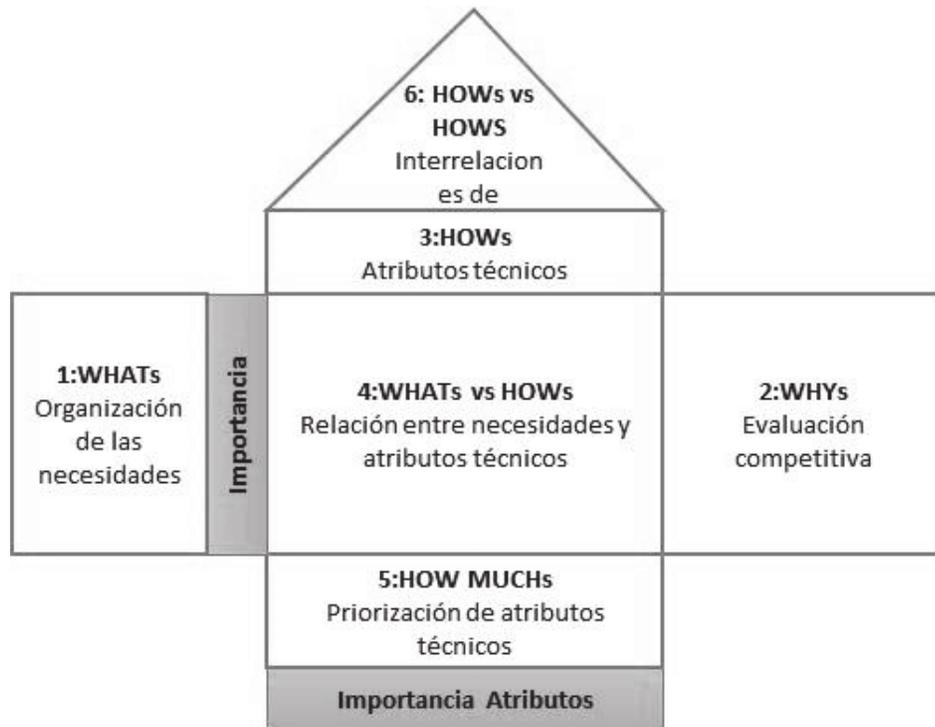


Figura 5-13.: Diagrama guía método de despliegue de la función calidad (QFD) (Bernal, 2012).

1. Lista de los Qué: En esta lista se colocaron los aspectos que los actores esperaban del producto

a nivel operativo y de usabilidad, como es con respecto al diseño y construcción del biosensor a nivel estructural (Bernal, 2012).

2. Importancia: Se colocó el peso de importancia de cada requerimiento técnico de 5 (mayor importancia) y 1 (menor importancia) (Bernal, 2012).
3. Evaluación de la competencia: En esta se clasificó los qué en el orden de importancia en un rango de 1 a 5, siendo 5 de mayor importancia y 1 menor importancia para la evaluación de cada competidor (Bernal, 2012).
4. Lista de los Cómo: En éste espacio se ubicaron los requerimientos técnicos necesarios para dar cumplimiento a dichos Qué, razón por la cual en el recuadro asignado se escribió cómo cumplir dichos aspectos (Bernal, 2012).
5. Matriz de correlación o relación entre los cómo: En la matriz triangular se colocaron si los cómo se relacionan o no, y si se relacionan, de qué manera lo hacen: positivo o negativo (Bernal, 2012).
6. Matriz de correlación: Esta ubicada en el centro de la casa de calidad y consiste en relacionar los Qué con los Cómo, colocando tres valores numéricos de relación: 1 débil, 2 medio y 3 fuerte. Entonces se evaluó la relación de cada aspecto (Qué) con respecto a todos los requerimientos técnicos (Cómo) y así secuencialmente se realizó con cada aspecto esperado por el producto (Bernal, 2012).
7. Análisis de los cómo (cuántos): En éste último campo de la QFD se calculó objetivos técnicos que se tuvieron que cumplir con las especificaciones dadas en el levantamiento de requerimientos. En este campo, también se hizo la ponderación absoluta y relativa de cada Cómo, reflejando la importancia de cada Cómo y su dependencia con su Qué. Las ecuaciones para los Cómo es la ponderación absoluta (Sumatoria de cada casilla de relación entre Qué y Cómo) y la ponderación relativa del Qué asociado (Bernal, 2012).

Los resultados arrojados por el método de despliegue de la función calidad (QFD) se categorizaron según orden de importancia del requerimiento técnico en el producto, además, el cumplimiento de los requerimientos se dio por medio del planteamiento de objetivos que llevaron a detallar al desarrollo del diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio de biosensor. Mientras, que los demás requerimientos plasmados en las tablas del levantamiento de requerimientos del anteproyecto, fueron utilizados en matrices de ponderación para justificar de manera ingenieril el uso de cada material de construcción y componente electrónico.

5.3.3. Diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio

Luego de haber realizado y analizado el método QFD a partir del levantamiento de requerimientos para formular los objetivos que llevan al cumplimiento de cada uno de los requerimientos técnicos de la estructura del biosensor, se continuó con la fase de diseño en ingeniería de esta. Razón por la cual, el proceso para desarrollar esta fase, partió inicialmente con el diseño conceptual, donde se plantearon varias opciones de estructuras que cumplieran con los objetivos de los requerimientos técnicos (QFD) mediante bosquejos realizados en formatos de dibujo a mano y se seleccionó el mejor a través de una matriz de ponderación; luego el desarrollo de la fase prosiguió con el diseño detallado o construcción del diseño escogido en el software SolidWorks 2018 a escala real y teniendo presente el sistema de acoplamiento de sus piezas como de los elementos del biosensor; y finalmente, el diseño en ingeniería concluyó con la construcción de la estructura en impresión 3D y la instalación de los elementos del biosensor para su funcionamiento en conjunto. Cabe mencionar, que la selección de componentes es una etapa del diseño detallado, la cual se realiza luego de la selección del concepto global. En este punto se realizaron matrices de decisión en donde intervienen los requerimientos de ingeniería que debe cumplir cada componente y las diferentes alternativas que se tienen. Todo el diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio esta fundamentada en (Dieter & Linda, 2013).

Diseño conceptual del prototipo de laboratorio

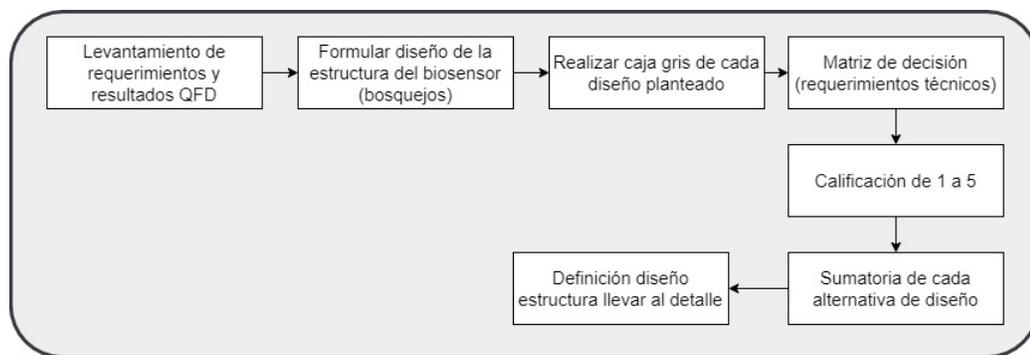


Figura 5-14.: Diagrama de bloques diseño conceptual. Fuente: Autor.

Partiendo de los requerimientos obtenidos a partir de la información del operario (funcionales y de calidad) y de los resultados arrojados por el método de despliegue de la función calidad (QFD), se vio la necesidad de cumplir con los objetivos formulados según el orden de importancia de los requerimientos técnicos en el diseño de la estructura del prototipo de laboratorio de biosensor, por

lo cual, se formularon varios diseños mediante su representación por bosquejos, así como también la construcción de la caja gris para cada diseño propuesto (Dieter & Linda, 2013). Los requerimientos tenidos en cuenta fueron:

- El producto debe ser compacto para impedir el deterioro de los componentes electrónicos.
- Los materiales no deben inhibir la reacción entre el lactosuero y el electrodo.
- El producto debe ser portable.
- Menor tamaño y simplicidad del producto.
- La estructura del prototipo debe facilitar el mantenimiento y calibración de cada etapa.
- El electrodo combinado debe guardarse en un lugar seguro, para prevenir roturas o riegos.
- El diseño del producto debe ser llamativo para el usuario.
- Tiempo de respuesta de reacción química, componentes electrónicos y programación menor a 8 min.
- Integración y automatización (dosificación del agente oxidante) de la etapa de reconocimiento e instrumentación.

Estos requerimientos argumentan que los diseños propuestos que se realizaron tuvieron el mismo principio geométrico y estructural, puesto que lo que pretenden es cumplir con estos en su mayoría, además que el tiempo dado por la facultad para el desarrollo del proyecto de grado impide realizar un diseño más creativo y riguroso, lo cual se deja escrito en la sección de recomendaciones.

En primer lugar, se inició con diseños que serían una visión a largo plazo del mejoramiento del biosensor como producto para sacar al mercado competitivo, luego se siguió con el bosquejo de diseños básicos de la estructura de un prototipo de laboratorio donde sus etapas se encontrarán integras y su mecanismo de funcionamiento para la etapa de reconocimiento biológico fuera manual, es decir, donde la preparación del lactosuero y las soluciones de los agentes químicos la hiciera el usuario y este mismo la introdujera a la estructura. Finalmente, se llevó a bosquejo el mejoramiento de los diseños básicos con la diferencia de que cuentan con un sistema de dosificación automática de la solución del agente oxidante permanganato de potasio, con el objetivo de evitar que el usuario u operario de producción de lácteos tenga contacto con reactivos controlados.

En segundo lugar, se realizó la caja gris para cada diseño de la estructura plasmado a manera de bosquejo. Cada caja gris para el respectivo diseño de prototipo de biosensor, se creó partiendo de la mención de las entradas y salidas, como de la descripción del funcionamiento interno; donde se tuvo en cuenta la metodología práctica de cada etapa del biosensor y de manera general el cómo colocar la muestra de lactosuero en el equipo, cómo realizar la dosificación del agente oxidante, cómo medir la lactosa presente en la muestra, cómo ubicar la etapa instrumental para su mantenimiento y cómo relacionar las dos etapas dentro de la estructura. Lo último mencionado se especificó en la fase de diseño detallado.

Ya teniendo los diferentes diseños propuestos de la estructura en bosquejos y representación gráfica por medio de cajas grises, estos fueron evaluados en una matriz de decisión con un calificación de 1 a 5. La matriz de decisión se realizó en una tabla en Excel, donde las columnas son las alternativas de diseño y las filas son los requerimientos técnicos más importantes para la construcción de la estructura, según lo indicó el peso relativo dado por el método QFD (Ver sección 5.3.2); por lo que, se califica cada alternativa de diseño con cada requerimiento donde 1 es que no lo cumple y 5 que lo cumple en su totalidad y, al final de la tabla se realiza la sumatoria de las calificaciones para cada alternativa. Siendo el diseño de la estructura del prototipo de laboratorio con mayor sumatoria, el que se lleva al desarrollo del diseño detallado.

Diseño detallado del prototipo de laboratorio

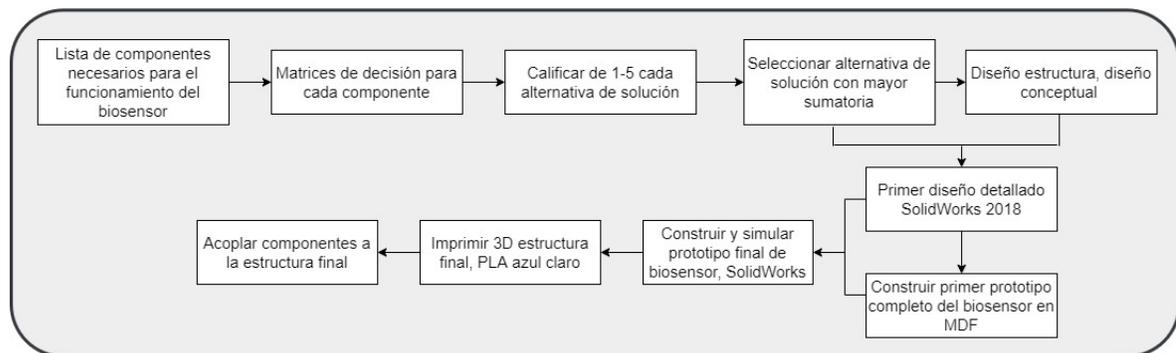


Figura 5-15.: Diagrama de bloques diseño detallado. Fuente: Autor.

Selección de componentes que hacen parte del prototipo de laboratorio de biosensor

La primera parte del diseño detallado esta conformada por la selección de los componentes que llevan a la funcionalidad del prototipo de biosensor y hacen parte del diseño detallado de su estructura, con referente a dimensiones y distribución de la misma. Para la selección de cada componente

se realizó una matriz de decisión o de ponderación en donde se evalúan diferentes alternativas de solución con referente a los requerimientos del operario que debe cumplir cada componente, ya sean técnicos, de calidad o funcionales, como se mencionó en la sección 5.3.2 (Dieter & Linda, 2013).

En primer lugar, se elaboró la lista de los componentes que serían utilizados para dar cumplimiento a los requerimientos de ingeniería, teniendo en cuenta que cada componente colocado en la lista se escogió de acuerdo a la funcionalidad que se requiere dentro del diseño de la estructura y de la etapa instrumental. Por ejemplo, la estructura debe tener un método de construcción adecuado, para la etapa instrumental se necesita de un sistema de amplificación por lo cual se opta por escoger un amplificador operacional y para la dosificación del agente oxidante se requiere de un sistema automatizado. Teniendo esta lista de componentes, para cada uno se buscó tres posibles alternativas de solución de acuerdo a los requerimientos necesarios, como se observa a continuación:

Tabla 5-2.: Lista de componentes utilizados en el funcionamiento del biosensor. Fuente: Autor.

Objetivo 3	Componente	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Diseño estructura	Método de construcción (estructura)	Impresión 3D	Corte láser	Corte manual
Diseño estructura	Material construcción (estructura)	PLA	ABS	Acrílico
Diseño estructura	Jeringa	1 mL	5 mL	10 mL
Diseño estructura	Sistema desplazamiento de jeringa	Poleas	Piñones	Piñón, correa de desplazamiento
Diseño estructura	Sistema de aseguramiento (estructura)	Tornillos	Cloruro de metileno	Super bonder
Diseño estructura	Tornillo	3/8 "	1/2 "	5/8 "
Diseño etapa instrumental	Placa montaje circuito	PCB	Baquela	Protoboard
Diseño etapa instrumental	Placa de desarrollo	Arduino	PIC 18F4550	PIC 16F84a
Diseño etapa instrumental	Fuente de alimentación	Batería	Pila	Cargador
Diseño etapa instrumental	Motor	Paso a paso	Servomotor	DC
Diseño etapa instrumental	Método visualización resultados	LCD	PC	Celular
Diseño etapa instrumental	Regulador menú de visualización	Potenciómetro rotatorio	Potenciómetro trimmer	Pulsador
Diseño etapa instrumental	Amplificador operacional	LM741	LM386	LM324

En segundo lugar, se elaboró una matriz de decisión para cada componente, en las columnas se

encuentran las tres alternativas de solución del componente y en las filas se colocaron los requerimientos que se requiere que cumpla este. La calificación para la evaluación de los componentes es de 1 a 5, donde 1 es que no lo cumple y 5 que lo cumple en su totalidad. Una vez se califica cada requerimiento, se hace la sumatoria para cada alternativa y se selecciona la de mayor ponderación. Para mejor entendimiento a continuación se coloca un ejemplo de la matriz de decisión realizada para seleccionar el sistema de aseguramiento de las tapas de la estructura del prototipo a este; sin embargo se recomienda ir al Anexo E para poder visualizar todas las matrices de decisión realizadas.

Tabla 5-3.: Sistema de aseguramiento (Tapas de la estructura). Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Aseguramiento de las partes seguro	5	4	3
Sencillo y de fácil limpieza	5	1	1
Desarmado en un tiempo mínimo a 10 min	5	1	1
Estar acoplado a la estructura	4	2	2
Compatible con el material de construcción	3	5	3
Dar buena presentación al equipo	3	5	5
PESO TOTAL	25	18	15

En último lugar, se justifica cada matriz de decisión y su componente establecido de acuerdo al cumplimiento exigente de los requerimientos y a la calidad del biosensor que se obtuvo, esta explicación se dará a medida que se va requiriendo el componente en el proceso de diseño en ingeniería.

Construcción del diseño escogido en el software SolidWorks 2018

Una vez seleccionado el diseño conceptual de la estructura funcional a partir de la ponderación más alta dada por la matriz de decisión (Ver sección 5.3.3) y seleccionados los componentes por matrices de decisión para la construcción del diseño de la estructura como del funcionamiento de la etapa instrumental del prototipo de laboratorio, el diseño fue modelado en el CAD SolidWorks 2018 teniendo presente las características de los componentes y requerimientos del operario (Dieter & Linda, 2013).

En primer lugar, se tomó el bosquejo a mano del diseño acotado de la estructura funcional y se llevó a construcción en el CAD mediante el modelamiento y ensamble de cada una de las partes que conforman las diferentes piezas de la estructura del biosensor por medio de funciones como croquis, cotas inteligentes, extrusión saliente, extrusión corte, insertar componentes y relación de

posición (Figura 5-16).

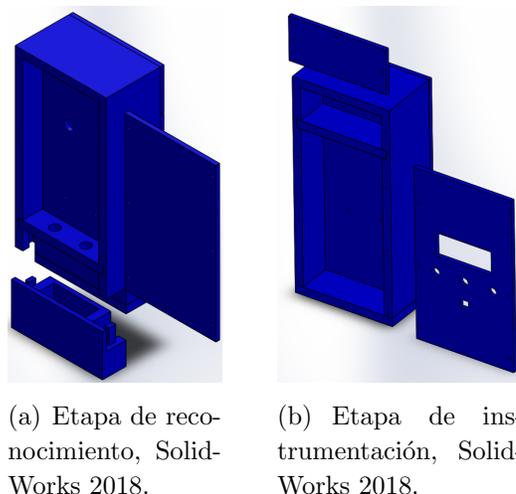


Figura 5-16.: Modelado de la estructura del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor.

Adicional a la construcción se realizó la asignación del material y color, el cual según la matriz de decisión de la Tabla 5-4 es PLA azul claro; ya que es un material resistente, biodegradable, reutilizable y que no inhibe el funcionamiento del biosensor.

Tabla 5-4.: Material de construcción de la estructura. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Material resistente a las condiciones ambientales	5	3	4
Material no inhibe el funcionamiento	5	5	5
Material de bajo costo	2	3	5
Material biodegradable y reutilizable	5	1	1
PESO TOTAL	17	12	15

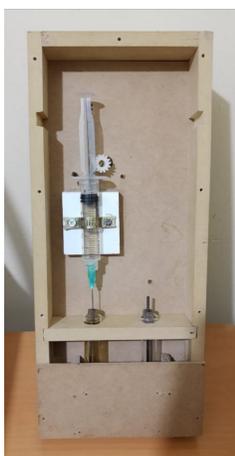
El anterior modelamiento fue la base para la construcción del primer prototipo completo del biosensor en madera MDF, ya que sus dimensiones no eran seguras ni precisas, puesto que los componentes que se encontraban en el CAD tenían dimensiones similares pero no reales, por lo que se consideró como el primer diseño detallado en SolidWorks.

Este primer prototipo completo del biosensor se construyó en láminas de MDF con grosor de 10 mm y 5 mm, con la finalidad de visualizar, ubicar y medir con mayor facilidad las piezas y

componentes que se encontraban en el software SolidWorks 2018; garantizando la exactitud en los sistemas de aseguramiento y relación de piezas de la construcción del prototipo de laboratorio final, ya que una de las desventajas del material de fabricación es que tiene un alto costo y no puede ser desperdiciado. Los componentes que se acondicionaron en el primer prototipo son los mismos que fueron acoplados en la estructura impresa del prototipo final, por ende, estos componentes según la etapa del biosensor fueron:

1. Etapa de reconocimiento: Dos tubos de vidrio de 13 mm de diámetro por 60 mm de altura, 2 minas de grafito de 2 mm de diámetro por 85 mm de largo, 2 tapones de silicón superiores, 2 tapas de silicón inferiores, cable coaxial, jeringa de 5 mL con aguja, una abrazadera de 11 mm de diámetro (soporte rectangular en madera), una correa de distribución de impresora con 60 mm de largo por 5 mm de ancho y 2 mm de alto y piñón de 10 mm de ancho y 13 mm de diámetro.
2. Etapa instrumental: cable coaxial, una protoboard pequeña, un amplificador operacional LM741, resistencias de 1K Ω , 9K Ω , 220 K Ω , un motor paso a paso de 5 V, un driver para motor paso a paso, una placa de desarrollo Arduino Nano, una pantalla LCD de 16x2, tres potenciómetros de 10 K Ω , un pulsador, un LED rojo, un porta batería de 9 V y una batería recargable de 9 V.

Cabe mencionar, que los componentes anteriormente nombrados, son el resultado del método de la matriz de decisión presente en el Anexo E.



(a) Etapa de reconocimiento.



(b) Etapa de instrumentación.

Figura 5-17.: Primer prototipo de laboratorio en madera MDF. Fuente: Autor.

Para la construcción del primer prototipo de laboratorio, se traspasaron las medidas de cada pieza del modelo 3D de SolidWorks al material MDF, luego se cortaron con una sierra sinfín y se pulieron los bordes con un cepillo manual para madera. A las caras laterales de la estructura principal con ayuda de una sierra de banco se les realizó el corte de los canales por los cuales ingresan dos divisiones de la estructura (una para cada etapa); se ensamblaron las paredes de la estructura principal mediante canales y puntillas de 1" sin cabeza; finalizando con el posicionamiento y fijado de las tapas que protegen cada una de las etapas del biosensor del entorno, mediante tornillos de 1/2" cabeza plana-estrella (Figura 5-17).

Posteriormente, en el primer diseño detallado en SolidWorks se corrigieron: dimensiones y ubicación de cada componente en la estructura de acuerdo a la etapa del biosensor, método de ensamble de las divisiones y diseño del sistema de acoplamiento del recipiente removible a la estructura del prototipo de laboratorio.

Finalmente, se creó la simulación de la vista explosionada del prototipo final en el CAD, es decir, se realizó un video mediante el cual el operario de la empresa pueda ver paso a paso cómo se arma y desarma el producto, ya sea para cambiar la batería recargable de 9 V, recargar la jeringa con la solución del agente oxidante o realizar mantenimiento de alguna de las etapas del biosensor. Por otro lado, el video comprueba la exactitud con la que se construyó cada una de las piezas para el montaje sin errores durante la ingeniería de diseño desarrollada en todo el presente objetivo del trabajo de grado (Dieter & Linda, 2013).

Construcción del prototipo de laboratorio de biosensor

Tabla 5-5.: Método de construcción de la estructura. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Estructura robusta	4	4	2
Estructura integrada	5	3	2
Recipiente removible	5	4	3
Fácil adaptación del sistema de aseguramiento	4	4	3
PESO TOTAL	18	14	10

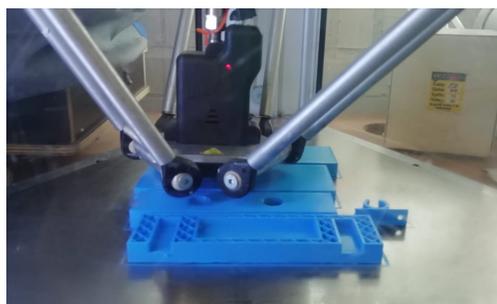
Luego de corroborar el diseño final de la estructura funcional del prototipo de laboratorio mediante la simulación en el software SolidWorks 2018, se procedió a realizar su impresión 3D y ensamble de cada una de sus piezas y componentes. El método de construcción se definió por medio de la matriz de decisión que se observa en la Tabla 5-5, donde se evaluaron los tres posibles métodos (impresión 3D, corte láser y corte manual) con los siguientes requerimientos: estructura robusta para impedir el

deterioro de los componentes, estructura íntegra, recipiente removible y fácil adaptación del sistema de aseguramiento a la estructura; en una escala de 1 a 5 y su resultado es la alternativa con mayor ponderación.

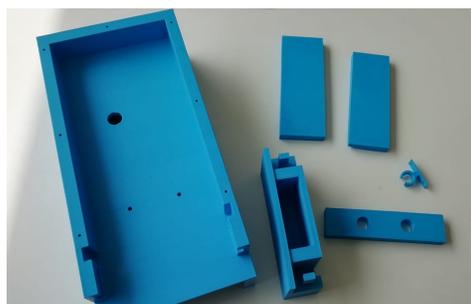
La impresión 3D del prototipo de biosensor se realizó en el laboratorio de prototipado de la Universidad El Bosque, por lo que, previamente se adquirió un rollo de 1 *Kg* de fibra PLA azul clara para la construcción completa de la estructura del prototipo de biosensor final. El PLA fue fundamental para la construcción del prototipo porque sus características lo llevan a ser un material ligero, compacto e impermeable; requerimientos con mayor orden de importancia de acuerdo a lo obtenido por el método de despliegue de la función calidad (QFD).

Una vez se adquirió el material de impresión 3D, cada una de las piezas modeladas en CAD fueron guardadas en un archivo .STL para facilitar su impresión, según la demanda de la impresora 3D. Estos archivos fueron abiertos en el computador conectado a la impresora y se acomodó la pieza en el plano de partida de acuerdo a los ejes y coordenadas que mejor se adecuaban al tamaño de la impresora y menor gasto de material. Se instaló el rollo de fibra de PLA en la impresora, se prendió y una vez es leída por el computador, se le ordenó la impresión de cada una de las piezas del prototipo final (Figura 5-18).

A medida que se iba imprimiendo cada una de las piezas, se les daba acabado manualmente, como limar imperfecciones e ir ensamblando piezas y componentes de acuerdo al ensamble y video explosionado realizado en SolidWorks. Los materiales que se utilizaron para eliminar imperfecciones fueron: un bisturí, lijas y una lima circular; por otro lado, los materiales que se usaron para el ensamblaje de las piezas y componentes fueron: pegante para PLA, una espátula delgada, veinte tornillos cabeza plana de estrella de 1/2" y un destornillador de estrella (Figura 5-18).



(a) Método de construcción de la estructura final del biosensor, mediante impresión 3D en las instalaciones Universidad El Bosque.



(b) Estructura impresa, con acabados y lista para que sus piezas sean acopladas.

Figura 5-18.: Construcción de la estructura final del biosensor. Fuente: Autor.

5.3.4. Diseño en ingeniería de la etapa instrumental

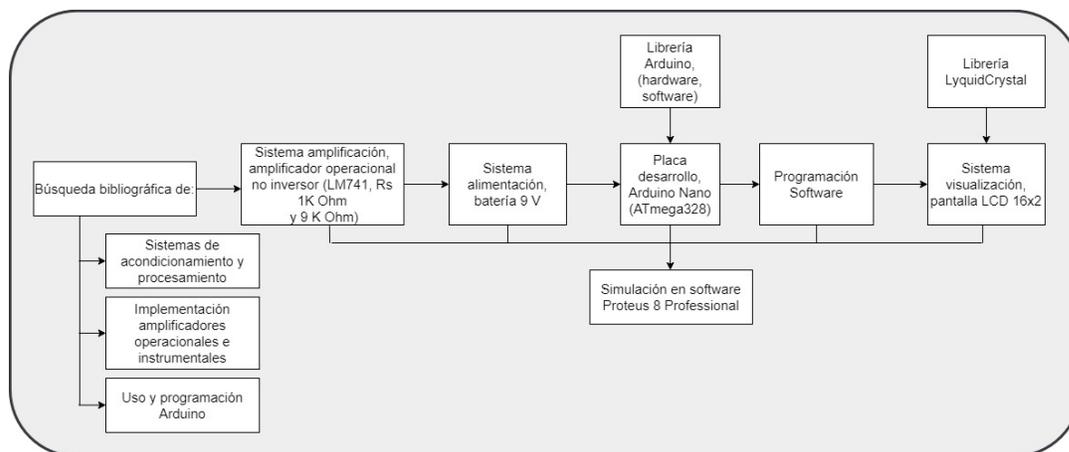


Figura 5-19.: Diagrama de bloques diseño en ingeniería, etapa instrumental. Fuente: Autor.

La etapa de instrumentación debe ser implementada en biosensores cuando al medir la señal resultante de la etapa de reconocimiento, traducida por los electrodos y medida por el multímetro se presentan cambios menores a 0.1 mV (Arduino, 2008).

Para determinar esto con el prototipo de biosensor, se analizó los lineamientos de calidad analíticos dados en la primera fase (Ver sección 5.1.4). Los potenciales arrojados en los lineamientos de calidad dieron entre los 100 mV y 600 mV con variación entre sus datos de aproximadamente 2 mV a 15 mV , lo cual fue analizado de acuerdo a lo citado por la corporación Arduino en 2008, no se requiere de una etapa de instrumentación, porque los cambios de potencial son mayores a 0.1 mV . Sin embargo, se optó por diseñar una etapa de instrumentación sencilla con acondicionamiento y procesamiento de la señal útil para asegurar la linealización de la señal resultante, evitar su distorsión por ruidos del entorno y hacer del biosensor un producto selectivo para lactosa e inhibidor para los demás componentes de la matriz del lactosuero residual. Ya que se conoce que el lactosuero presenta: agua, calcio, sales minerales, ácido láctico y proteínas lactoséricas de bajo peso molecular (Ruíz & Garcés, 2007).

Razón por la cual, la descomposición funcional fue una fase en la metodología de diseño en ingeniería, en la que se descompuso la construcción de la etapa de instrumentación en subsecciones, de acuerdo a los requerimientos de ingeniería a solventar y a los componentes necesarios para llevar a cabo el funcionamiento del prototipo de laboratorio de biosensor. Por lo tanto la descomposición funcional se seccionó en acondicionamiento y procesamiento de la señal útil, donde cada una esta explicada rigurosamente por sistemas de funcionamiento, según el componente requerido (Dieter & Linda, 2013).

Sistemas de acondicionamiento y procesamiento implementados en biosensores electroquímicos

El diseño en ingeniería de la etapa instrumental partió de la búsqueda, selección, lectura, comprensión y extracción de información a nivel conceptual sobre los sistemas de acondicionamiento y procesamiento de la señal para biosensores electroquímicos y a nivel teórico sobre la implementación de amplificadores operacionales e instrumentales, como del uso y programación de la placa de desarrollo de Arduino para biosensores, siendo el caso del sensor de pH, cuyos resultados se evidencian en las secciones 4.3 y 4.4 del Marco de referencia.

De esta búsqueda bibliográfica y el análisis realizado del porqué se optó por el uso de la etapa de instrumentación, se decidió realizar la construcción de un amplificador operacional, puesto que a comparación de los amplificadores de instrumentación tienen ganancia infinita y con retroalimentación externa logran una ganancia finita, además tienen entrada diferencial de alta impedancia, pero cuando los elementos de retroalimentación se adicionan al amplificador operacional, disminuye la impedancia de entrada (Cova, Yusmary, & Bompal, 2017). Por otro lado, se tuvo en cuenta que los métodos electroquímicos de voltamperometría de barrido lineal parten del procesamiento de la señal mediante un microcontrolador o plataforma de desarrollo como Arduino (Jordá, 2018).

Acondicionamiento de la señal útil

Sabiendo que el sistema de acondicionamiento de la señal resultante del prototipo de laboratorio debía ser un amplificador operacional, se cree conocer sus componentes básicos a implementar: un amplificador operacional, dos resistencias, una pantalla LCD de 16x2, un potenciómetro rotatorio de 10 $K\Omega$ y una batería recargable de 9 V; todo instalado sobre una protoboard.

Sin embargo, de manera correcta se llegó a la selección y validación de los componentes electrónicos mediante la evaluación de tres alternativas de solución frente a los requerimientos de ingeniería y demandas de la señal a procesar en una matriz de decisión. El proceso de cómo se llevó a cabo dichas matrices para la selección de cada componente se describió en la sección metodológica 5.3.3. diseño detallado del prototipo de laboratorio (selección de componentes que hacen parte del prototipo de laboratorio de biosensor).

A continuación, se explicó el diseño y construcción del sistema de acondicionamiento de acuerdo a su descomposición funcional:

Sistema de amplificación

Para la construcción del sistema de amplificación operacional no inversor, se requirió de un amplificador y dos resistencias; componentes que fueron definidos a través de una matriz de decisión y de las ecuaciones que demuestran el funcionamiento de un amplificador no inversor.

Por lo tanto, en primer lugar, para determinar el amplificador se identificó los requerimientos que pedía la señal para su acondicionamiento, de acuerdo a los potenciales resultantes en los lineamientos de calidad del primer objetivo; los cuales fueron: voltaje de suministro máximo de 22 V , voltaje de entrada máximo de 15 V , voltaje offset para una resistencia de 10 $K\Omega$ de 1 mV a 6 mV y 4 pines de conexión. Teniendo presente, que no se requiere de un sistema complejo, sino de un sistema sencillo que mejore la linealización del resultado dado por el biosensor en términos de voltaje (mV).

En segundo lugar, se escogieron tres amplificadores operacionales conocidos en el mercado por cumplir con alguno de estos requerimientos y se sometieron a una matriz de decisión, donde fueron evaluados de 1 a 5, siendo 1 que no lo cumple y 5 que lo cumple en su totalidad; el amplificador que mayor sumatoria obtuvo al final fue el escogido (Ver Tabla 5-6).

Tabla 5-6.: Amplificador operacional. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Voltaje de suministro máximo de 22 V	5	5	5
Voltaje de entrada máximo de 15 V	5	5	5
Voltaje offset de 1 a 6 mV	5	1	5
Máximo 4 pines	5	1	1
PESO TOTAL	20	12	16

En tercer lugar, habiendo definido el amplificador LM741, se procedió a hallar el valor de las resistencias que permitieran una amplificación óptima, para lo cual el potencial de la señal de salida (V) debía ser el potencial de la señal de entrada (mV) multiplicado por una ganancia de amplificación de 10, ya que es el valor necesario para hacer la conversión de submúltiplos a unidad básica de voltios, es decir, se tenía un rango de 100 mV a 600 mV (0.1 V y 0.6 V) y al multiplicarlos por 10 se amplifica el voltaje de salida del prototipo a 1 V y 6 V . Las ecuaciones que se utilizaron para hallar el valor de las resistencias en un amplificador operacional no inversor fueron las siguientes:

En un amplificador no inversor el voltaje de entrada no se ve inhibido por alguna resistencia o corriente de entrada, por lo que ingresa el voltaje completo al amplificador. El voltaje de la entrada positiva es el mismo que el de la entrada negativa, ya que se dice que la corriente que circula hacia las resistencias es nula y, por ende, la única corriente que circula por las resistencias es la que viene

del voltaje de salida y pasa por estas hasta llegar a la tierra del circuito.

$$I_1 = I_2 \quad (5-9)$$

Al ser igual las corrientes del circuito no inversor, se dice que el voltaje de salida (V_{out}) sobre el voltaje de entrada (V_{in}) es igual a uno más la resistencia dos (R_F) sobre la resistencia uno (R_G), y todo eso es igual a la ganancia del circuito.

$$Av = \frac{V_{out}}{V_{in}} = 1 + \frac{R_F}{R_G} \quad (5-10)$$

Aunque inicialmente ya se tiene el valor de la ganancia (10), esta también se puede hallar dividiendo el voltaje de salida amplificado sobre ese mismo voltaje sin amplificar de entrada (1 V voltaje de salida / 0.1 V voltaje de entrada, valores tomados del rango de potencial definido en los requerimientos de ingeniería).

$$Av = \frac{1V}{0,1V} = 10$$

Por último, se despejó la resistencia dos (R_F) de la ecuación 5-10, reemplazando la ganancia con un valor de 10 y la resistencia uno (R_G) con un valor comercial de 1 $K\Omega$ (valor opcional).

$$\begin{aligned} 10 &= 1 + \frac{R_F}{1K\Omega} \\ R_F &= ((10 - 1) * 1K\Omega) \\ R_F &= 9K\Omega \end{aligned} \quad (5-11)$$

Cabe mencionar que la resistencia de 9 $K\Omega$ no es convencional y no se tenía al alcance, por ende, se optó por realizar previamente una suma en serie para calcular las resistencias que sumadas tuvieran el valor total de esta:

$$\begin{aligned} R_F &= R_1 + R_2 \\ R_2 &= 9K\Omega - 2,2K\Omega \\ R_2 &= 6,8K\Omega \end{aligned} \quad (5-12)$$

Se obtuvo los valores de los componentes electrónicos que conformaron el sistema de amplificación, como es la definición del amplificador operacional (LM741), la R_G (1 $K\Omega$), la R_1 (2.2 $K\Omega$), la R_2 (6.8 $K\Omega$) y una ganancia del sistema no inversor de 10. Con estos datos, en cuarto lugar se realizó

el montaje y simulación del sistema de amplificación de la etapa de instrumentación del biosensor, en el software Proteus 8 Professional, formato ISIS.

Cabe mencionar que para realizar la simulación del sistema de amplificación en el Software, el electrodo de referencia fue representado con el pin de salida de un potenciómetro rotatorio $10\text{ K}\Omega$ que suministra al sistema potenciales de entrada similares a los obtenidos con una muestra de lactosuero residual, ya que este es un componente electrónico flexible que al realizar su caracterización por mapeo permitirá obtener los valores de potencial deseados dentro del rango de detección del biosensor de lactosa. Por otro lado, el electrodo indicador tiene su conexión a tierra y es indicado con el pin negativo del potenciómetro, ya que su salida no otorga ningún valor debido a que este cumple su función dentro de la reacción química de oxido-reducción del lactosuero, es decir, este electrodo es el encargado de seleccionar específicamente las moléculas de glucosa resultantes de la hidrólisis de la lactosa y las trasmite al electrodo de referencia para que junto con el agente oxidante genere electrones que son cuantificados en términos de potencial (mV) generando una salida que va al sistema de amplificación como resultado de la medición del biosensor.

Dicho comportamiento es el fundamento del potenciómetro usado como entrada del amplificador operacional, analogía indicada en la simulación y montaje del circuito electrónico resultante de la fase tres del presente documento.

Teniendo en cuenta los componentes seleccionados y la explicación de la relación del electrodo combinado con el sistema de amplificación, para realizar el montaje del sistema en el software se buscó cada uno de los componentes requeridos en la barra de herramientas y se conectaron entre sí, iniciando por el amplificador LM741, las dos resistencias, la fuente de alimentación (V_{cc} y GND), el potenciómetro rotatorio de $10\text{ K}\Omega$ (el cual simula el potencial de entrada dado el electrodo de referencia), el diodo LED como indicador y los multímetros DC para la visualización de los voltajes de entrada y salida del sistema. Como guía se utilizó la imagen de un amplificador operacional no inversor consultado por la web.

Y en último lugar, el montaje realizado en el software fue llevado a simulación con un voltaje de entrada de 0.1 V (simula el potencial captado por el electrodo combinado para ser acondicionado y procesado en la etapa de instrumentación), los resultados son observados numéricamente en la pantalla de los multímetros, donde el multímetro de entrada arroja un voltaje de 0.1 V (100 mV) y el multímetro de salida del sistema luego de la amplificación con una ganancia de 10, da un voltaje de 1 V . Resultados que permitieron corroborar el funcionamiento básico del sistema para cuando fuera montado en protoboard y no presentara fallas técnicas ni funcionales.

Por otro lado, con este montaje simulado en formato ISIS, se procedió a realizar la PCB mediante el formato ARES del software Proteus 8 Professional, con la finalidad de dejarla planteada para que el usuario que quiera evaluar el funcionamiento íntegro de las etapas de reconocimiento e instru-

mentación, pueda llevarla a impresión y acoplarle los componentes electrónicos mediante soldadura; logrando finalizar la construcción de la etapa de instrumentación al 100 % (circuito electrónico diseñado en ARES, impreso, soldado y programado). Para ello, se requiere tomar los componentes electrónicos del sistema de amplificación diseñado en ISIS, ubicarlos de manera que ocupen menor espacio entre ellos y que facilite la creación de los caminos de corriente, evitando errores; posteriormente se guarda el archivo ARES por medio del software, dejando este a la disposición del usuario, para que lo construya al momento de poner en práctica el protocolo de evaluación del biosensor.

Sistema de alimentación

El sistema de amplificación requiere de una fuente de alimentación de 5 V o 9 V para su funcionamiento. Las alternativas de fuentes pueden ser: una batería recargable, unas pilas no recargables o una fuente de voltaje no inalámbrica; pero teniendo en cuenta los siguientes requerimientos de ingeniería: voltaje de alimentación de 9 V, inalámbrico, menor tamaño, fácil manipulación y recargable, se optó por una batería recargable, como lo señala la siguiente matriz de decisión:

Tabla 5-7.: Fuentes de alimentación. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Voltaje de alimentación de 9 V	5	3	5
Fuente de alimentación inalámbrica	5	3	1
Menor tamaño y fácil manipulación	4	3	1
Fuente recargable	5	2	1
PESO TOTAL	19	11	8

Por lo tanto, la fuente de alimentación fue una batería recargable de 9 V, la cual se conectó a la placa de desarrollo para alimentarla y que esta alimente el sistema de amplificación. Se decidió que la batería tuviera mayor voltaje que la placa de desarrollo en caso de que se requiera conectar otro circuito electrónico a parte del sistema de amplificación, como es el caso del sistema de dosificación del agente oxidante.

Procesamiento de la señal útil

El potencial de salida del sistema de amplificación (V) requiere de la fase de procesamiento, ya que se debe convertir dicho resultado en términos de cantidad de lactosa (mg), además de facilitar la visualización del dato mediante una interfaz con el operario. Razón por la cual, el procesamiento de la señal útil esta descompuesto funcionalmente en: placa de desarrollo o procesador electrónico, programación en el software y sistema de visualización de la cuantificación de lactosa.

Placa de desarrollo o procesador electrónico

Un procesador electrónico participa con su circuito integrado programable en la construcción de dispositivos digitales e interactivos que puedan detectar y controlar una señal. Es por ello que este componente es importante para la etapa de instrumentación del biosensor, ya que permite conectar el sistema de amplificación con la programación asignada para convertir la cuantificación de lactosa del orden de los V a la cantidad de lactosa en mg , a través de la ecuación de regresión lineal definida con las gráficas resultantes de los lineamientos de calidad del primer objetivo específico; así como también el procesador envía el dato procesado y cuantificado al sistema de visualización para mayor facilidad e interpretación por parte del operario, a quien le concierne la importancia de dicho resultado luego de detectar lactosa en el lactosuero.

Tabla 5-8.: Placa de desarrollo. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Voltaje de entrada de 9 V aprx	5	1	1
Requiere de un PWM de 8 bits	5	5	5
Menos de 14 pines digitales	4	1	5
Memoria flash de aprox 32KB	5	5	4
Frecuencia de 16 MHz	5	3	3
Facilitar el mantenimiento y calibración de cada etapa	5	3	3
PESO TOTAL	29	18	21

Por ende, para la selección del procesador electrónico (microcontrolador o placa de Arduino) que acondiciona la señal electroquímica del sistema de amplificación, se tuvo que escoger tres alternativas de solución y realizar la evaluación de los requerimientos de ingeniería mediante su calificación en una matriz de decisión, seleccionando el que mayor sumatoria diera al final del estudio ingenieril. Con estos requerimientos y teniendo en cuenta que los conocimientos del operario de producción de lácteos en temas de biosensores electroquímicos no son iguales a los de un profesional en Bioingeniería, se buscó y seleccionó tres procesadores óptimos para la fase de lectura y acondicionamiento de la señal, los cuales fueron: la placa de desarrollo Arduino Nano con su software de programación, el microchip PIC-18F4550 y el microchip PIC-16F84. Estos fueron ubicados dentro de la matriz de decisión junto con los requerimientos en ingeniería y evaluados de 1 a 5, de acuerdo a lo arrojado en sus hojas de datos (datasheet) (Ver Tabla 5-8).

Siendo el procesador electrónico Arduino, su plataforma Nano (basado en el microcontrolador ATmega328) y el software de programación Arduino los establecidos, ya que cuenta con la cantidad de pines (14 puertos digitales de entrada/salida, 8 puertos análogos) suficientes para la conexión

del sistema de visualización, como de la etapa de instrumentación y sistema de dosificación automático de la solución del agente oxidante. También cumple con el orden de importancia de los requerimientos técnicos dados por el método QFD; como son: menor tamaño, ligero, compacto, de fácil instalación, funcionamiento, mantenimiento y análisis; además los requerimientos del operario que lo diferenciaron de las demás alternativas fueron:

1. La interacción didáctica entre usuario no capacitado ni conocedor de las áreas de química o electrónica en biosensores con respecto al circuito impreso, sistema de dosificación automático del cofactor, pantalla LCD 16x2 y el software Arduino.
2. La explicación paso a paso del uso, adecuación y funcionamiento del procesador dentro de su rol en el prototipo de biosensor.
3. Los entornos de desarrollo y lenguaje de programación de Arduino y las placas en las que se ejecutan han sido desarrollados de la mano, por lo que asegura tanto la compatibilidad como la sencillez de desarrollo sobre ellas.
4. El sistema de conexión es independiente de un puerto USB, Wifi o Bluetooth y sus características con respecto a los voltajes de entrada-salida (7 V a 12 V) son adecuados a los requerimientos por parte del electrodo combinado.

La placa de desarrollo Arduino Nano fue instalada y conectada al sistema de amplificación montado y simulado en el formato ISIS del software Proteus, para lo cual se requirió de la instalación de la librería Arduino. La salida del amplificador operacional no inversor se conectó a un pin análogo (A0), al igual que sus pines de alimentación a 5 V y *GND*.

La librería Arduino permite adquirir el hardware y el software, para su programación y simulación, brindando seguridad y un modelo de referencia al momento de llevar el montaje del circuito electrónico del software a la protoboard cumpliendo con los requerimientos de ingeniería del prototipo de laboratorio de biosensor.

Programación en el software

En primer lugar, el código de Arduino del sistema de amplificación consistió en la inicialización y lectura del pin análogo al que se manda la señal eléctrica proveniente del pin de salida del amplificador operacional, luego en la función void loop se realizó el mapeo de los datos adquiridos, es decir, la conversión de unidades de bytes a voltios (0-1023 *bytes* a 0-600 *mV*), para aplicar la regresión de la metodología realizada en el primer objetivo (ir de potencia a concentración).

Después se acondicionó y colocó la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración (relación directamente proporcional voltaje (mV) en función de concentración de lactosa (mol/L)) con el objetivo de poder realizar la transformación de voltaje a concentración de lactosa y, posteriormente, se realizó la conversión de unidades de concentración de lactosa (mol/L) a masa o cantidad de lactosa (mg) por medio del despeje de la ecuación de molaridad química, ya que para el operario le es más sencillo y comprensible trabajar en unidades de masa conocidas. A continuación, el valor obtenido en término de mg de lactosa, debe ser enviado a un sistema de visualización, donde es observado para mayor facilidad de lectura y análisis por parte del operario de producción de lácteos, si este valor es mayor al límite dado por la normativa entonces se prende un diodo LED como indicador de alerta (se explica más adelante).

En segundo lugar, el código generado en el software de Arduino se guardó como archivo .HEX, con la finalidad de llevar dicha extensión al montaje realizado en el software Proteus y poderlo simular en conjunto, verificando que el circuito electrónico diseñado y el código creado estuvieran en orden y arrojaran los resultados esperados en las unidades y tiempo requerido. Sin embargo, para su verificación se necesitó de la implementación de un sistema de visualización. Se recomienda visualizar el diagrama de flujo del pseudo-código completo de la etapa de instrumentación, presente al final de esta tercera fase metodológica en la Figura 5-23.

Sistema de visualización

Como el prototipo de laboratorio es un producto que facilita el trabajo experimental y analítico del operario de producción de lácteos, el valor de la cuantificación de lactosa que es registrado por la etapa de instrumentación debía ser visualizado por el operario, ya sea mediante una pantalla LCD, la conexión a un computador o el envío por bluetooth al celular de la medición; puesto que los requerimientos de ingeniería exigen que el sistema de visualización debe: verse de manera inmediata, ser de fácil interpretación por el operario, ser portable y menor tamaño y simplicidad del producto. Pero como se tenían tres alternativas de solución para seleccionar la correcta se realizó una matriz de decisión con calificación de 1 a 5, evaluando cada alternativa con los requerimientos pedidos para el desarrollo del biosensor (Ver Tabla 5-9).

Tabla 5-9.: Sistema de visualización resultados. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Visualización de manera inmediata	5	4	3
Resultado de fácil interpretación	4	2	3
Producto portable	5	1	3
Menor tamaño y simplicidad del producto	4	1	2
PESO TOTAL	18	8	11

Tabla 5-10.: Regulador menú de visualización. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Fácil mantenimiento	5	4	1
Selección sencilla de un menú	5	1	4
Durabilidad	5	4	1
Tamaño óptimo según pantalla LCD 16x2	4	2	2
Controlar luz pantalla LCD 16x2	5	4	1
PESO TOTAL	24	15	9

Dando como resultado la pantalla LCD, porque permite la visualización de la medición arrojada por el biosensor con el menor tiempo de retraso, al igual que permite la interacción entre el operario y el equipo a través de un menú que es seleccionado con el movimiento de un potenciómetro de 10 $K\Omega$), el cual también fue escogido por una matriz de decisión presentada en la Figura 5-10.

Habiendo escogido la pantalla LCD como la manera de visualizar el resultado arrojado por la etapa de instrumentación, esta fue ubicada en el montaje del software Proteus junto con los demás componentes de la etapa de amplificación. Para ello sus pines voltaje de alimentación, selección de registro, activación, DB4, DB5, DB6, DB7 y DB8 fueron conectados a los pines digitales de Arduino Nano y 5 V.

Luego de estar conectada la pantalla LCD a la placa de desarrollo de Arduino Nano, se programó para que recibiera y visualizara la cantidad de lactosa (mg) medida por las etapas de reconocimiento e instrumentación, mediante la librería LyquidCrystal con la cual se inicializó y leyó los pines de la pantalla. Luego, en la función void loop se programó un potenciómetro como seleccionador del menú; mediante las funciones de: inicialización, mapeó y condicionales para que de acuerdo al valor dado al rotar el potenciómetro fuera mandado un anuncio a la pantalla LCD (Bienvenida, dosificación y lectura) y según lo deseado por el operario visualice el contenido de cada opción del menú. En el caso de la opción dosificación, se debe seleccionar con el potenciómetro y ejecutar con un pulsador, el cual cuando es oprimido emite en la pantalla un registro de ON hasta que se haga la dosificación pasando a estado OFF; para que así el operario posteriormente lo lleve a la opción de lectura de la muestra (Ver Figura 5-23).

5.3.5. Montaje en protoboard, sistema de dosificación y evaluación de la etapa de instrumentación

La sección de montaje en protoboard y evaluación de la etapa de instrumentación como su palabra lo dice, esta conformada por dos subsecciones. La primera hace referencia a la construcción en

protoboard de la etapa instrumental, para lo cual se utilizó el montaje realizado y simulado en el software Proteus. Y la segunda consiste en la evaluación de esta etapa, donde la entrada del amplificador debía ser el potencial arrojado por la reacción química presente en el lactosuero residual captado por el electrodo de referencia, pero por limitaciones al acceso de los agentes químicos y a la muestra de lactosuero se instaló en el montaje de la protoboard un potenciómetro rotatorio al igual que en la simulación, donde su pin de salida hace la analogía del comportamiento de este electrodo; mientras que el pin negativo de este componente representa al electrodo indicador, por lo que es llevado a tierra ya que su valor numérico es nulo.

Montaje en protoboard

Habiendo simulado el diseño propuesto para la etapa de instrumentación, se montó en protoboard el circuito electrónico diseñado y simulado en el software Proteus 8 Professional, teniendo al alcance todos los componentes electrónicos necesarios, ubicándolos en la protoboard y conectándolos entre sí a través de cables como indica el montaje simulado.

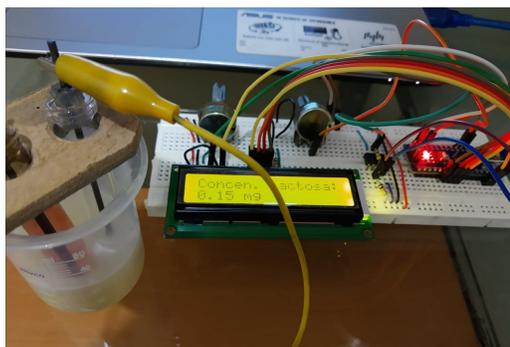


Figura 5-20.: Montaje de la etapa instrumental del software Proteus a protoboard. Fuente: Autor.

En primer lugar, se conectó el amplificador LM741 a la protoboard y se le acondicionó las dos resistencias al pin dos de este, la resistencia de $1\text{ K}\Omega$ fue conectada en su otro extremo a la tierra de la protoboard y las resistencias en serie que equivalen a $9\text{ K}\Omega$ fueron unidas por el otro extremo al pin 6 del amplificador. El pin 3 va conectado al pin de salida del potenciómetro rotatorio de $10\text{ K}\Omega$ (cable coaxial del electrodo de referencia), el pin 4 a tierra y el pin 7 a la línea de voltaje de 5 V de la protoboard, mientras que el pin 6 del amplificador (salida) fue conectado al pin A0 de la placa de Arduino Nano, para ser leída y procesada.

En segundo lugar, se conectó la pantalla LCD 16x2 al Arduino Nano, como se había indicado en

la anterior subsección del sistema de visualización; agregando que al pin 3 de la pantalla se le debía conectar directamente un potenciómetro rotatorio de $10\text{ K}\Omega$, con la finalidad de controlar la intensidad de luz reflejada por esta para mejor visualización por parte del usuario.

En tercer lugar, se conectó el pulsador que activa el sistema de dosificación al pin 12 del Arduino Nano y un tercer potenciómetro rotatorio de $10\text{ K}\Omega$ a esta placa de desarrollo de manera independiente a los anteriores componentes (seleccionador del menú), su pin de salida fue conectado al pin A1, los demás pines estaban conectados a la línea de voltaje de 5 V y tierra de la protoboard alimentada por la placa, la cual a su vez era alimentada por una batería recargable de 9 V .

En cuarto lugar, se conecta un diodo LED al pin 10 del Arduino, con la finalidad de indicar al usuario si la cantidad medida de lactosa en el lactosuero se encuentra fuera del límite permisible dado por la normativa colombiana de vertimientos de las industrias lácteas (mayor a 400 mg).

Finalmente, se obtuvo el montaje completo en protoboard de la etapa de instrumentación junto con su amplificación, lectura, acondicionamiento y visualización numérica de la cantidad de lactosa detectada, lo que permitió realizar posteriormente su evaluación.

Montaje y programación del sistema de dosificación de la solución del agente oxidante

Tabla 5-11.: Sistema desplazamiento de jeringa. Fuente: Autor.

Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Fácil acoplamiento	3	2	5
Desplazamiento perpendicular	4	2	5
Fácil acondicionamiento del motor y émbolo	4	4	5
Menor tamaño y simplicidad	2	3	4
Fácil mantenimiento	2	3	4
PESO TOTAL	15	14	23

Esta subfase de la metodología es un complemento que permite cumplir con la construcción completa del prototipo de biosensor, puesto que el presente es un proyecto de grado en modalidad producto y junto con el concepto de biosensor, se conoce que sus etapas deben estar integradas, ser autónomas, facilitar la cuantificación de la lactosa al usuario, no contar con métodos analíticos tradicionales y menos con tratamientos exhaustivos y manuales de la muestra. Del mismo modo, se debe dar a visualizar el desarrollo de ingeniería en el mismo, donde se reflejen algunos conocimientos aprendidos durante la formación profesional.

Motivo por el cual, se desarrolló el montaje y programación del sistema de dosificación automático

del cofactor o agente oxidante permanganato de potasio al electrodo de referencia, según dosis requerida; ya que, este sistema suprime algunos procesos químicos que únicamente se deben realizar en el laboratorio de química siguiendo unas pautas de normatividad y seguridad con el uso de reactivos, evitando el contacto mínimo por parte del usuario no conocedor con los reactivos a utilizar. Además, de permitir el estudio en campo de varias muestras con el prototipo de biosensor, donde el usuario únicamente debe agregar 5 *mL* de la solución del cofactor ya preparada por el fabricante del equipo (entregada en presentación de vidrio) al dosificador, poner en funcionamiento el biosensor y colocar el recipiente con los 20 *mL* de la respectiva muestra de lactosuero en el electrodo combinado.



Figura 5-21.: Montaje sistema de dosificación automático, solución del agente oxidante.
Fuente: Autor.

Es por ello que el sistema de dosificación del cofactor se realizó de manera automática, mediante la guía y acondicionamiento de referencias bibliográficas. Dicho sistema consiste en un prototipo inicial mediante el desplazamiento de una correa de distribución de impresora por un piñón conectado a un motor paso a paso, la correa de distribución está acoplada al émbolo de una jeringa de 5 *mL*. Con respecto al circuito electrónico, los pines del motor van conectados a un driver de corriente con cuatro pines de salida y dos de conexión a la fuente de voltaje; cabe aclarar que este sistema es acoplado a la etapa de instrumentación ya realizada y nombrada en la anterior subfase, para así poder ser llevada a la impresión del circuito y soldar cada uno de sus componentes en sus debidos espacios (Figura 5-21) (Oliva, 2014).

El motor paso a paso fue controlado por la placa de desarrollo de Arduino Nano y un pulsador de activación, en donde antes de activar la lectura de la lactosa en el lactosuero, se debía activar la dosificación de 1 *mL* de la solución del agente oxidante por parte de la jeringa al electrodo de referencia. Este proceso se realiza las veces necesarias de muestras de lactosuero a evaluar, hasta

que la solución del agente oxidante que se encuentra en la jeringa se termine y requiera del llenado manual nuevamente, siendo así, se estima que la dosificación automática abastece la medición de 5 muestras (Oliva, 2014).

La programación del sistema de dosificación automático consistió en la conexión de cuatro pines digitales de salida del driver de corriente (ULN2003) del motor paso a paso al Arduino Nano (pin 9, 7, 8, 6) que corresponden a las cuatro bobinas que activan el movimiento del motor, los otros dos pines se conectan a la fuente de alimentación de la protoboard (5 V) y a la tierra (GND) respectivamente. Luego, en el software de Arduino con la ayuda de la librería Stepper se realizó la inicialización y declaración del estado en que se encuentran las cuatro bobinas que conforman el funcionamiento del motor y su rotación, con la función `stepper.step(-1024)` se ordenó que el motor gire 1024 pasos a una velocidad de 200 revoluciones (Oliva, 2014).

Previamente se tuvo que buscar en la hoja de datos del motor paso a paso 28BYJ-48 bipolar alimentado con 5 V los pasos que este es capaz de dar por vuelta, los cuales se calculan de la siguiente manera:

Se considera que el motor tiene un ángulo de paso de 11.25° sobre $1/64$ de relación de posición y en total el motor gira 32 pasos por revolución interna del eje del motor, por lo que a modo de paso completo la ecuación que halla los pasos para una vuelta completa del motor es (Crespo, 2017):

$$\begin{aligned} \text{Pasosvuelta completa} &= (\text{Relaciondeposicion} * \text{Pasosrevolucioninterna}) \\ \text{Pasosvuelta completa} &= 64 * 32\text{pasos} \\ \text{Pasosvuelta completa} &= 2048\text{pasos} \end{aligned} \tag{5-13}$$

La anterior ecuación define que para 360° de un giro completo en sentido horario del motor se necesita 2048 pasos, por lo que para medio giro, es decir, 180° se necesita 1024 pasos y en el caso del sistema de dosificación se requiere que gire e sentido anti-horario, por lo que se programa colocando el número de pasos con signo negativo (Crespo, 2017).

La determinación del movimiento del motor parte de la caracterización de este teniendo en cuenta la cantidad de mililitros que recorre con respecto al número de pasos dados, para este caso se necesita dosificar 1 mL de la solución del agente oxidante con la jeringa mediante el sistema mecánico de dosificación. La caracterización se realizó con ayuda de un transportador donde se buscó el ángulo exacto que requiere el motor para desplazar el émbolo de la jeringa de 5 mL sólo 1 mL, ya que es lo que se requiere dosificar. Una vez se conoce los grados que son necesarios para dosificar 1 mL, se procede a realizar la ecuación de relación entre los mililitros recorridos por el émbolo de la jeringa

y el número de pasos necesarios para alcanzar estos (Castaño, 2018):

$$\begin{aligned}
 \text{Pasosmediavuelta} &= \frac{360^\circ * 180^\circ}{\text{Pasosvuelta completa}} \\
 \text{Pasosmediavuelta} &= \frac{360^\circ * 180^\circ}{2048} \\
 \text{Pasosmediavuelta} &= 1024 \text{pasos}
 \end{aligned}
 \tag{5-14}$$

Con la anterior ecuación se concluyó que el número de pasos para dosificar 1 *mL* de la solución en el electrodo de referencia es de -1024 puesto que debe rotar 180° y debe girar en sentido anti-horario, este dato es registrado dentro del código de funcionamiento del motor y la librería Stepper (Castaño, 2018).

Aplicando este sistema sobre la estructura del prototipo de laboratorio de biosensor, el potenciómetro que selecciona el menú debe ser llevado a la opción de dosificación y con el pulsador activar el sistema, permitiendo que en la pantalla LCD se visualice que el estado de este pasa de OFF a ON y una vez es finalizado nuevamente a OFF, indicando al operario que debe proseguir con la lectura de la cantidad de lactosa presente en la muestra de lactosuero (Oliva, 2014).

Evaluación de la etapa de instrumentación

Habiendo establecido la metodología selectiva para la detección y cuantificación de lactosa, realizado la construcción del diseño detallado del prototipo de biosensor y de su etapa instrumental, así como, adicionalmente el montaje; posteriormente se realizó la evaluación para verificar el funcionamiento de la etapa instrumental del biosensor. Sin embargo, en lugar de la medición obtenida por la reacción química del lactosuero residual a partir del electrodo de referencia, se programó un potenciómetro que al girarse fuera leído y mapeado de bytes a milivoltios, continuando con toda la programación ya creada anteriormente, puesto que por motivos de fuerza mayor no fue posible conseguir el lactosuero residual ni tampoco los agentes químicos por ser reactivos controlados.

El procedimiento de control de calidad esperado consistía en realizar tres triplicados durante tres días, donde cada triplicado se basa en tres réplicas para la concentración incógnita de lactosa presente en el tipo de lactosuero; pero como en este caso se trabajó con variaciones de potencial según el giro de un potenciómetro, no se necesitó de la ejecución de los lineamientos de calidad, ya que el potenciómetro al ser una resistencia caracterizada dentro de un rango definido y de ser programada dentro del rango de estudio de la lactosa con una ecuación de regresión lineal fija, los valores resultantes siempre serán los mismos para el valor asignado por el potenciómetro. Los datos visualizados son registrados en una tabla y representados en una gráfica de potencial en función de

concentración de lactosa en Excel. Dicha gráfica y resultado del montaje en protoboard del sistema de amplificación se encuentra en los resultados de la fase tres.

Por ende, el procedimiento para la cuantificación de lactosa directamente del lactosuero residual (simulado con potenciómetro rotatorio) consistió en tomar el montaje realizado en protoboard, proporcionarle una fuente de alimentación con una batería de 9 V, encender la pantalla LCD y elegir la opción de lectura encontrada en el menú. Esta opción reflejará la variación del potenciómetro (electrodo de referencia) según el rango de detección del biosensor de lactosa (100 mV a 600 mV), pasando dicho potencial por el sistema amplificación no inversor y llegando a la placa de desarrollo Arduino Nano donde internamente es convertido a concentración de lactosa (mol/L) y luego a cantidad de lactosa (mg), siendo finalmente llevado a visualización por medio de la pantalla LCD 16x2.

De acuerdo a los resultados dados por el análisis de la tabla y gráfica obtenida en Excel, se concluye que la metodología establecida, los componentes químicos y electrónicos seleccionados, los lineamientos de control de calidad, el diseño conceptual y detallado que conllevan a su funcionamiento dieron cumplimiento en su totalidad al levantamiento de los requerimientos establecidos de manera viable y confiable, además, de asegurar un método que permita cuantificar la lactosa presente en el lactosuero residual de manera automatizada, confiable, en el menor tiempo posible y ambientalmente más efectiva, para garantizar una mejor calidad de los vertimientos de las industrias lácteas (Jiménez León, 2009).



(a) Con lactosuero residual.
Fuente: Autor.



(b) Con potenciómetro rotatorio. Fuente: Autor.

Figura 5-22.: Montaje para evaluar la etapa de instrumentación.

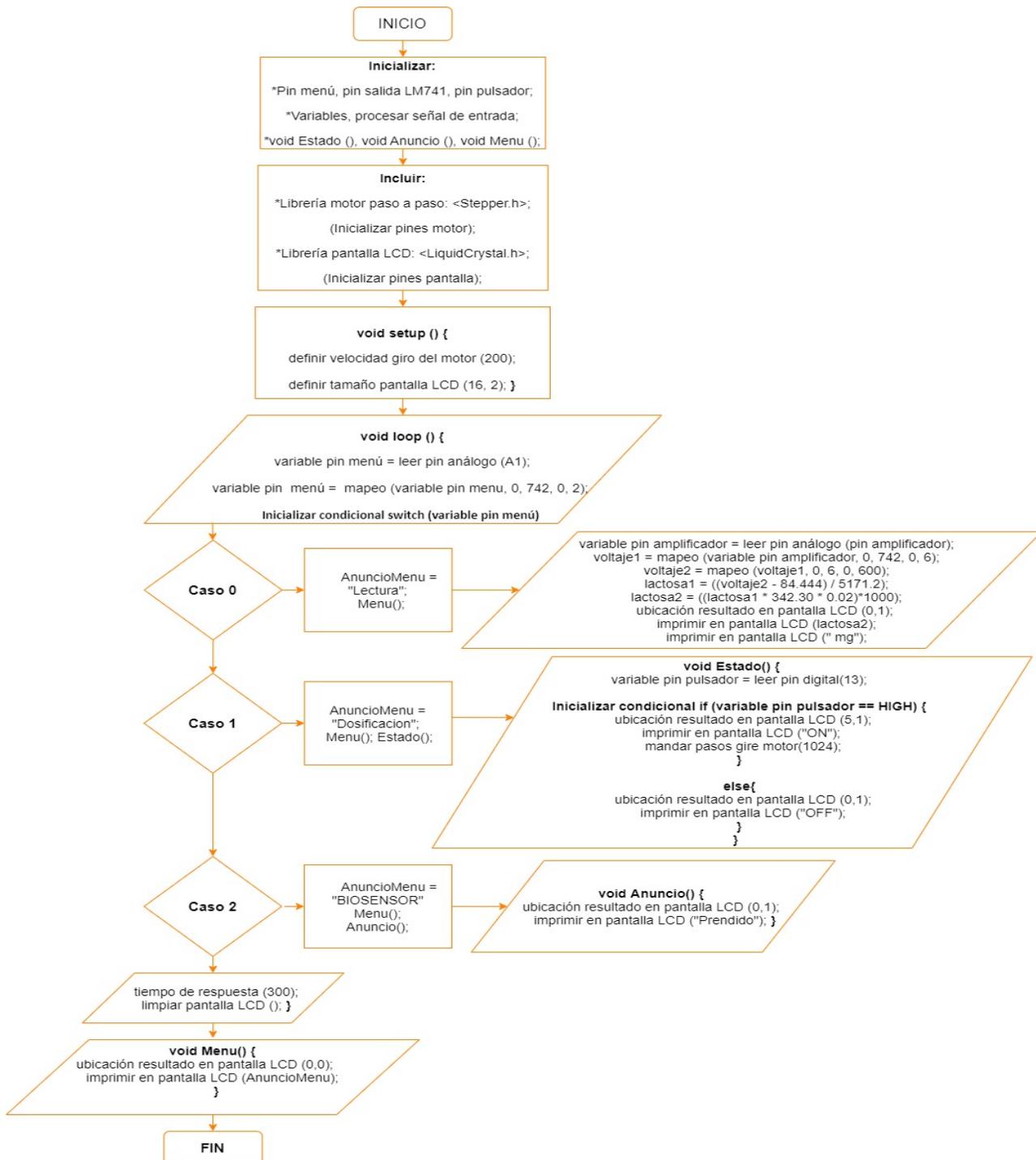


Figura 5-23.: Diagrama de flujo, pseudo-código de la etapa instrumental del prototipo de laboratorio de biosensor en placa de desarrollo Arduino Nano. Código en lenguaje C, Software Arduino. Fuente: Autor.

5.4. Fase IV. Formulación de un protocolo de evaluación del funcionamiento del biosensor

Por último, en el cuarto objetivo se desarrolló un protocolo de evaluación para el adecuado funcionamiento del prototipo de laboratorio de biosensor, para lo cual se explica cómo se formuló cada sección del protocolo a partir de una guía de trabajo planteada por la autoría. Por esta razón, el procedimiento para llevar a cabo su ejecución está dividida en las siguientes secciones (Figura 5-24):

- Introducción del protocolo,
- Validación de la etapa de reconocimiento biológico
- Validación de la etapa de instrumentación
 - Transductor electroquímico
 - Acondicionamiento y procesamiento de la señal útil
- Evaluación en conjunto de las etapas anteriores dentro de la estructura del diseño detallado del biosensor.

5.4.1. Introducción del protocolo a formular

En esta sección se explicó cómo está conformado el protocolo para tomar la muestra del lactosuero residual en campo, al igual que cómo cuantificar la lactosa presente a partir de la validación de las dos etapas que constituyen el biosensor, además de cómo se interpretan los resultados obtenidos por parte de la pantalla LCD del dispositivo en términos de *mg* y, finalmente las recomendaciones a tener en consideración al momento de poner en funcionamiento el producto desarrollado.

5.4.2. Validación de la etapa de reconocimiento biológico

El protocolo para la validación de la etapa de reconocimiento consistió en la descripción paso a paso de manera escrita y representada en un diagrama de flujo acerca del procedimiento a seguir para llevar a cabo la preparación y ejecución de la metodología selectiva ya establecida, validando

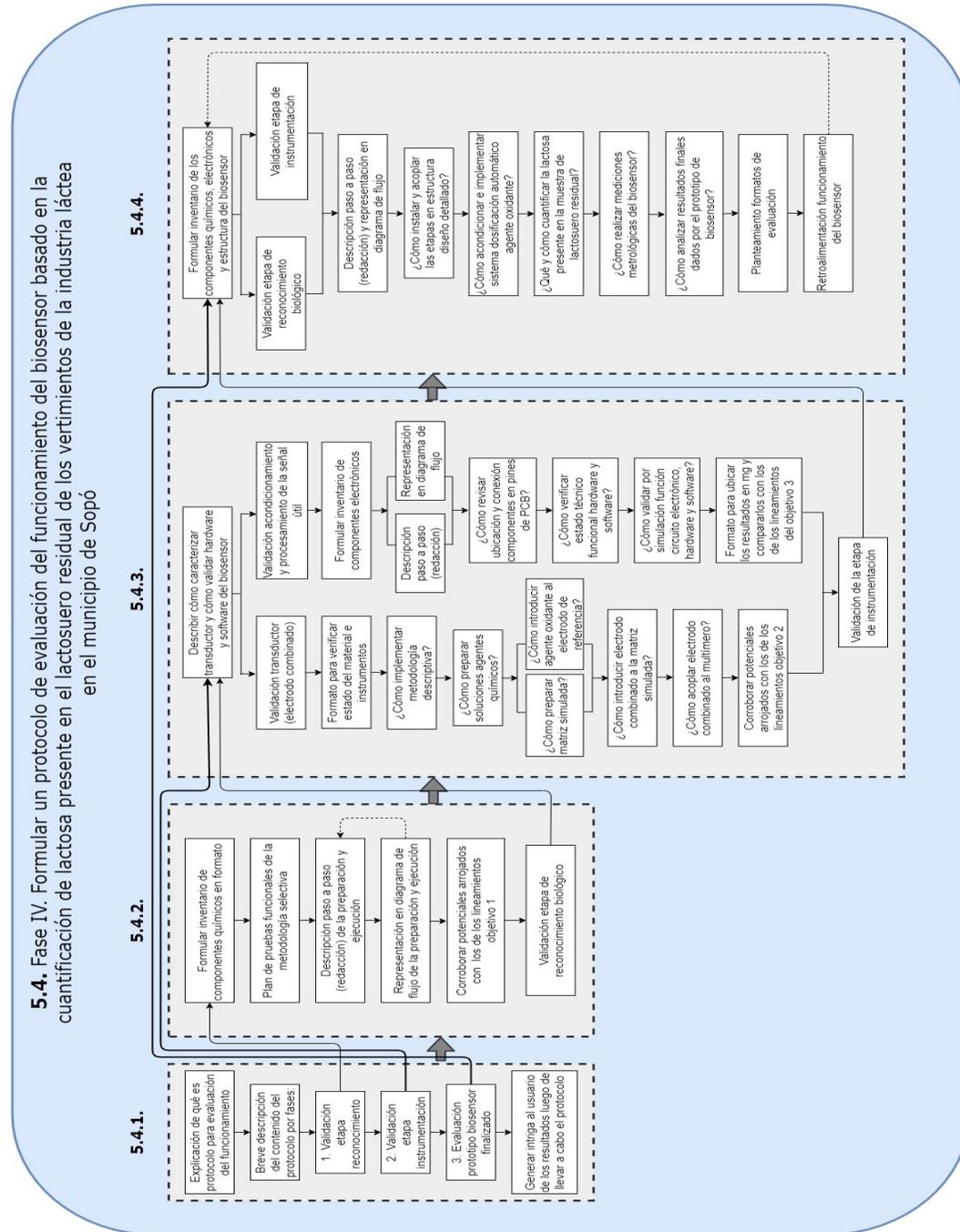


Figura 5-24.: Fase IV. Diagrama de bloques, procedimiento para llevar a cabo el cuarto objetivo por cuatro secciones. Fuente: Autor.

que los potenciales arrojados en función de la concentración de lactosa por medio del electrodo combinado unido al multímetro sean similares a los obtenidos por los lineamientos de calidad analíticos de la primera fase del presente trabajo, es decir, se realiza una caracterización de la etapa de reconocimiento biológico. Para la validación e interpretación de los resultados obtenidos se debe diligenciar un formato de evaluación que se indica dentro del protocolo. Las subsecciones que conducen a la validación de esta etapa parten del inventario de los componentes químicos y un plan de pruebas funcionales basadas en la metodología selectiva propuesta para la detección de lactosa en lactosuero residual.

5.4.3. Validación de la etapa de instrumentación

La validación de la etapa de instrumentación parte de corroborar el funcionamiento del electrodo combinado, lo que se refiere a la caracterización del par de electrodos grafito-grafito cuando son sometidos a una matriz simulada de lactosuero y su análisis con respecto a los resultados obtenidos de los lineamientos de calidad analíticos en el desarrollo de la etapa de instrumentación para conformar el prototipo de laboratorio de biosensor. Para lo anterior, se necesitó de la construcción de un diagrama de flujo y de la explicación textual de cómo llevar a cabo la caracterización y validación de la segunda etapa para una mejor interpretación por parte del usuario del producto o lector del documento. Por otro lado, al ser una etapa compleja de trabajar e interpretar, se divide en dos: transductor electroquímico y, acondicionamiento y procesamiento de la señal útil.

Validación del funcionamiento del transductor

La caracterización del transductor o electrodo combinado partió de la descripción de cómo implementar la metodología selectiva realizada en la validación de la etapa de reconocimiento. La explicación de la metodología selectiva se refiere al proceso de preparación de la matriz simulada de lactosuero y de las soluciones de los agentes hidrolizante y oxidante utilizados para la detección de lactosa. Al igual que se explica el paso a paso del acondicionamiento del electrodo combinado al multímetro y la visualización del potencial arrojado cuando el electrodo combinado es sumergido en la muestra de estudio. Además del planteamiento de un formato guía para la verificación previa del estado del material e instrumentos a implementar para su correcta validación.

Validación del sistema de acondicionamiento y procesamiento de la señal útil

El protocolo para la validación del acondicionamiento y procesamiento de la señal útil se fundamentó en: proponer un inventario de los componentes electrónicos a usar, el cual se encuentra plasmado en un formato guía; la explicación textual acompañada con un diagrama de flujo de cómo revisar la ubicación y conexión de dichos componentes en los pines correspondientes a la placa del circuito impreso (PCB); y la manera de verificar el estado técnico-funcional tanto del hardware como del software. Posteriormente, en esta subsección del protocolo se describió el proceso para el validar el funcionamiento de la parte electrónica junto con la programación y visualización de la señal mediante su simulación en un software; cuyos resultados deben ser colocados en un formato de evaluación, para ser comprendidos por el usuario a partir de los datos de referencia resultantes del método de lineamientos de calidad analíticos del tercer objetivo.

5.4.4. Evaluación de las etapas en conjunto

La evaluación del prototipo completo del biosensor, es explicada en el protocolo con el paso a paso de cómo instalar y acoplar las etapas de reconocimiento biológico e instrumentación en la estructura del diseño detallado, teniendo presente el protocolo a seguir para el uso del sistema de dosificación automático del agente oxidante, el cual se encuentra ubicado dentro del diseño detallado y es validado con la integración de las dos etapas del biosensor. Dentro del protocolo se usa una representación gráfica y escrita para mostrar la explicación y planteamiento de la evaluación de las etapas integradas, complementando con la presentación de formatos de evaluación y verificación.

Por lo tanto, la evaluación del prototipo finalizado se fundamentó en cómo realizar sus mediciones metrológicas, donde se incluye: precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad; qué y cómo cuantificar la lactosa presente en la muestra de campo para luego analizar los resultados obtenidos, logrando verificar la satisfacción o inconformidad del usuario con respecto al funcionamiento del equipo. Al presentarse alguna falla en el transcurso de la validación y evaluación del prototipo de biosensor, se debe tener en cuenta: reportar por medio de anotaciones en los formatos, analizar el error, informar al fabricante o tomar las recomendaciones dadas durante el protocolo para su corrección y mejoramiento.

Para así, llegar a concluir que el biosensor resultó ser efectivo y viable luego de cumplir cada uno de los requerimientos previamente planteados (Gerstner et al., 2014).

6. Resultados y Discusión

Los resultados que permitieron llegar al desarrollo de un prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual de la industria láctea, como alternativa para el monitoreo de sus vertimientos en el Municipio de Sopó, fueron obtenidos a medida que se ejecutó cada una de las fases de la metodología propuesta del presente proyecto (Ver Contenido 5). Por ende, los resultados se encuentran ubicados a continuación en cuatro fases u objetivos específicos, de acuerdo al modelo de metodología de prototipos incrementales. Así mismo, los resultados cuentan con métodos analíticos que permiten corroborar, validar y dar certeza de cada proceso.

6.1. Fase I. Metodología de detección selectiva de lactosa

Los resultados del primer objetivo se obtuvieron según las cuatro subfases de la metodología, las cuales parten de la búsqueda bibliográfica y acoplamiento de algunas metodologías para detección de lactosa, la relación estequiométrica de los agentes químicos en relación a la cantidad de lactosa, la selección del agente oxidante que mejor interactúa con el agente hidrolizante y la validación por lineamientos de control de calidad analíticos de la metodología selectiva, agentes químicos y el par de electrodos establecidos. Para finalmente concluir el primer objetivo con una metodología selectiva establecida para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, la cual se evidencia mediante dos diagramas metodológicos a seguir para posteriores estudios (Figura 6-30 y 6-31).

6.1.1. Selección del agente oxidante

En esta subfase se seleccionó el agente oxidante que acompaña al electrodo de referencia, como también se evaluó la eficacia del agente hidrolizante con el agente oxidante al momento de detectar lactosa. Para lo cual, se pre-seleccionó tres tipos de agentes oxidantes: Permanganato de Potasio,

Sulfato de cobre (II) y Cloruro de Calcio; y se evaluó cada uno en solución de lactosa y glucosa según relación estequiométrica dada en la Tabla 5.1.2 de la Fase I de metodología. Todo esto con el objetivo de poder ver la eficiencia del agente hidrolizante al momento de llevar el disacárido lactosa a monosacáridos de glucosa y galactosa y, del agente oxidante al ser selectivo y no verse interferido por datos erróneos de compuestos diferentes a la lactosa o una vez hidrolizada más directamente a la glucosa.

Selección del agente oxidante que acompaña al electrodo de referencia

En primera instancia se evaluó los tres tipos de agentes oxidantes en solución de glucosa pura, tal como explicaba en la metodología; dando como conclusión que parcialmente se seleccionó como agente oxidante el permanganato de potasio con un coeficiente de correlación de 0.9757 obtenido de la regresión lineal de los datos. Pero para corroborar su comportamiento como el de los demás agentes se procedió a realizar en segunda instancia el mismo procedimiento en solución de lactosa, para así lograr analizar la eficacia de estos agentes en esta solución.

Por lo que, cada agente oxidante fue preparado en una solución de 20 mL de agua de la llave con la cantidad definida por la tabla estequiométrica, la cual difiere según la cantidad de lactosa a evaluar; luego se agregó 1 mL de esta solución al tubo de vidrio del electrodo de referencia, posteriormente, el electrodo de referencia se acondicionó al electrodo combinado y se llevó a la solución de lactosa, registrando inmediatamente un valor en términos de mV mediante el multímetro, el cual fue registrado en tablas y gráficas de Excel.

El primer agente oxidante sometido a evaluación fue el permanganato de potasio, el cual arrojó los siguientes resultados:

Tabla 6-1.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	190
100 (0.0146)	270
150 (0.0219)	280
200 (0.0292)	302

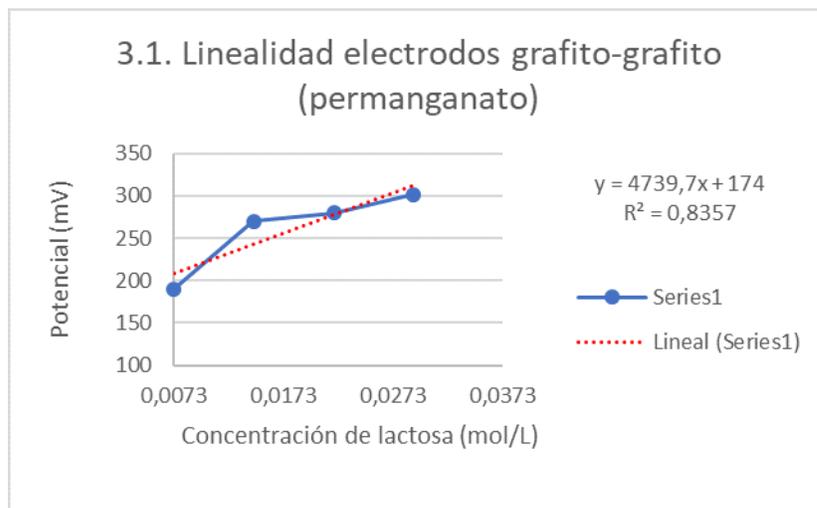


Figura 6-1.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Al igual que en la gráfica de evaluación de permanganato de potasio en solución de glucosa (Ver Anexo C), en esta también se presentó un rango de variación de voltaje de 200 mV a 300 mV aproximadamente, aunque la variación entre 0.0146 mol/L y 0.0219 mol/L (100 mg y 150 mg) respectivamente fue mínima (10 mV), lo que genera casi un equilibrio en cuanto al voltaje. Siendo así, el coeficiente de correlación fue de 0.8357, error de variación que posiblemente se debió a una falencia de medición e interpretación de cifras significativas en la balanza, es decir, posiblemente los valores pesados para las concentraciones de lactosa tuvieron cifras significativas muy cercanas.

El segundo cofactor evaluado en solución de lactosa fue el Sulfato de Cobre II, como se observa en la siguiente tabla y gráfica:

Tabla 6-2.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CuSO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	400
100 (0.0146)	620
150 (0.0219)	530
200 (0.0292)	480

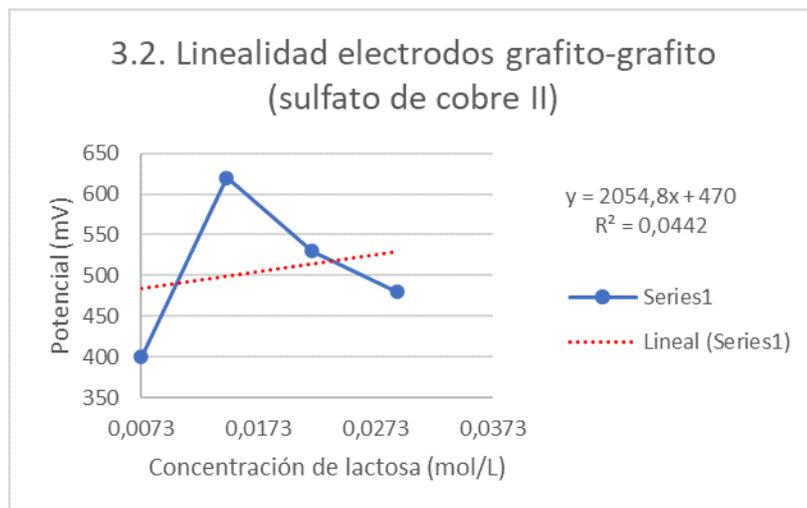


Figura 6-2.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CuSO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Una vez visualizada la Figura 6-2, es evidente descartar por completo el agente oxidante Sulfato de Cobre II de los cofactores pre-seleccionados para ser parte del electrodo combinado en la oxidación del monosacárido glucosa y cuantificación de lactosa, ya que únicamente cuenta con un dato poco variable de la línea de tendencia teórica y por el contrario el resto de sus datos están dispersos alrededor de la línea de tendencia, además, su coeficiente de correlación fue de 0.0447.

El tercer y último agente oxidante evaluado para la solución de lactosa fue el cloruro de calcio, teniendo la opción de que se pudiera obtener un coeficiente de correlación cercano a 1 para que este se evaluara junto con el permanganato de potasio y poder determinar el agente oxidante.

Tabla 6-3.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CaCl_2$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	150
100 (0.0146)	162
150 (0.0219)	172
200 (0.0292)	168

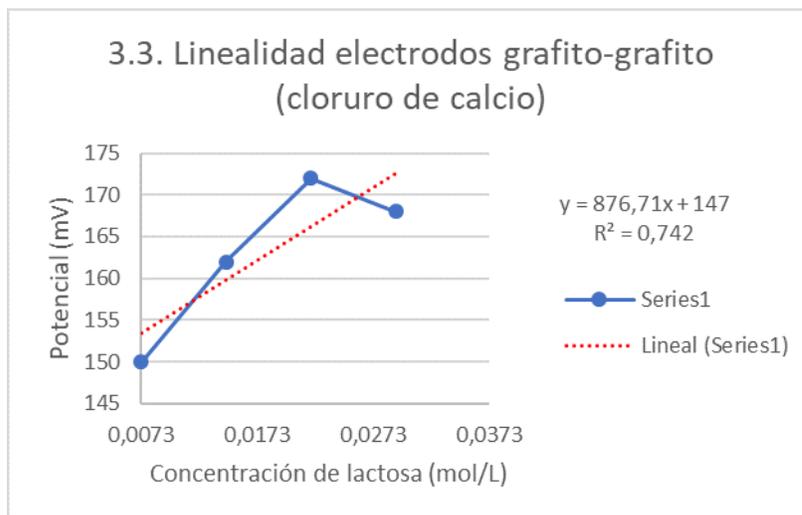


Figura 6-3.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $CaCl_2$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Como indica la Tabla **6-3** y la Figura **6-3**, los datos en potencial (mV) para cada concentración de lactosa se encontraron al igual que la gráfica para el sulfato de cobre (II) (Figura **6-2**), dispersos alrededor de la línea de tendencia teórica. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados dados para la solución de glucosa (Ver Anexo C) y los datos para solución de lactosa, también se optó por descartar este agente oxidante, ya que si se compara su coeficiente de correlación que es de 0.742 con relación al del permanganato de potasio de 0.8357 para lactosa y 0.9757 para glucosa, claramente se observaba que el agente oxidante que mejor se ajustaba a la línea de tendencia de los datos para las dos soluciones es el permanganato de potasio, el cual acompañaría al electrodo de referencia para el desarrollo del prototipo de laboratorio de biosensor.

Es así, como se llegó a seleccionar el permanganato de potasio como agente oxidante, faltando analizar su eficacia con respecto al agente hidrolizante ácido clorhídrico en solución de glucosa y lactosa.

Evaluación del agente hidrolizante ácido clorhídrico con el agente oxidante permanganato de potasio

Una vez se seleccionó el permanganato de potasio como agente oxidante, faltaba analizar la eficacia del mismo y del agente hidrolizante en solución de glucosa y lactosa. Por lo que, se evaluó el agente hidrolizante ácido clorhídrico y oxidante permanganato de potasio en soluciones de glucosa

y lactosa, tal como indica la metodología selectiva establecida; pero para tener mayor precisión al momento de asegurar estos resultados, se amplió el rango de muestras de lactosa y de glucosa, es decir, la medición de potencial fue de 50 *mg* a 500 *mg* con una variación cada 50 *mg* del componente biológico.

Por lo tanto, en primer lugar se evaluaron los agentes químicos en solución de glucosa pura, para el nuevo rango de muestras de la solución según el aumento de sus cantidades y relación estequiométrica; este procedimiento se siguió como se indica en la primera fase de la metodología. Luego, se registraron las mediciones arrojadas en una tabla y representadas en una gráfica (Ver Anexo C), en donde se visualizó que el coeficiente de correlación fue de 0.8854 y los datos variables con respecto a la línea de tendencia fueron 0.0438 *mol/L* (300 *mg*) y 0.0511 *mol/L* (350 *mg*) con una variación aproximada de 10 *mV*; de lo cual se pudo decir que para 10 registros el potencial estuvo entre 215 *mV* y 340 *mV*, variación mínima en términos de unidades numéricas.

En segundo lugar, al igual que para el caso de la solución de glucosa, se preparó la solución de lactosa. Este proceso se realizó para cada cantidad de lactosa que se encuentra dentro del rango de muestras a estudiar (rango límite de medición del biosensor). Los resultados obtenidos fueron la Tabla 6-4 y Figura 6-4.

Como se observa en la Tabla 6-4 el rango para los valores de potencial (*mV*) fue de 260 *mV* a 595 *mV*, datos más variables en cuanto a unidades numéricas pero directamente proporcionales con la escala de variación de las concentraciones de lactosa, lo que se pudo comprobar con el análisis proporcionado por la gráfica ubicada en la Figura 6-4, la cual indica que entre más muestras de concentración de lactosa, mayor es el voltaje suministrado por el electrodo combinado y mostrado en el multímetro, el coeficiente de correlación fue de 0.9435 y la diferencia en cuanto a la línea de tendencia como referencia fue de 5 *mV*. Siendo esta la mejor gráfica obtenida hasta el momento para la evaluación de la metodología establecida.

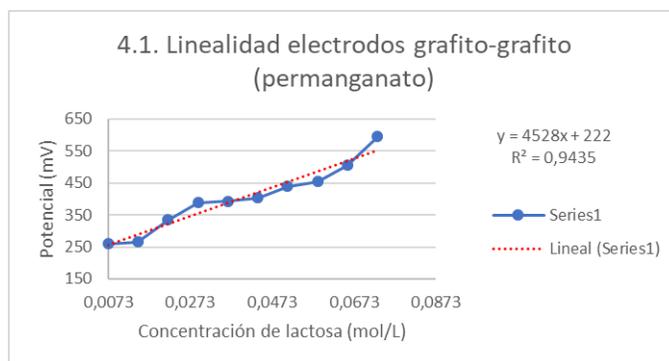


Figura 6-4.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Tabla 6-4.: Selección del cofactor para conformar el electrodo de referencia. Evaluación con $KMnO_4$ en lactosa pura. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	260
100 (0.0146)	266
150 (0.0219)	334
200 (0.0292)	388
250 (0.0365)	393
300 (0.0438)	403
350 (0.0511)	440
400 (0.0584)	454
450 (0.0657)	505
500 (0.0730)	595

Por lo tanto, se concluyó que para llevar a cabo la metodología selectiva, el agente oxidante a utilizar es el permanganato de potasio y el agente hidrolizante es el ácido clorhídrico, quedando pendiente la selección del par de electrodos, como también los lineamientos de control de calidad analíticos.

6.1.2. Lineamientos de control de calidad analíticos para corroborar la metodología selectiva en lactosuero residual

Una vez definido todos los componentes que acompañan la etapa de reconocimiento del biosensor, se procedió con el análisis estadístico de los potenciales arrojados al medir lactosa en lactosuero residual de queso campesino y doble crema por triplicado y réplicas de las muestras. Los datos que resultan del estudio analítico fueron registrados en tablas y curvas de calibración en Excel para que posteriormente fueran evaluadas por el método estadístico ANOVA, permitiendo validar la metodología selectiva y sus componentes directamente en lactosuero real de la industria láctea, en donde se definió si en su totalidad lo avanzado en los objetivos uno y dos del trabajo de grado fueron cumplidos correctamente en cuanto a los requerimientos técnicos, de calidad y funcionalidad.

La ejecución de los lineamientos de control de calidad analíticos conllevó a un tiempo de práctica en el laboratorio de la Universidad El Bosque de 3 días consecutivos, de acuerdo al triplicado y réplica que se requería para cada tipo de lactosuero, además, que el almacenamiento del lactosuero residual requiere que sea a temperaturas de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente y su uso sea menor a tres días, porque su proceso de fermentación se acelera con el transcurso de los días, dando datos erróneos en las

mediciones tomadas por el montaje inicial del prototipo de laboratorio de biosensor y requiriendo empezar desde cero con los lineamientos de calidad. Por lo anterior, para llegar a la conclusión de esta subfase se tuvo que realizar diversas mediciones y disponer de tiempo de acuerdo al día de producción del lactosuero por la industria láctea y de disposición del laboratorio para prácticas libres.

Sin embargo, se logró llevar a culminación esta subfase del primer objetivo, se utilizó el montaje que se ve en la Figura 6-5 y el procedimiento dado por la metodología respectivamente.



(a) Voltaje inicial 0 *mV*. Fuente: Autor.



(b) Voltaje final 274 *mV*. Fuente: Autor.

Figura 6-5.: Montaje para evaluar la metodología selectiva por lineamientos de control de calidad analíticos.

Se procedió a realizar los lineamientos de calidad para cada respectivo tipo de lactosuero residual, donde en primera instancia se realizó las mediciones de potencial en triplicados y réplicas y en segunda instancia el análisis de los datos por medio del método estadístico ANOVA.

Lineamientos de control de calidad analíticos para lactosuero residual de queso campesino

Para las mediciones analíticas de las muestras para el lactosuero residual de queso campesino, se tomaban tres mediciones en términos de potencial para la misma cantidad del agente hidrolizante y oxidante según tabla estequiométrica (Ver Tabla 5.1.2 en metodología), este proceso se realizó para cada cantidad de lactosa por tres días, dando como resultados tres potenciales y tres curvas para una posible concentración de lactosa en la misma muestra total de lactosuero.

Para el primer triplicado se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 6-5.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Réplica 1 (mV)	Réplica 2 (mV)	Réplica 3 (mV)
50 (0.0073)	152	157	155
100 (0.0146)	164	162	162
150 (0.0219)	223	197	223
200 (0.0292)	217	214	239
250 (0.0365)	267	264	265
300 (0.0438)	277	287	286
350 (0.0511)	272	266	275
400 (0.0584)	302	294	302
450 (0.0657)	275	277	278
500 (0.0730)	309	281	303

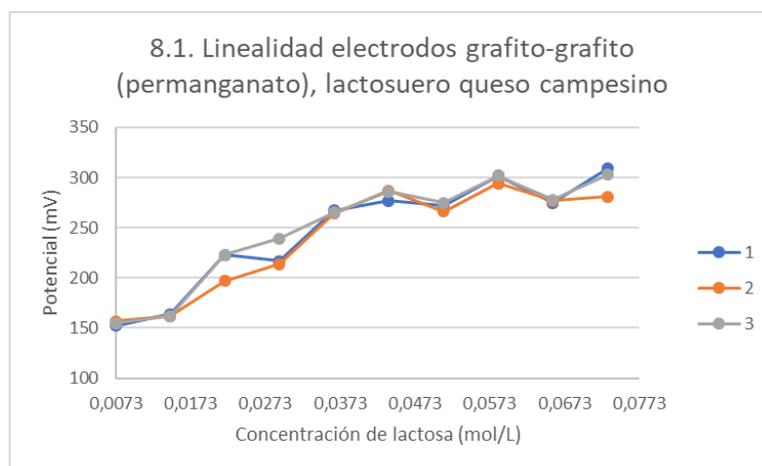


Figura 6-6.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Fuente: Autor.

Como se puede observar en la gráfica de la Figura 6-6 el rango de potencial osciló entre 152 mV y 309 mV , en cuyas réplicas sus puntos más alejados de la tendencia fueron para réplica 1 y 3 en 0.0219 mol/L de concentración lactosa para ambas de 223 mV , 26 mV fuera de la línea de tendencia. De igual manera para las tres réplicas valores por encima de la línea de tendencia para concentraciones de 0.0438 mol/L y 0.0584 mol/L .

Sin embargo, a continuación se puede ver de manera más detallada cada uno de los resultados arrojados según las réplicas tomadas para el primer triplicado de lactosuero residual de la industria láctea.

En las Figuras 6-7, 6-8 y 6-9, se indica en color azul la línea directamente proporcional a sus ejes Potencial (mV) en función de Concentración de lactosa (mol/L) y en color rojo, la línea de tendencia ideal para dichas mediciones registradas por la etapa de reconocimiento y los electrodos (grafito-grafito). La línea de tendencia va acompañada de la ecuación de regresión lineal y del coeficiente de variación R^2 , la cual dice qué tan cerca están los valores registrados por la parte práctica con la teórica, siendo 1 el valor ideal para la linealización ideal del biosensor de acuerdo a la metodología selectiva establecida y a los componentes que la conforman, así como, buena práctica de la tabla estequiométrica.

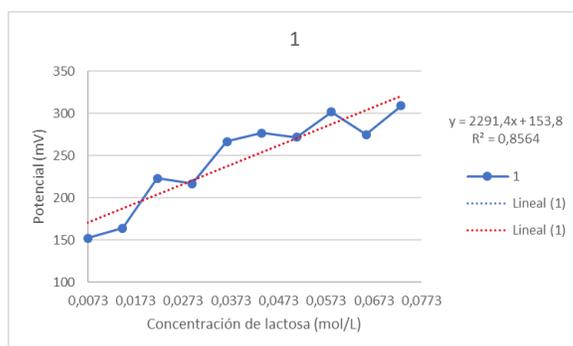


Figura 6-7.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Réplica 1. Fuente: Autor.

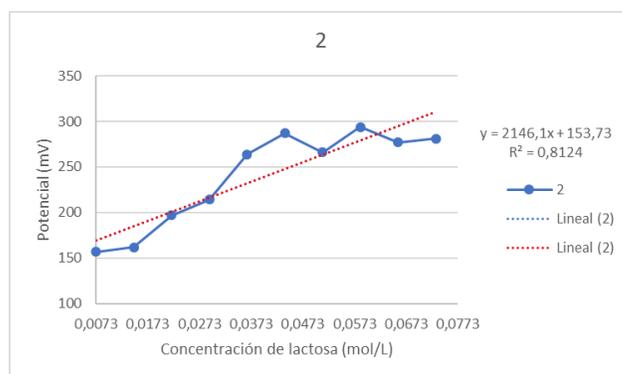


Figura 6-8.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Réplica 2. Fuente: Autor.

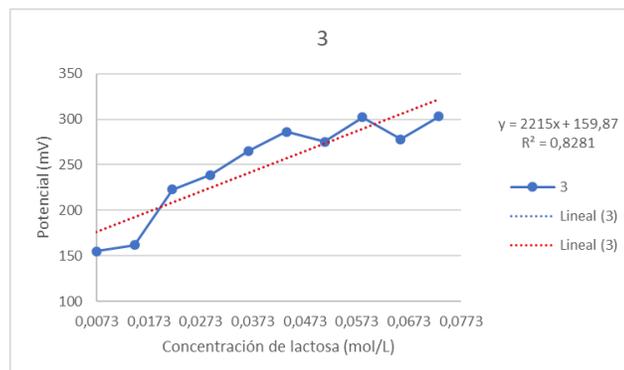


Figura 6-9.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 1. Réplica 3. Fuente: Autor.

Por lo tanto, los coeficientes de correlación para las réplicas de 1 a 3 son: 0.8564, 0.8124 y 0.8281, valores alejados de 1 según lo deseado para el desarrollo del prototipo de laboratorio de biosensor. Pero analizando la causa de los datos, se puede inferir que dicho error se debe a tiempo de almacenamiento del lactosuero residual, puesto que se dejó alrededor de 3 días, provocando aumento de ácido láctico por el proceso de fermentación y por ende, variación entre sus datos. La réplica más acertada es la número 1 (Figura 6-7, porque sus únicos valores por debajo de la línea de tendencia son 162 mV (0.0146 mol/L) y 278 mV (0.0657 mol/L) y su R^2 es el más cercano a 1 con respecto a las demás gráficas para este triplicado.

Los resultados para el segundo triplicado se ven en la Figura 6-10 y Tabla 6-6:

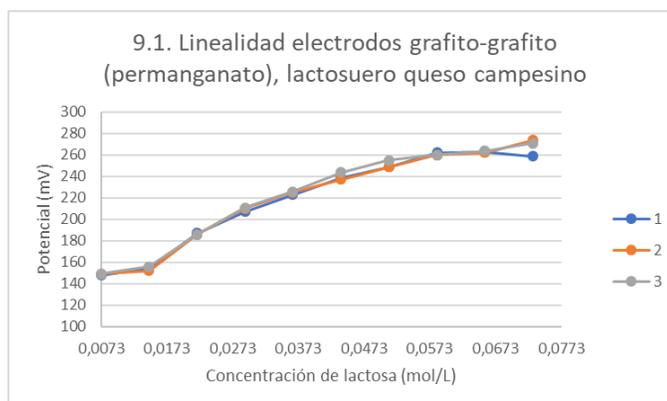


Figura 6-10.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Fuente: Autor.

Tabla 6-6.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (<i>mg</i>)(<i>mol/L</i>)	Réplica 1 (<i>mV</i>)	Réplica 2 (<i>mV</i>)	Réplica 3 (<i>mV</i>)
50 (0.0073)	148	149	149
100 (0.0146)	154	152	156
150 (0.0219)	187	186	186
200 (0.0292)	207	210	211
250 (0.0365)	223	225	226
300 (0.0438)	239	237	244
350 (0.0511)	249	249	255
400 (0.0584)	262	260	260
450 (0.0657)	263	262	264
500 (0.0730)	259	274	271

En la Tabla **6-6** se encuentran registrados los potenciales (*mV*) para cada respectiva réplica según el orden de las supuestas concentraciones de lactosa (*mol/L*) a evaluar. Y en la Figura **6-10** se encuentra la gráfica que relaciona las tres réplicas generadas para el triplicado dos. De estos resultados se puede analizar que sus datos son directamente proporcionales y no presentan datos alejados entre ellos, el único dato distante de los demás es el de concentración de lactosa 0.073 mol/L para la réplica 1 con 259 mV y aproximadamente 15 mV de variación con respecto a las otras dos réplicas.

La similitud de los resultados entre réplicas se puede deber por dos posibles causantes: el primero porque el lactosuero residual estaba recién preparado y dentro de los días óptimos de almacenamiento y manipulación, además, que la manipulación de las debidas concentraciones de los agentes como de los instrumentos se hizo de manera correcta y dentro del tiempo de espera adecuado para que la reacción química se estabilizara dando un dato estable y confiable. Y el segundo causante, porque el par de electrodos grafito-grafito presentaron sellamiento de sus poros, de acuerdo a la resistencia del material después de un lapso de tiempo a la interacción con los ácidos orgánicos e inorgánicos (1 año aproximadamente) (Unichimtek, 2020).

En las Figuras **6-11**, **6-12** y **6-13** se ven expresados los potenciales para cada réplica según la concentración de lactosa, con su respectiva ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación.

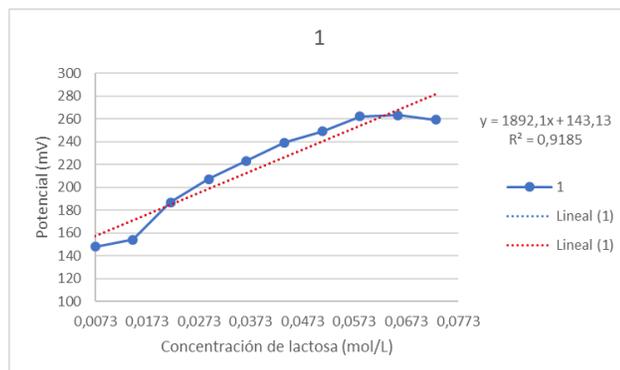


Figura 6-11.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Réplica 1. Fuente: Autor.

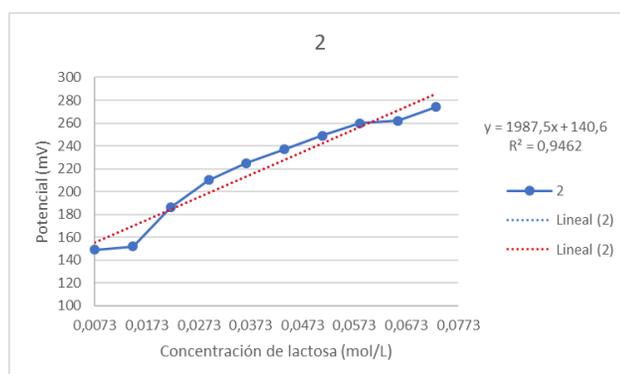


Figura 6-12.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Réplica 2. Fuente: Autor.

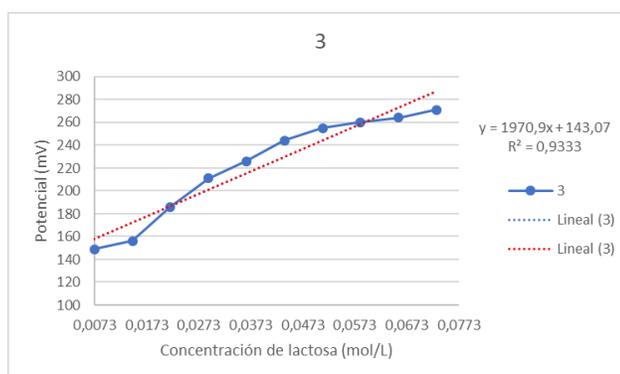


Figura 6-13.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 2. Réplica 3. Fuente: Autor.

La gráfica con mejor coeficiente de correlación fue la segunda (0.9462) y la que tuvo menor coeficiente de correlación fue la primera (0.9185), lo que indica que el coeficiente de correlación entre ellas es de 0.0277 un valor cercano a 0.0, dando a conocer que el prototipo de biosensor se estabiliza al momento de validar su funcionamiento dentro del rango de detección de lactosa y con la estequiometría correspondiente.

Por otro lado, los únicos cuatro datos que se encuentran por debajo de la línea de tendencia son los mismos para las tres réplicas, es decir, que los potenciales para las concentraciones de lactosa a : 0.0073 mol/L , 0.0146 mol/L , 0.0657 mol/L y 0.073 mol/L se encontraron por fuera de la línea de tendencia deseada, posiblemente debido a que el rango de detección de lactosa para la muestra de lactosuero residual de queso campesino es más estrecho, lo que indica que la concentración de lactosa se encuentra tal vez entre 0.0219 mol/L (150 mg) y 0.0584 mol/L (350 mg). Lo anterior se puede corroborar con la gráfica del tercer triplicado (Figura 6-13) y concluyendo que el rango de detección seleccionado para la caracterización del prototipo de laboratorio es el correcto, ya que los rangos reales de lactosa presente en el lactosuero generado por la producción de queso campesino se encuentran dentro de estos y no por fuera, lo que hubiera ocasionado un error de medición y de falencia en los requerimientos del equipo desarrollado.

Finalmente, para la ejecución del tercer triplicado, previamente se lijaron con una lija para madera los electrodos de referencia e indicador (grafito-grafito), retirando la primera capa de la mina de grafito y permitiendo que los poros nuevamente estuvieran abiertos y generaran la interacción con la diferencia de potencial provocada por las reacciones de hidrólisis y oxidación de los agentes químicos con la muestra de lactosuero. Lo anterior se hizo para corroborar cuál fue el causante de la correcta linealización de las tres réplicas anteriores. Luego, los electrodos son acondicionados a la metodología selectiva establecida en el presente objetivo y sus resultados son el tercer triplicado:

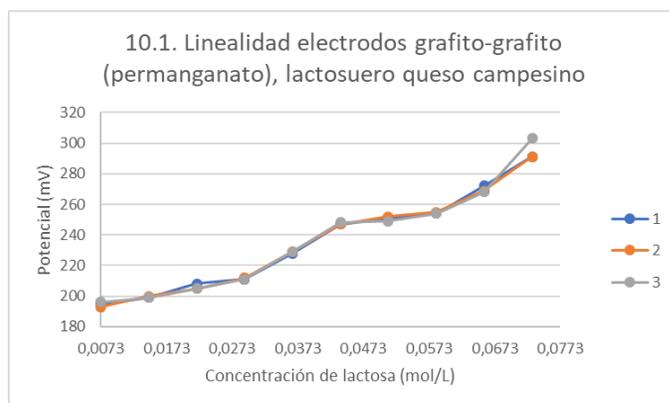


Figura 6-14.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Fuente: Autor.

Tabla 6-7.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Réplica 1 (mV)	Réplica 2 (mV)	Réplica 3 (mV)
50 (0.0073)	195	193	196
100 (0.0146)	199	200	199
150 (0.0219)	208	205	205
200 (0.0292)	211	212	211
250 (0.0365)	228	229	229
300 (0.0438)	247	247	248
350 (0.0511)	251	252	249
400 (0.0584)	254	255	254
450 (0.0657)	272	269	268
500 (0.0730)	291	291	303

En la Figura 6-14 se pueden analizar de manera visual los resultados dados por el tercer triplicado, los cuales se encuentran ubicados en la Tabla 6-7. De allí se logró concluir que al igual que en el segundo triplicado la variación de potenciales entre réplicas es mínima, teniendo únicamente por fuera de la línea de tendencia con respecto a las demás réplicas un potencial de 303 *mV* para 0.073 *mol/L* de concentración de lactosa en la tercera réplica. Por otro lado, esta gráfica concluye que el causante de la correcta linealización de los potenciales en función de concentración de lactosa medidos por el prototipo de biosensor fue el primero, porque el lactosuero residual estaba recién preparado, almacenado a 4 °C por menos de dos días y el protocolo de manipulación de la muestra como del desarrollo de la metodología fue el adecuado, permitiendo que la reacción química se estabilizara dentro de un tiempo de 5 *min*. Lo que también valida la eficacia de la metodología llevada a cabo para la selección y caracterización de los agentes químicos y electrodos, como el establecimiento de una metodología selectiva, viable y confiable para el desarrollo del biosensor que cuantifica la presencia de lactosa en lactosuero residual.

La gráfica para cada réplica (azul) se encuentra a continuación con su respectiva línea de tendencia en rojo, ecuación de regresión lineal y R^2 , con el fin de poderlas analizar por separado:

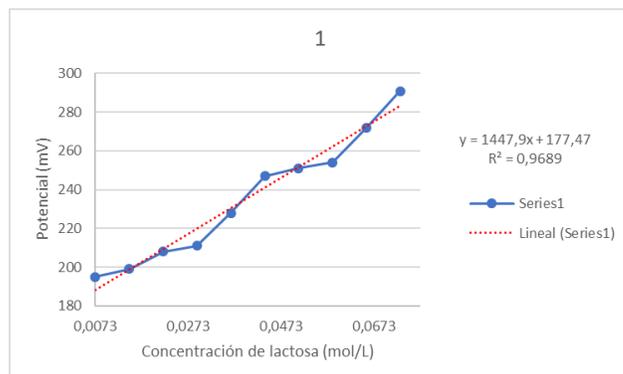


Figura 6-15.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Réplica 1. Fuente: Autor.

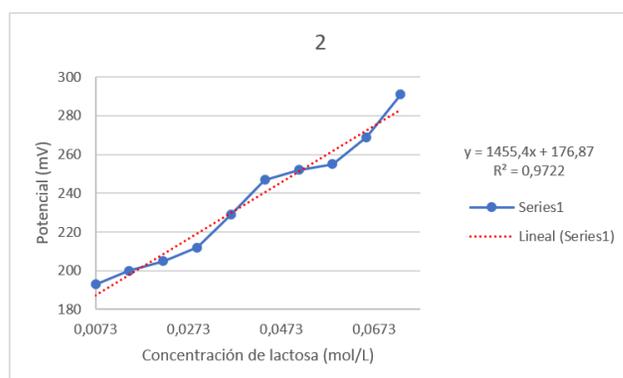


Figura 6-16.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Réplica 2. Fuente: Autor.

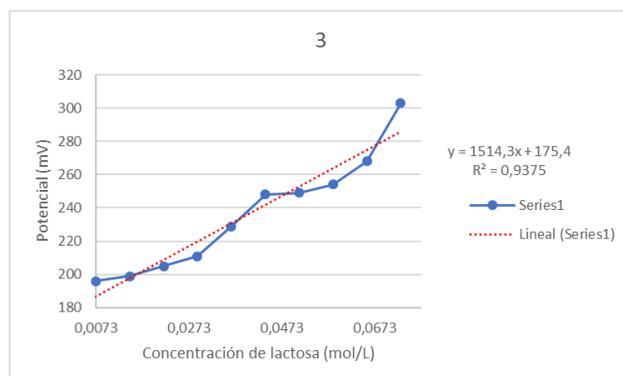


Figura 6-17.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso campesino. Triplicado 3. Réplica 3. Fuente: Autor.

La Figura **6-15** muestra la gráfica para la primera réplica con un coeficiente de correlación de 0.9689 y dos potenciales por debajo de la línea de tendencia 211 *mV* y 254 *mV* respectivamente. La segunda réplica se observa en la Figura **6-16** con variaciones en los potenciales de 212 *mV* y 255 *mV* de 0.9722. Y por último, en la tercera réplica el coeficiente de correlación es de 0.9375 para 211 *mV* y 254 *mV*. Datos variantes para las mismas concentraciones de lactosa (0.0292 *mol/L* y 0.0584 *mol/L*) en las tres réplicas.

Llegando así a concluir que el rango de detección de la concentración de lactosa presente en el lactosuero residual del queso campesino producido por la industria láctea se encuentra entre 100 *mg* y 450 *mg* de lactosa, es decir, entre 0.0146 *mol/L* y 0.0657 *mol/L*; este límite dado por el tercer triplicado es el similar al dado por el segundo triplicado, lo que valida una vez más la exactitud y precisión del biosensor que se encontraba en construcción.

Posterior a los lineamientos de control de calidad analíticos, se procedió a realizar el método estadístico ANOVA en Excel, el cual parte de los mismos datos tomados en cada triplicado para la muestra de lactosuero residual generado por la producción de queso campesino. Por lo tanto, el método ANOVA arroja una tabla con información estadística de las variaciones entre cada réplica, cuyo análisis se conoce como el análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, la tabla tiene columnas con los siguientes nombres: origen de las variaciones (sus filas son: interacción, dentro del grupo, total), suma de cuadrados, grados libertad, promedio de los cuadrados, valor F y valor P y valor crítico para F:

Tabla 6-8.: ANOVA para la interacción entre los triplicados. Análisis de varianza de la interacción por réplicas, lactosuero residual de queso campesino. Fuente: Autor.

Origen variaciones	Suma cuadrados	Grados libertad	Promedios cuadrados	F	P	Valor crítico F
Interacción	236.6667	4	59.1667	0.0296	0.9983	2.4844
Dentro de triplicados	161559.1	81	1994.5568			
Total	171034.9	89				

Analizando la Tabla **6-8**, se puede observar la interacción entre triplicados donde la variable importante a estudiar allí es el valor F, valor P y valor crítico para F, respectivamente los valores obtenidos son: 0.0296, 0.9982 y 2.4844; donde el valor F es menor al valor crítico para F y el valor P es mayor a 0.05, concluyendo que la hipótesis nula es aprobada, porque los promedios entre los triplicados no tienen variación significativa, es decir, la media entre estos es igual, asegurando el

95 % de confiabilidad y generando poca incertidumbre entre las mediciones por parte del prototipo de laboratorio de biosensor en muestras de lactosuero residual de queso campesino (Engineering Zone, 2018).

Lineamientos de control de calidad analíticos para lactosuero residual de queso doble crema

Luego de los lineamientos de control de calidad analíticos para lactosuero residual de queso campesino, se realizaron los lineamientos para lactosuero residual de queso doble crema. Para lo cual, se evaluó un triplicado por día con tres réplicas para cada cantidad estequiométrica de los agentes químicos. El primer triplicado dio como resultado la Tabla 6-9 y la gráfica de la Figura 6-18.

La diferencia entre cada potencial de acuerdo a cada réplica oscila entre 2 *mV* y 10 *mV* y en la Figura 6-18 se evidencia que la igualdad entre las réplicas es poca, ya que son únicamente seis mediciones de diez las que comparten los mismos valores en términos de voltaje; sin embargo, el comportamiento linealmente creciente es similar para todas las réplicas, exceptuando los voltajes resultantes para la concentración de 0.0219 *mol/L*.

Tabla 6-9.: Evaluación de la metodología selectiva, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (<i>mg</i>)(<i>mol/L</i>)	Réplica 1 (<i>mV</i>)	Réplica 2 (<i>mV</i>)	Réplica 3 (<i>mV</i>)
50 (0.0073)	275	277	276
100 (0.0146)	282	286	283
150 (0.0219)	284	278	276
200 (0.0292)	292	290	292
250 (0.0365)	295	297	298
300 (0.0438)	297	296	303
350 (0.0511)	315	310	313
400 (0.0584)	320	320	333
450 (0.0657)	338	334	336
500 (0.0730)	339	347	346

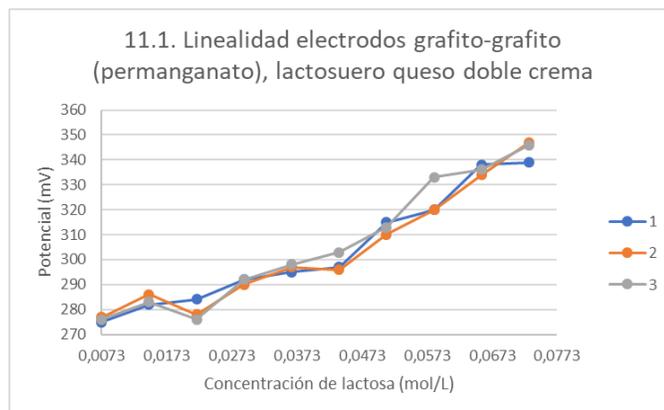


Figura 6-18.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero doble crema. Triplicado 1. Fuente: Autor.

Cada una de las réplicas fueron graficadas en las siguientes figuras con sus respectivos datos estadísticos en la parte superior derecha y su línea de tendencia en color rojo:

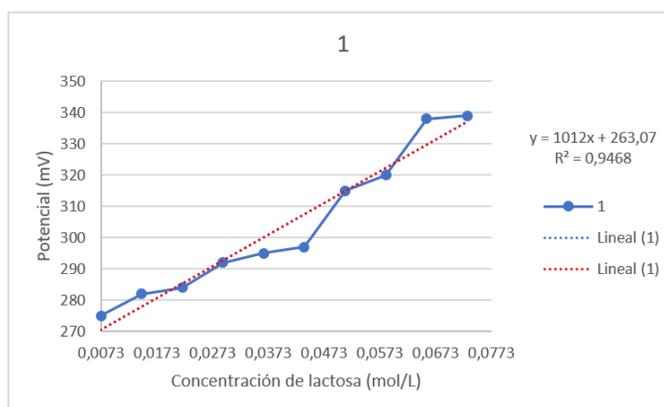


Figura 6-19.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Réplica 1. Fuente: Autor.

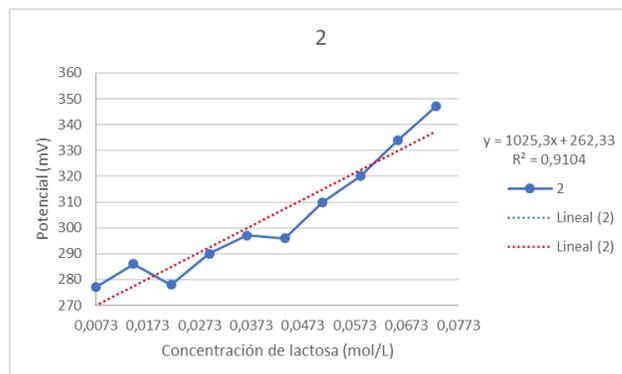


Figura 6-20.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Réplica 2. Fuente: Autor.

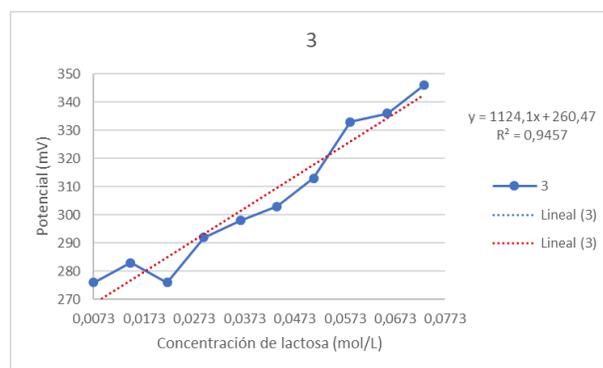


Figura 6-21.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 1. Réplica 3. Fuente: Autor.

Para las réplicas desde la primera hasta la tercera, los resultados de sus coeficientes de correlación fueron los siguientes: 0.9468, 0.9104 y 0.9457. La réplica con un coeficiente de correlación más alejado de 1 es la segunda (Figura 6-20), a pesar de que sus datos se encuentran más estables y sin picos, pero están por debajo de la línea de tendencia. Mientras, que la primera y tercera réplica tienen un coeficiente de correlación similar y cercano a 1, con unos picos de variación en la concentración de 0.0438 mol/L para la primera réplica y 0.0219 mol/L para tercera o última réplica, con un potencial de lejanía con respecto a la línea de tendencia de 10 mV.

Por otra parte, se llegó a concluir que los datos para el primer triplicado tanto en queso campesino como doble crema indican que para obtener unas mediciones adecuadas de la concentración de lac-

tosa, no influye únicamente en la caracterización y trabajo arduo del prototipo de laboratorio, sino de un riguroso protocolo para la toma de muestra, almacenamiento y manipulación del lactosuero residual sin importar su tipo de origen.

Continuo a ello, al siguiente día se realizó el segundo triplicado, pero al igual que con la muestra de lactosuero residual de queso campesino, el primer triplicado fue con una muestra reposada y los otros dos con lactosuero recién preparado. Por ende, los datos para los siguientes triplicados serán más confiables y exactos:

Tabla 6-10.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Réplica 1 (mV)	Réplica 2 (mV)	Réplica 3 (mV)
50 (0.0073)	266	265	264
100 (0.0146)	278	276	279
150 (0.0219)	283	283	282
200 (0.0292)	294	295	294
250 (0.0365)	298	299	300
300 (0.0438)	306	307	305
350 (0.0511)	317	318	317
400 (0.0584)	325	326	324
450 (0.0657)	337	336	336
500 (0.0730)	343	342	341

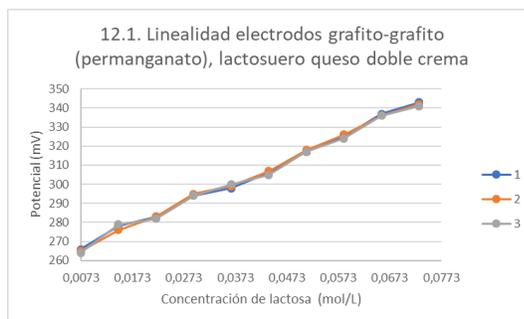


Figura 6-22.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Fuente: Autor.

Con los datos presentes en la Tabla **6-10** y la Figura **6-22** se valida la hipótesis planteada en el párrafo anterior, donde se observa una linealización entre réplicas y potenciales para la misma concentración de lactosa. En este caso no se observan valores por fuera del rango dado por los mismos datos, lo que asegura que se realizó una buena práctica y manipulación en laboratorio de los insumos, construcción del prototipo de biosensor y conservación del lactosuero residual.

Las tres gráficas a continuación describen las réplicas o curvas en sentido directamente proporcional de los valores arrojados por la lectura de la etapa de reconocimiento mediante el multímetro en términos de potencial (mV) y en función de la concentración de lactosa (mol/L).

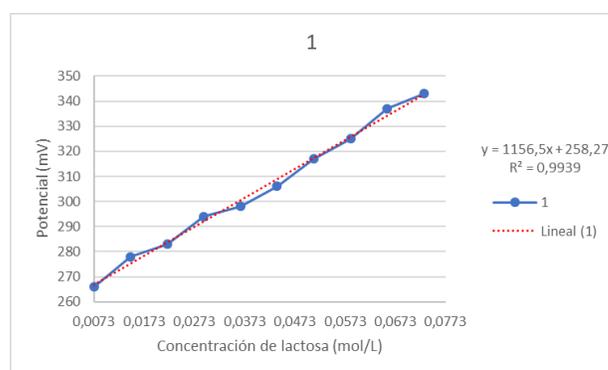


Figura 6-23.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Réplica 1. Fuente: Autor.

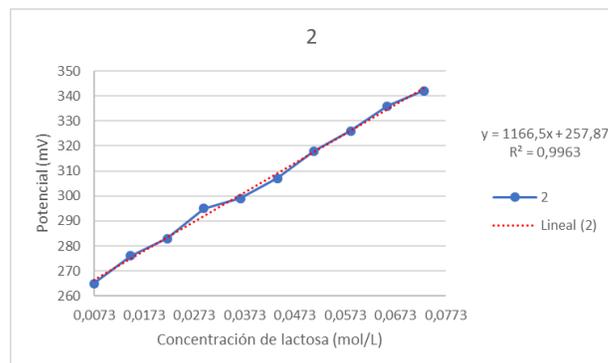


Figura 6-24.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Réplica 2. Fuente: Autor.

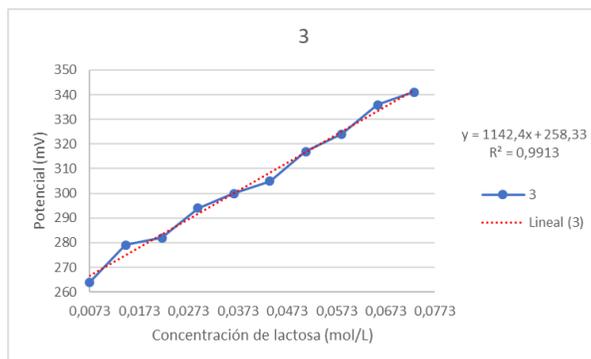


Figura 6-25.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 2. Réplica 3. Fuente: Autor.

De acuerdo al orden decreciente de los coeficientes de correlación las réplicas son: segunda, primera y tercera, con valores adimensionales: 0.9963, 0.9939 y 0.9913. En donde el único valor fuera de la línea de tendencia son para la réplica dos 295 mV (0.0292 mol/L), para la réplica uno 278 mV (0.0146 mol/L) y 306 mV (0.0438 mol/L) y, para la réplica tres 279 mV (0.0146 mol/L) y 305 mV (0.0438 mol/L). Cuyos picos o valores por fuera de la línea de tendencia difieren en un valor máximo de 3 mV , valor que si es comparado con las demás variaciones en potenciales de los demás triplicados tanto para queso campesino como doble crema es el que menos error de variación ha generado, puesto que a medida que se iban realizando las mediciones se aprendió de los errores prácticos y teóricos realizados, con la finalidad de que cada vez las mediciones fueran más exactas y asegurar el correcto desarrollo de un diseño ingenieril del prototipo.

Por último, se realizaron las réplicas para el último día de medición de triplicados para el lactosuero de queso doble crema, con la misma muestra que para el triplicado dos.

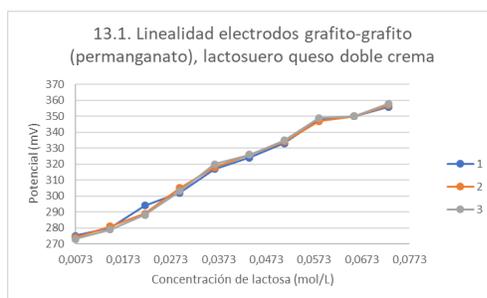


Figura 6-26.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Fuente: Autor.

Tabla 6-11.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (<i>mg</i>)(<i>mol/L</i>)	Réplica 1 (<i>mV</i>)	Réplica 2 (<i>mV</i>)	Réplica 3 (<i>mV</i>)
50 (0.0073)	275	274	273
100 (0.0146)	280	281	279
150 (0.0219)	294	289	288
200 (0.0292)	302	305	303
250 (0.0365)	317	318	320
300 (0.0438)	324	326	326
350 (0.0511)	333	334	335
400 (0.0584)	348	347	349
450 (0.0657)	350	350	350
500 (0.0730)	356	357	358

Los rangos de potencial (*mV*) para las tres réplicas varió entre 273 *mV* y 358 *mV* aproximadamente, con un aumento de 5 *mV* a 15 *mV* cada concentración de lactosa y en la Figura 6-26 se observa que el dato que más se alejó con respecto a las mismas mediciones de las réplicas fue el de 0.0219 *mol/L* o 294 *mV* para la primera réplica.

En las siguientes gráficas se observa el comportamiento linealmente dependiente del potencial (*mV*) con respecto a la concentración de lactosa (*mol/L*), comprobándose con sus coeficientes de correlación R^2 respectivamente (Figura 6-27 y Tabla 6-28).

Los coeficientes de correlación de acuerdo al orden de las gráficas son: 0.9866, 0.9854 y 0.9801, siendo la primera gráfica la más cercana a 1, es decir, la de menor variabilidad con respecto a la línea de tendencia. Con diferencia notoria de potencial en tres mediciones de concentración de lactosa: 0.0146 *mol/L*, 0.0365 *mol/L* y 0.0584 *mol/L*, respectivamente: 280 *mV*, 317 *mV* y 348 *mV*, son considerados datos por fuera del límite debido a que tienen diferencia máxima de potencial de 5 *mV*.

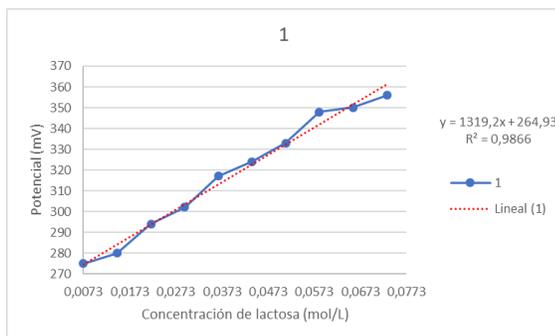


Figura 6-27.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Réplica 1. Fuente: Autor.

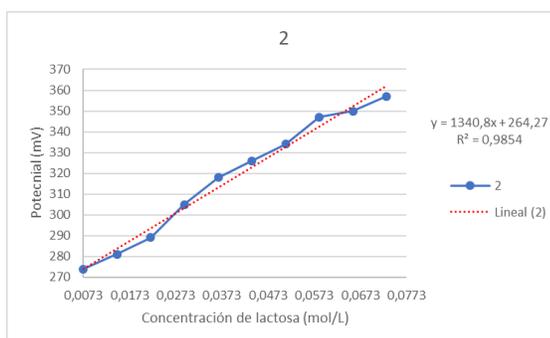


Figura 6-28.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Réplica 2. Fuente: Autor.

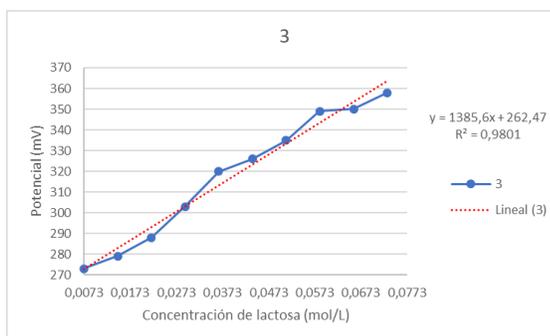


Figura 6-29.: Evaluación de la metodología selectiva, lineamientos de control de calidad analíticos, lactosuero queso doble crema. Triplicado 3. Réplica 3. Fuente: Autor.

Por ende, se concluye que de los tres días de mediciones de lactosuero residual generado por la producción de queso doble crema, el mejor triplicado fue el segundo. Lo que se puede analizar debido a varias razones, la primera es que el lactosuero fue tomado en una botella estéril, almacenado a 4 °C y ese mismo día analizado en laboratorio por los respectivos agentes químicos e instrumentos de laboratorio, teniendo en cuenta los implementos de seguridad personales, el procedimiento de uso de los mismos como de la metodología selectiva para detección de lactosa y el tiempo de respuesta de la reacción química, como de su recepción por los electrodos y lectura por el multímetro.

De igual manera, para el caso de la validación de los objetivos uno y dos con el lactosuero residual de queso doble crema, se requirió del método ANOVA.

Tabla 6-12.: ANOVA para la interacción entre los triplicados. Análisis de varianza de la interacción por réplicas. Lactosuero residual de queso doble crema. Fuente: Autor.

Origen variaciones	Suma cuadrados	Grados libertad	Promedios cuadrados	F	P	Valor crítico F
Interacción	23.1111	4	5.7778	0.0081	0.9998	2.4844
Dentro de triplicados	57803.5	81	713.6234			
Total	61550.7222	89				

Para el caso de la Tabla **6-12** la interacción entre triplicados tiene un valor F de 0.0081 y un valor crítico para P de 2.4844. Valores que indican que no se debe rechazar la hipótesis nula por el valor crítico es mayor al valor F. Resultado que da de igual manera si se evalúa con el valor P el cual es mayor a 0.05, por dar 0.9998 aprobando la hipótesis es la nula y mostrando que la medida de tendencia central (media) no va a variar a pesar de que se realice la medición para la misma muestra de lactosuero de queso doble crema las veces necesarias por el operario de producción, asegurando un porcentaje de confiabilidad del 95 % (Engineering Zone, 2018).

Comparando los resultados obtenidos en el método estadístico ANOVA para las mediciones obtenidas en lactosuero residual de queso campesino y queso doble crema, se interpreta un valor F para el primero de 0.0296 y para el segundo de 0.0081 con referente a un mismo valor crítico para F de 2.4844 tienen el mismo nivel de confiabilidad de 95 %, sin embargo, el valor F para las mediciones del lactosuero del queso doble crema es menor al del queso campesino, lo que permite entender que está más lejos de ser rechazada la proposición de que sus medias sean iguales, dando a entender que este tipo de lactosuero tiene valores de lactosa mas homogéneos y similares que los del queso campesino, aunque los dos tipos de queso cumplen a cabalidad con la metodología selectiva establecida en esta primera fase, determinando que los valores a medir de lactosa se encuentran dentro

del rango de detección del biosensor (Engineering Zone, 2018).

Conclusión Fase I

Luego de una detallada búsqueda bibliográfica, evaluación y selección de los agentes hidrolizante y oxidante, así como de su validación en lactosuero residual de la industria láctea, se llegó a la conclusión de establecer una metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual como se observa en los diagramas **6-30** y **6-31**, donde se da a conocer dos diagramas metodológicos, según el orden y tipo de reacción química a ejecutar sobre 20 mL de la muestra de lactosuero residual.

Por ende, en primer lugar en la Figura **6-30** se observa el diagrama metodológico para la reacción química de hidrólisis del disacárido lactosa en glucosa y galactosa mediante el agente hidrolizante ácido clorhídrico, lo que ocurre en este proceso a nivel químico es que el método de hidrólisis de lactosa provoca una reacción química de descomposición de dicho disacárido por medio de una molécula de agua en dos monosacáridos o compuestos más simples de analizar y degradar como lo son la glucosa y la galactosa, quedando el monosacárido glucosa como elemento de oxidación del siguiente protocolo, permitiendo completar la metodología selectiva que se planteó en el desarrollo del prototipo de laboratorio de biosensor (Sánchez, Rosales, & Bustamante, 2015).

Siendo así, en éste diagrama se explica el protocolo a seguir para dos casos de estudio: validación de la metodología y sus componentes químicos por lactosuero residual originado de un matriz simulada en laboratorio o validación de los mismos por lactosuero residual de la industria láctea (proceso que también sirve para realizar medición de lactosa en lactosuero residual directamente con el prototipo funcional del biosensor, una vez es terminado en su totalidad).

En segundo lugar, en la Figura **6-31** se indica el diagrama metodológico a seguir para la reacción química de oxidación del monosacárido glucosa a ácido glucónico mediante el agente oxidante permanganato de potasio. Este protocolo se realiza una vez es ejecutado el anterior protocolo para la reacción de hidrólisis de la muestra de lactosuero residual, ya que este es la continuación y es quién permite generar la diferencia de potencial de la solución para que sea captada por el par de electrodos caracterizados. La reacción química consiste en la oxidación del monosacárido glucosa en ácido glucónico, generando radicales libres que reaccionan entre sí e interactúan con la etapa de transducción del biosensor (electrodo combinado y etapa de instrumentación) en términos de voltaje (Rivas, Baltasar, & Moreno, 2016).

Los diagramas metodológicos realizados como resultado de la primera fase de la metodología del proyecto de grado, se pueden implementar para validaciones en laboratorio o en campo con el

equipo funcional, puesto que sus cantidades, volúmenes, instrumentos de manejo y procedimiento son los mismos durante todo el desarrollo y manipulación del prototipo de laboratorio.

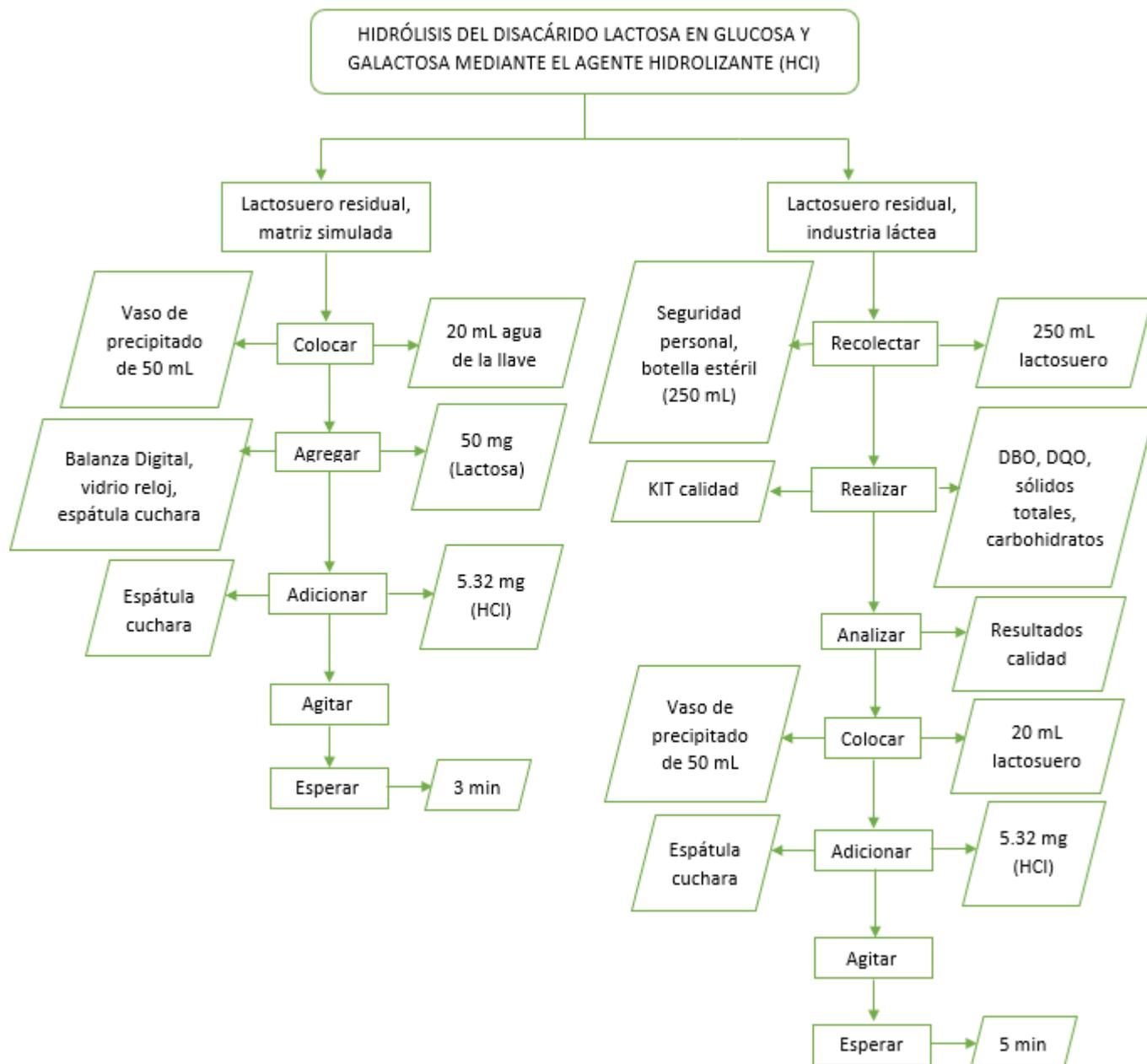


Figura 6-30.: Fase 1. Metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual: Hidrólisis del disacárido lactosa en glucosa y galactosa mediante el agente hidrolizante (*HCl*). Fuente: Autor.

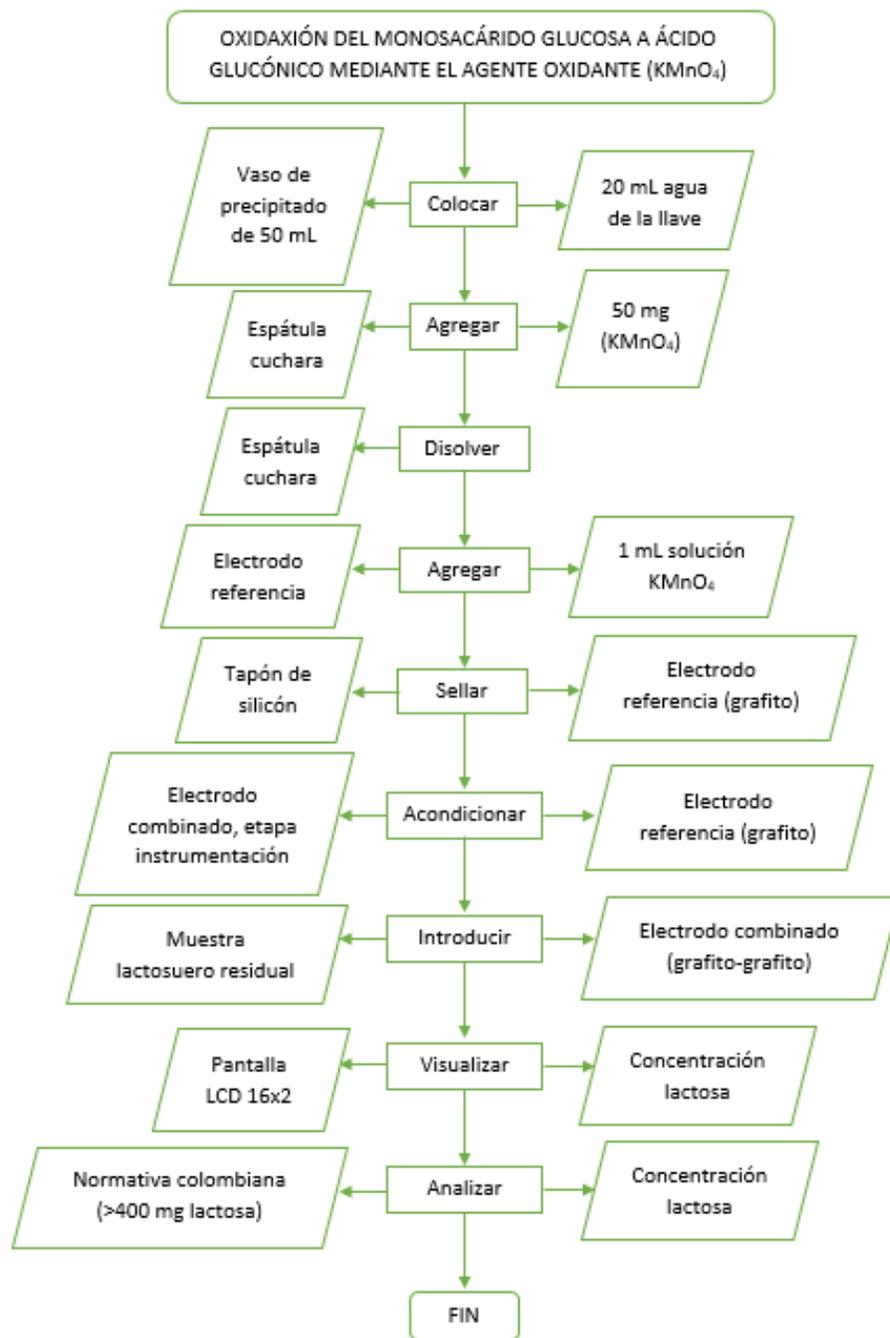


Figura 6-31.: Fase 2. Metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual: Oxidación del monosacárido glucosa a ácido glucónico mediante el agente oxidante ($KMnO_4$). Fuente: Autor.

6.2. Fase II. Caracterización del transductor

El segundo objetivo específico se cumplió por subfases o tareas, las cuales partieron de una búsqueda bibliográfica de algunos pares de electrodos que fueran viables y compatibles con la metodología selectiva para la detección de lactosa ya establecida en el primer objetivo específico del trabajo de grado, de los cuales se seleccionó un par de electrodos que generen una señal eléctrica directamente proporcional con la etapa de reconocimiento, mediante la evaluación y análisis estadístico de cada par de electrodos de acuerdo a los diagramas metodológicos establecidos, y por último, se llegó a caracterizar dicho par de electrodos por medio de unos lineamientos de control de calidad analíticos. De las subfases se concluyó la selección y caracterización de los electrodos, validando su funcionalidad mediante la aplicación de lineamientos de control de calidad analíticos en una matriz simulada de lactosuero y su análisis por medio del método ANOVA.

6.2.1. Selección de un par de electrodos

En primer lugar, se determinó el par de electrodos (electrodos indicador o cátodo y de referencia o ánodo) que permitieran mayor selectividad, linealidad y menor varianza al momento de registrar gráficamente los datos en términos de voltaje (mV) y función de la concentración de lactosa (mol/L). Para ello se evaluaron los cuatro pares de electrodos establecidos inicialmente por un trabajo bibliográfico de algunas bases de datos sobre biosensores electroquímicos, teniendo en cuenta que estos pares son: grafito-grafito, grafito-zinc, grafito-cobre y cobre-zinc.

Por ende, se evaluó el montaje inicial del electrodo combinado para el primer par de electrodos, los cuales son grafito-grafito. Cada medición arrojada en el multímetro para cada cantidad de lactosa era registrada en una tabla en Excel y posteriormente gráfada, para un análisis sencillo y certero (Tabla 6-13) (Figura 6-32).

Tabla 6-13.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	178
100 (0.0146)	222
150 (0.0219)	234
200 (0.0292)	248

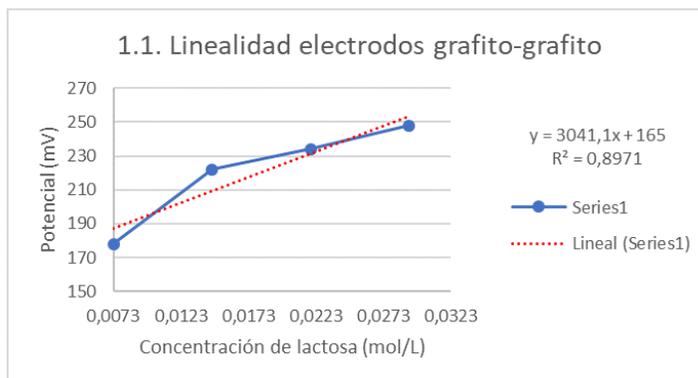


Figura 6-32.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.

En la gráfica de la Figura 6-32 se puede observar linealidad en tres de las cuatro muestras evaluadas según la línea de tendencia teórica, ya que la muestra dos con concentración de 0.0146 mol/L (100 mg) presentó un desfase de 10 mV , producido probablemente por mala medición de la cantidad de lactosa al pesar en la balanza digital o menor cantidad de los agentes químicos, agregados al momento de preparar las soluciones.

El segundo par de electrodos a evaluar fueron grafito-zinc, los cuales se acondicionaron al electrodo de referencia, se preparó soluciones de acuerdo a las concentraciones de lactosa a medir y se realizó la toma de voltajes por medio del multímetro, datos que arrojaron la Tabla 6-14 y la Figura 6-33.

En la Figura 6-33 se observa una mayor linealidad con referente al coeficiente de correlación dado por la gráfica para grafito-grafito (Figura 6-32), en este caso el coeficiente de correlación o R^2 es de 0.9557 y la muestra con mayor desviación fue la de 0.0219 mol/L o 150 mg , sin embargo el rango de desviación es igual al de 100 mg para grafito-grafito.

Tabla 6-14.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	1614
100 (0.0146)	1638
150 (0.0219)	1667
200 (0.0292)	1724

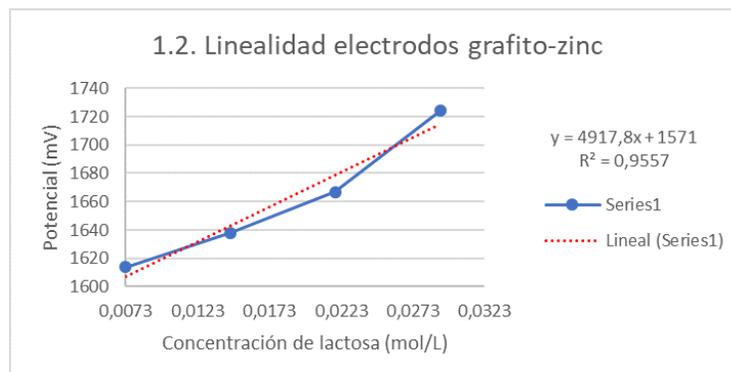


Figura 6-33.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.

El tercer par de electrodos fue grafito-cobre, siendo el de grafito el indicador y el de cobre el de referencia, se acondicionaron al montaje y como lo muestra la Tabla **6-15**, se tabuló y analizó los datos obtenidos en términos de voltaje (mV) y concentración de lactosa (mol/L). La Tabla **6-15** inicialmente presenta unos voltajes poco proporcionales a la concentración de lactosa, puesto que los datos para 150 mg y 200 mg están inversamente proporcionales.

Como se mencionaba anteriormente, se puede corroborar en la gráfica de la Figura **6-34**, en donde nuevamente el voltaje para 0.0219 mol/L o 150 mg es inapropiado, porque presenta una variación con respecto a la línea teórica de 10 mV aproximadamente, además de presentar variaciones mínimas en las muestras 0.0146 mol/L y 0.292 mol/L , respectivamente 100 mg y 200 mg de lactosa.

Tabla 6-15.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-cobre. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	574
100 (0.0146)	596
150 (0.0219)	706
200 (0.0292)	678

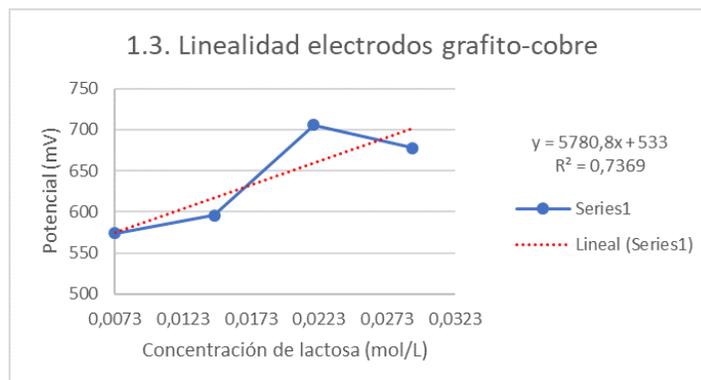


Figura 6-34.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-cobre. Fuente: Autor.

Y el cuarto par de electrodos pre-seleccionados fueron cobre-zinc, se acoplaron al montaje al igual que los electrodos anteriores y se realizaron las mediciones de diferencia de potencial por medio del componente electrónico multímetro. En la Tabla **6-16** se observa una mayor varianza y desproporcionalidad de los datos registrados a comparación de las tablas registradas para los otros pares de electrodos.

Es por lo ello, que en la Figura **6-35** se puede ver que el coeficiente de correlación es de 0,261, dato totalmente alejado de 1. Siendo lo anterior, el dato necesario para descartar en primera instancia, dicho par de electrodos.

Tabla 6-16.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con cobre-zinc. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	689
100 (0.0146)	714
150 (0.0219)	845
200 (0.0292)	736

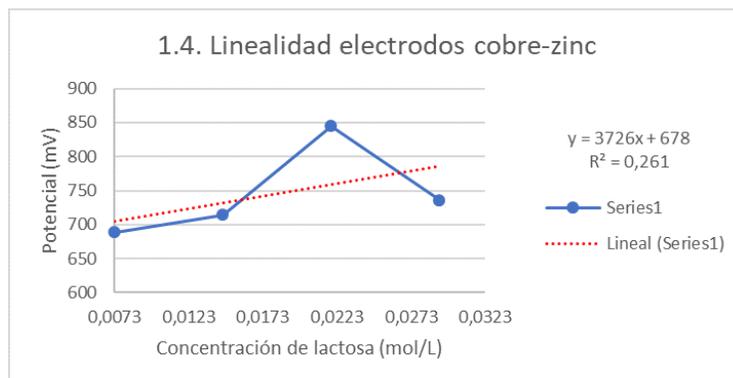


Figura 6-35.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con cobre-zinc. Fuente: Autor.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados arrojados por cada tabla y gráfica al igual que su respectivo análisis y comparación entre estas, se llega a la conclusión de discernir los pares de electrodos, dejando únicamente los electrodos con coeficiente de correlación más cercano a 1, es decir a una linealidad correcta. Los dos pares de electrodos, seleccionados fueron grafito-grafito y grafito-zinc, ya que los otros electrodos daban datos variantes e indirectamente proporcionales a las concentraciones de lactosa evaluadas, a pesar de tener una relación estequiométrica entre estas y las concentraciones de los agentes hidrolizante y oxidante. Se puede indicar que posiblemente la no linealidad se debe a la interacción entre los electrodos y su capacidad en la producción de fuerza electromotriz.

Después de seleccionar y discernir los pares de electrodos pre-seleccionados, se procedió a evaluar el mismo montaje inicial del electrodo combinado pero únicamente para los pares de electrodos grafito-grafito y grafito-zinc. Con la finalidad de evaluar una última vez los tipos de electrodos y seleccionar el más selectivo y lineal para que hiciera parte del electrodo combinado, para ello se requiere del aumento en el rango de muestras de lactosa a cuantificar, por lo cual las concentraciones a medir son de 50 mg a 500 mg de lactosa cada 50 mg de diferencia.

Por esa razón, el primer par de electrodos a evaluar fue grafito-grafito. Para ello, se acopló el par de electrodos al montaje y se prepararon las soluciones a reaccionar con estos, como se indica en los diagramas metodológicos (Figura 6-30 y 6-31. Los voltajes resultantes de la reacción (mV) son registrados por el multímetro y ubicados en la siguiente gráfica y tabla:

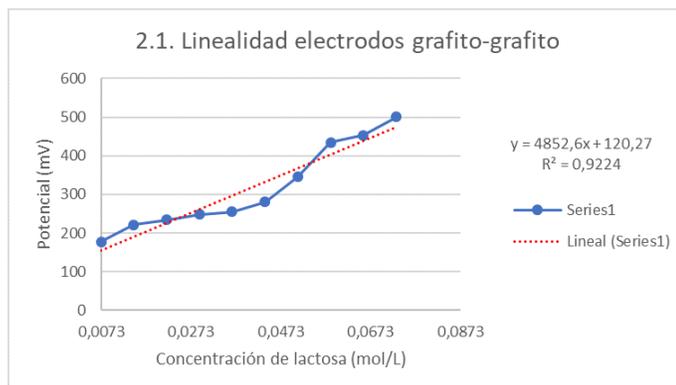


Figura 6-36.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.

Tabla 6-17.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-grafito. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	178
100 (0.0146)	222
150 (0.0219)	234
200 (0.0292)	248
250 (0.0365)	255
300 (0.0438)	280
350 (0.0511)	345
400 (0.0584)	435
450 (0.0657)	453
500 (0.0730)	501

En la Tabla **6-17** se observa una relación directamente proporcional entre las dos columnas y se observa unos rangos de variación muy mínimos. Análisis que se puede corroborar con la comparación entre la linealidad teórica y la experimental, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.9224, el cual no fue 1 debido a la desviación de las muestras para 0.0365 mol/L (250 mg) y 0.0438 mol/L (300 mg) de lactosa.

En segundo lugar, se evaluó los electrodos grafito-zinc, donde grafito es electrodo indicador y zinc el electrodo de referencia, se prosiguió con la medición y tabulación de los mismos en Excel.

Tabla 6-18.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Potencial (mV)
50 (0.0073)	1614
100 (0.0146)	1638
150 (0.0219)	1667
200 (0.0292)	1724
250 (0.0365)	1642
300 (0.0438)	1675
350 (0.0511)	1792
400 (0.0584)	1805
450 (0.0657)	1814
500 (0.0730)	1816

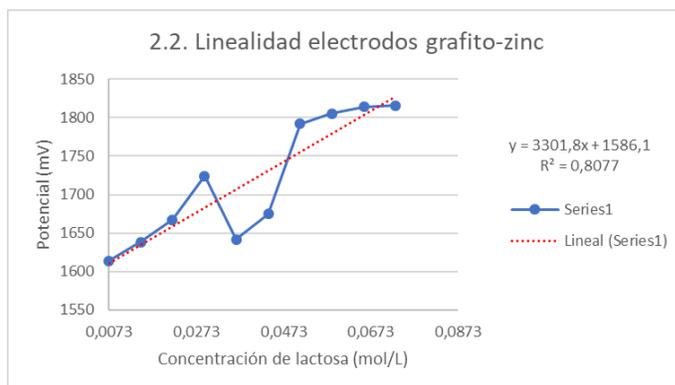


Figura 6-37.: Selección de los pares de electrodos (indicador-referencia) para conformar el electrodo combinado. Evaluación con grafito-zinc. Fuente: Autor.

En la Tabla 6-18 y gráfica de la Figura 6-37 se visualiza una diferencia de variación mayor a la encontrada en los electrodos grafito-grafito, puesto que el rango de variación para las concentraciones de 200 mg a 400 mg o 0.0292 mol/L a 0.584 mol/L varía de acuerdo a la línea de tendencia

hasta 20 mV y entre las mismas muestras hasta 50 mV . Por otro lado, el coeficiente de correlación es de 0.8077, dato justificado con las varianzas de las muestras y mediciones dadas en la gráfica.

Por lo anterior, se llegó a la conclusión de definir el par de electrodos grafito-grafito como electrodos indicador y de referencia respectivamente, para constituir parte de la metodología selectiva para detectar lactosa en el lactosuero residual de la industria láctea y, así el electrodo combinado que hace parte del prototipo de biosensor en desarrollo. Es decir, el par de electrodos de referencia seleccionados cuentan con un coeficiente de correlación de 0.9224 y se considera que tal vez sus datos poco linealizados se deben al manejo práctico de los instrumentos y manejo de cifras significativas al momento de las mediciones estequiométricas de los agentes hidrolizante (HCl) y oxidante (KMn_4), así como del tiempo de reacción y toma de cada muestra. Dichos errores prácticos fueron puestos en práctica de ahí en adelante, para la selección del cofactor y realización de la curva de calibración de los electrodos para la construcción de la etapa de instrumentación.

6.2.2. Lineamientos de control de calidad analíticos para caracterizar los electrodos grafito-grafito

A continuación se procede a realizar el análisis estadístico de la variación de los datos arrojados durante la caracterización del par de electrodos grafito-grafito, mediante el estudio por triplicado y réplicas de las cantidades de lactosa a evaluar, logrando obtener tablas y curvas de calibración en Excel, que posteriormente fueron evaluadas por el método ANOVA, arrojando algunos datos de mayor importancia, los cuales fueron analizados para la validación de los electrodos que acompañarán la transducción del prototipo de laboratorio. Para el primer triplicado, aplicando el proceso para agilizar la toma de mediciones por cada concentración de lactosa y la metodología explicada para el triplicado anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 6-19 y gráfica de la Figura 6-38.

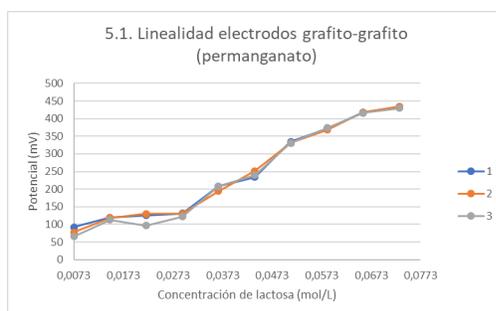


Figura 6-38.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 1. Fuente: Autor.

Tabla 6-19.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 1. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Réplica 1 (mV)	Réplica 2 (mV)	Réplica 3 (mV)
50 (0.0073)	92	78	66
100 (0.0146)	119	118	113
150 (0.0219)	126	130	97
200 (0.0292)	131	130	122
250 (0.0365)	208	194	208
300 (0.0438)	234	251	240
350 (0.0511)	335	331	331
400 (0.0584)	372	368	374
450 (0.0657)	418	418	416
500 (0.0730)	433	434	430

Para este caso, los rangos de potencial (mV) para las tres réplicas varió aproximadamente entre 65 mV y 435 mV , con un aumento de 100 mV cada 2 concentraciones de lactosa y en la Figura 6-38 se observa que el dato que más se alejó con respecto a las mismas mediciones de las réplicas fue el de 0.0219 mol/L o 150 mg respectivamente.

En las Figuras 6-39, 6-40 y 6-41 se ve la tabulación de cada réplica tomada para el segundo triplicado mediante gráficas, con su respectivo coeficiente de correlación.

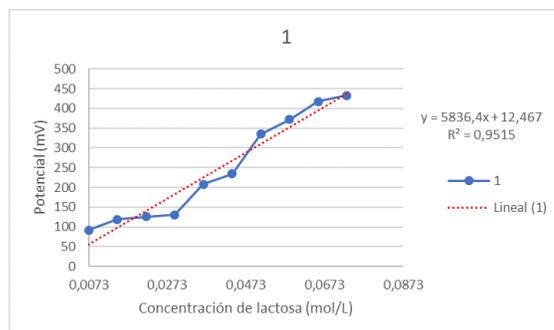


Figura 6-39.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 1. Réplica 1. Fuente: Autor.

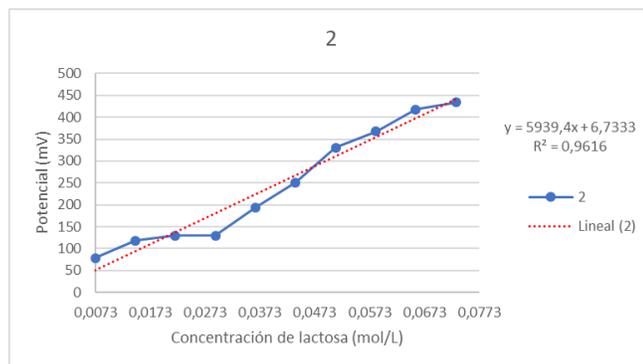


Figura 6-40.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 1. Réplica 2. Fuente: Autor.

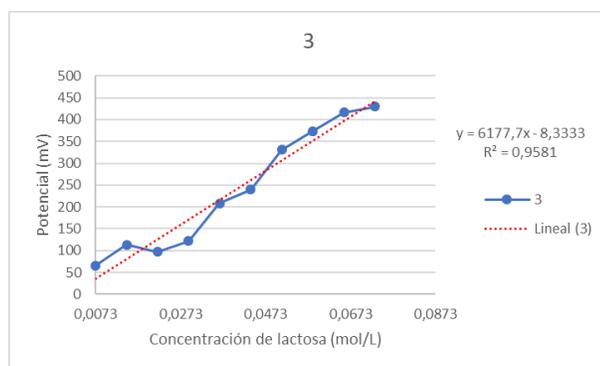


Figura 6-41.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 1. Réplica 3. Fuente: Autor.

Los coeficientes de correlación en orden según la ubicación de las gráficas fueron: 0.9515, 0.9021 y 0.8671, siendo la gráfica el promedio de datos entre la primera y la tercera. Por otro lado, los voltajes que más cambiaron para las tres gráficas fueron de 0.0292 mol/L (200 mg) a 0.0511 mol/L (350 mg), con mayor diferencia el voltaje para 0.0365 (250 mg) como se corrobora en la gráfica general de este triplicado (Figura 6-19).

Por ende, hasta el momento se puede concluir que el rango de potencial para concentraciones entre 50 mg y 500 mg es de 65 mV a 435 mV aproximadamente y que el dato con mayor variación fue de 200 mg y 400 mg para ambos triplicados, por lo cual, sí se requirió de la construcción de una etapa de instrumentación sencilla, porque son pocos los valores no lineales y el rango de varianza

con referente a la linealidad teórica (50 mg).

Se continuó con el segundo triplicado, aplicando el proceso para agilizar la toma de mediciones por cada concentración de lactosa y la metodología explicada para el triplicado anterior. Los resultados se presentaron en la Tabla 6-20 y gráfica de la Figura 6-42.

Tabla 6-20.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Réplica 1 (mV)	Réplica 2 (mV)	Réplica 3 (mV)
50 (0.0073)	84	81	88
100 (0.0146)	148	128	138
150 (0.0219)	240	241	243
200 (0.0292)	258	265	247
250 (0.0365)	266	280	272
300 (0.0438)	327	329	326
350 (0.0511)	366	363	365
400 (0.0584)	362	371	392
450 (0.0657)	420	422	417
500 (0.0730)	448	440	435

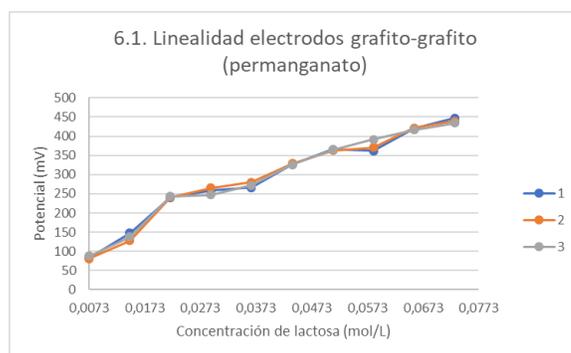


Figura 6-42.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Fuente: Autor.

Para este caso, los rangos de potencial (mV) para las tres réplicas varió aproximadamente entre 65 mV y 435 mV , con un aumento de 100 mV cada 2 concentraciones de lactosa y en la Figura 6-42 se observa que el dato que más se alejó con respecto a las mismas mediciones de las réplicas fue el de 0.0219 mol/L o 150 mg respectivamente.

En las Figuras 6-43, 6-44 y 6-45 se ve la tabulación de cada réplica tomada para el segundo triplicado mediante gráficas, con su respectivo coeficiente de correlación.

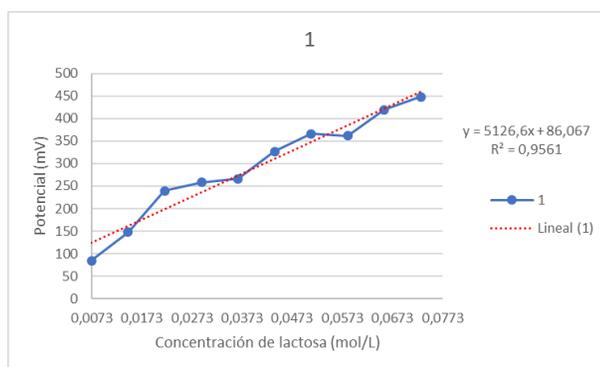


Figura 6-43.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Réplica 1. Fuente: Autor.

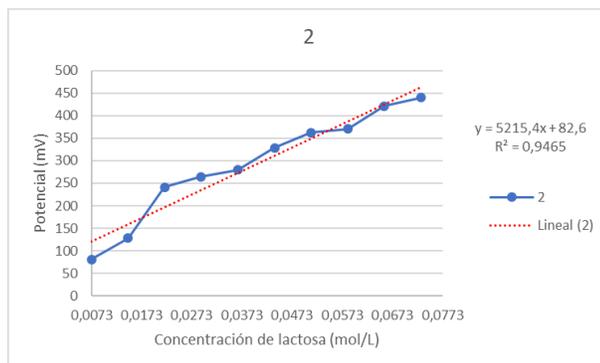


Figura 6-44.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Réplica 2. Fuente: Autor.

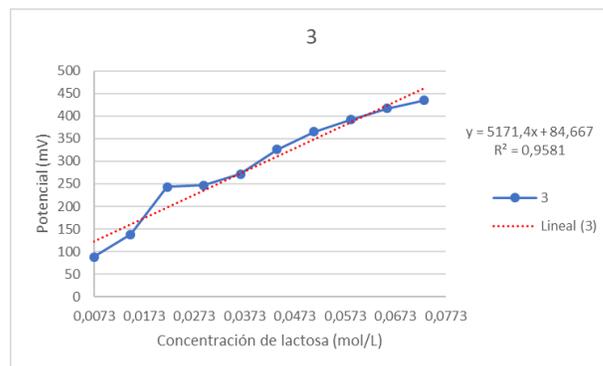


Figura 6-45.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 2. Réplica 3. Fuente: Autor.

Los coeficientes de correlación en orden según la ubicación de las gráficas fueron: 0.9515, 0.9021 y 0.8671, siendo la segunda gráfica el promedio de datos entre la primera y la tercera. Por otro lado, los voltajes que más cambiaron para las tres gráficas fueron de 0.0292 mol/L (200 mg) a 0.0511 mol/L (350 mg), con mayor diferencia el voltaje para 0.0365 (250 mg) como se corrobora en la gráfica general de dicho triplicado (Figura 6-20).

Por ende, hasta el momento se puede concluir que el rango de potencial para concentraciones entre 50 mg y 500 mg es de 65 mV a 435 mV aproximadamente y que el dato con mayor variación es de 200 mg y 400 mg para ambos triplicados, por lo cual, sí se requirió hacer una etapa de instrumentación sencilla, porque son pocos los valores no lineales y el rango de varianza con referente a la linealidad teórica (50 mg).

Para el tercer triplicado, se realizó la evaluación de los rangos de concentración de lactosa según relación estequiométrica a partir del montaje adecuado de la metodología. En la Tabla 6-21 y Figura 6-46 se visualiza la tabulación de los resultados dados en términos de voltaje para cada una de las tres réplicas según sea la concentración de lactosa.

En la Tabla 6-21, al comparar los voltajes dados entre cada columna de las réplicas se puede ver una similitud directamente proporcional entre estos, los cuales se encuentran entre un rango aproximado de 110 mV a 400 mV con aumento de 100 mV cada dos o tres concentraciones de lactosa. Y en cuanto a la gráfica de la Figura 6-38, se observa algunas variaciones de potencial (mV) en las muestras de 0.0073 mol/L (50 mg), 0.0292 mol/L (200 mg), 0.0511 mol/L (350 mg), 0.0657 mol/L (450 mg) y 0.0730 mol/L (500 mg), cuya variación máxima es 50 mV y mínima es 5 mV aproximadamente.

Tabla 6-21.: Fase 5. Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Fuente: Autor.

Concentración de lactosa (mg)(mol/L)	Réplica 1 (mV)	Réplica 2 (mV)	Réplica 3 (mV)
50 (0.0073)	88	89	86
100 (0.0146)	167	183	187
150 (0.0219)	192	188	166
200 (0.0292)	209	191	193
250 (0.0365)	289	240	282
300 (0.0438)	316	313	319
350 (0.0511)	326	329	333
400 (0.0584)	366	373	407
450 (0.0657)	397	401	383
500 (0.0730)	433	429	436

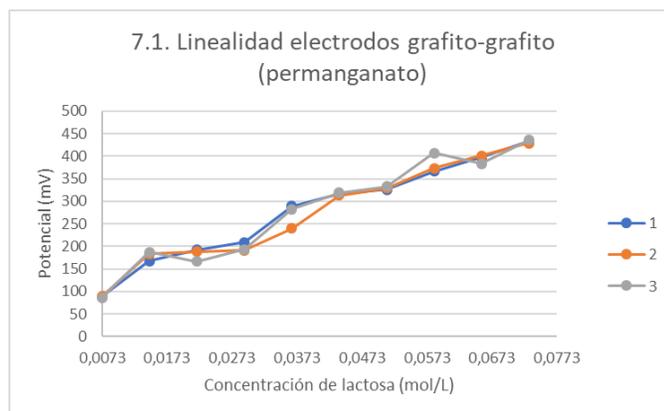


Figura 6-46.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa, con electrodos grafito-grafito y cofactor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Fuente: Autor.

Esos mismos resultados se pueden analizar de manera detallada para cada uno de los replicados en las tres figuras siguientes:

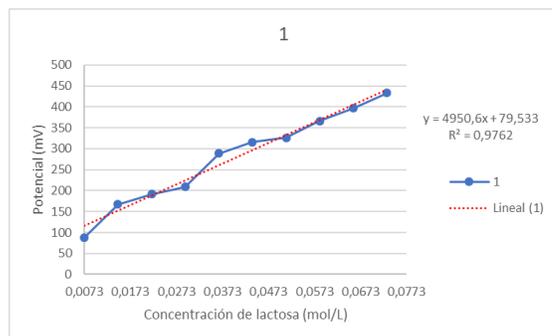


Figura 6-47.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, con electrodos grafito-grafito y co-factor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Réplica 1. Fuente: Autor.

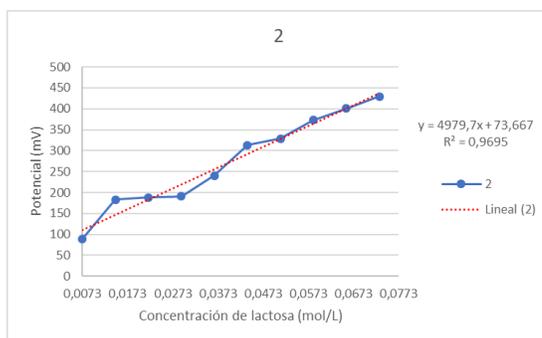


Figura 6-48.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, con electrodos grafito-grafito y co-factor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Réplica 2. Fuente: Autor.

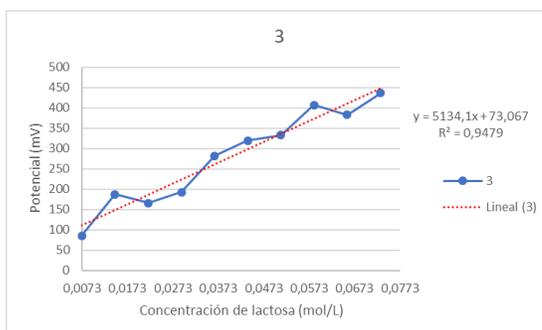


Figura 6-49.: Evaluación y calibración de la metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual, con electrodos grafito-grafito y co-factor $KMnO_4$ en lactosa pura. Triplicado 3. Réplica 3. Fuente: Autor.

Por lo tanto, en las Figuras **6-47**, **6-48** y **6-49** se puede leer respectivamente el coeficiente de correlación para cada réplica en el siguiente orden: 0.8966, 0.9021 y 0.9001; así como la linealidad entre los resultados arrojados por el multímetro y la línea de tendencia teórica. De lo cual, se puede ver que hay mayor variación en la gráfica de Figura **6-48** y menor variación en la de la Figura **6-47**; además, que los voltajes más alejados son los mismos para las tres gráficas, generando un dato erróneo para estudio y solución posterior de este, ya que al ser repetidos no se debe a un error práctico.

Sin embargo, en este caso se vio como impedimento el factor tiempo, ya que cada matriz de lactosuero duraba aproximadamente 3 *min* en hidrolizar y eran en total 30 réplicas por preparar y realizar mediciones. Para lo cual, se decidió agilizar el proceso de evaluación de cada triplicado, mediante la preparación y cuantificación de la matriz de lactosuero para los tres vasos de precipitado con igual cantidad de lactosa e hidrolización de cada solución, mientras pasaban los 3 *min* de la hidrolización de los vasos de precipitado anteriores. Los lineamientos de control de calidad analíticos se desarrollaron mediante triplicados y réplicas para la evaluación del par de electrodos seleccionados (grafito-grafito), como se pudo ver anteriormente. Continuo a esto, se realizó el análisis estadístico de los lineamientos para validar qué tan certera fue la elección de este electrodo combinado. Para ello se utiliza el análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, como se indica en la Tabla **6-22**.

Tabla 6-22.: ANOVA para la interacción entre los triplicados. Análisis de varianza de la interacción por réplicas.

Origen variaciones	Suma cuadrados	Grados libertad	Promedios cuadrados	F	P	Valor crítico F
Interacción	378.8667	4	94.7167	0.0063	0.9999	2.4844
Dentro de triplicados	1208788.4	81	14923.3136			
Total	1245686	89				

En la anterior tabla se puede observar que la interacción entre triplicados arroja un valor F de 0.0063 y un valor crítico para F de 2.4844, al relacionar estos dos datos estadísticos se puede observar que el valor F es menor al valor crítico, indicando que no se rechaza la hipótesis nula, esto quiere decir, que las variables entre triplicados están relacionadas y sus medias son iguales, por lo tanto, se dice que al momento de realizar las mediciones de lactosa con los electrodos seleccionados se tiene un 95 % de confiabilidad de que la media de los datos registrados será la misma que si se tomara la medición con la misma muestra de lactosuero días después. Lo que indica que los electrodos se encuentran caracterizados y linealizados dentro del rango de detección dado por el biosensor, asegurando al usuario mayor fiabilidad de los datos tomados y nivel de calidad del equipo

(Engineering Zone, 2018).

Este análisis anterior se puede corroborar con el valor P , donde analiza si este es mayor a 0.05, interpretando en este caso que 0.9999 es mayor a 0.05 y por ello, se aprueba la hipótesis nula, donde se tiene una mínima variación de sus datos con un nivel de confiabilidad del 95 % (Engineering Zone, 2018).

De otra manera, a partir del análisis físico-químico y electroquímico se argumenta el comportamiento del grafito como material conductor con respecto a los demás electrodos evaluados. Razón por la cual, se debe conocer que el grafito es un material natural que contiene numerosas imperfecciones e impurezas, además está compuesto por átomos de carbono formando una red hexagonal plana o más conocida como grafeno, un material puramente bidimensional que puede ser considerado como el constituyente básico de los materiales de carbono grafiticos (basados en la hibridación sp_2), es decir, cuando se produce esta hibridación, cada átomo de carbono se une a otros tres mediante fuertes enlaces covalentes, característica que hace parte de las propiedades eléctricas de estos materiales; además que el grafito está determinado por electrones ν deslocalizados, los cuales se encuentran libres para moverse a lo largo del plano basal (direcciones paralelas al plano) pero no en la dirección perpendicular, debido a la elevada separación entre planos y ausencia de enlaces químicos en la dirección perpendicular al plano y, por lo tanto, las interacciones en esta dirección son muy débiles (Solís, 2011).

Por lo tanto, se dice que el grafito a nivel de su estructura electrónica es un semimetal, con una pequeña densidad de estados en la parte superior del conjunto de niveles de energía de electrones a la temperatura de cero absoluto, lo que lo hace un buen conductor eléctrico, gracias a la gran cantidad de electrones ν deslocalizados que existen entre las láminas (Solís, 2011).

El grafito sobresale con respecto a los demás electrodos evaluados puesto que sobresale por encima de estos en cuanto a conductividad térmica superior a la de cualquier otro material como el cobre, posee potente elasticidad y dureza, tiene una resistencia 200 veces superior a la del acero, genera reacciones químicas con otras sustancias originando compuestos de propiedades nuevas, es ligero, flexible, se calienta menos al conducir los electrones y es más eficiente que el silicio, ya que consume menos electricidad, a la hora de realizar la misma función (Suárez, 2010).

De igual manera, es muy fácil para maquinizar, resistente a los choques térmicos, tiene un coeficiente bajo de expansión térmica (3 veces mayor que el cobre) que garantiza la estabilidad de la geometría de electrodo durante el mecanizado con descarga eléctrica, no se funde, se transforma directamente del estado sólido al estado gaseoso evitando el desgaste, su densidad es 5 veces más baja que la del cobre, lo que resulta en electrodos más ligeros, proporciona una tasa más alta de eliminación de metal que el cobre pero con menos desgaste, tiene la característica única de que el desgaste tiende a disminuir cuando la corriente aumenta (MERSEN, 2017).

Conclusión Fase II

Finalmente, en la Fase II como resultado de su desarrollo en totalidad, es decir, como resultado de la caracterización del tipo de transductor que permita transformar la señal generada por la reacción química, en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa, se evaluaron cuatro pares de electrodos de los cuales se seleccionó el par grafito-grafito, ya que fue el que mejor viabilidad y compatibilidad tuvo con la metodología establecida para detección selectiva de lactosa, puesto que su regresión lineal fue la más cercana a 1 y su respuesta fue directamente proporcional a las concentraciones de lactosa que fue sometido. Así mismo, se realizó a los electrodos grafito-grafito su calibración y validación por los lineamientos de control de calidad analíticos y el método estadístico ANOVA, de los cuales se obtuvieron tablas, gráficas y datos estadísticos arrojados por Excel, como se pudo observar en las respectivas subfases de desarrollo del segundo objetivo.

6.3. Fase III. Diseño e implementación del prototipo de laboratorio de biosensor

El cumplimiento del tercer objetivo específico tiene seis subfases o tareas que se desarrollaron de manera ordenada, obteniéndose resultado en las siguientes: 1. Levantamiento de requerimientos según la información dada por el usuario; 2. Diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio; 3. Diseño en ingeniería de la etapa instrumental; 4. Montaje en protoboard y evaluación de la etapa de instrumentación del prototipo de laboratorio de biosensor; 5. Montaje y programación del sistema de dosificación del agente oxidante. Concluyendo con la construcción del prototipo de laboratorio de biosensor, el montaje y programación de la etapa instrumental y del sistema de dosificación, así como la evaluación del funcionamiento de dicha etapa.

6.3.1. Levantamiento de requerimientos

El método QFD fue evaluado de acuerdo a su proceso de desarrollo (explicado a detalle en la sección de metodología 5.3.2), arrojando como resultado la ponderación de los requerimientos técnicos y del usuario, como el planteamiento de sus objetivos a cumplir. El desarrollo y los resultados del método se encuentran en el Anexo B, ya que por la cantidad del contenido presente en el mismo se requiere ubicarlo en un formato de hoja de mayor tamaño en Excel. Sin embargo, los resultados obtenidos al final de la ejecución del método fue la ponderación de cada requerimiento técnico y del usuario, necesarios para ser llevados a objetivos que debían ser cumplidos durante el diseño

e implementación del prototipo de laboratorio de acuerdo al nivel de importancia dado por la ponderación. Por lo tanto, a continuación se encuentran los requerimientos ordenados de mayor a menor importancia, separados por punto y coma (;), estos son:

La composición química de los materiales de fabricación no deben inhibir la reacción química entre el lactosuero residual y el electrodo combinado y, por ende, en la cantidad de energía eléctrica liberada y captada por el par de electrodos; el producto debe ser portable puesto que la toma de la muestra se debe realizar en una zona de la industria láctea inapropiada para proceder a realizar metodologías rigurosas que requieran de espacio, tiempo (horas o días) y comodidad, además, que permite a la industria láctea hacer seguimiento de sus vertimientos en diferentes puntos y en un tiempo de respuesta menor a 8 *min*; el producto debe ser compacto para impedir el deterioro de los componentes electrónicos presentes en la etapa de instrumentación por filtración de residuos de lactosuero o compuestos químicos en posibles uniones o malos sellamientos de las piezas; el rango de detección de la concentración de lactosa debe ser entre 0.0073 *mol/L* (50 *mg*) y 0.073 *mol/L* (500 *mg*); el potencial captado por los electrodos debe ser amplificado del orden de los *mV* al orden de los *V*, mediante una etapa de amplificación y acondicionamiento; la etapa de instrumentación, en especial la conversión analógica-digital, conexión del circuito electrónico al software y programación del mismo para la interacción con la pantalla de visualización de las concentraciones de lactosa debe tener una plataforma didáctica, inalámbrica, alimentada por una fuente de voltaje de 5 *V*, de fácil comprensión visual, manipulación y mantenimiento por un usuario no conocedor de electrónica ni química y sin tener capacitaciones sobre el tema; las etapas de reconocimiento e instrumentación deben estar integradas a nivel funcional y estructural, puesto que lo que se requiere es un equipo unificado; la fuente de alimentación del biosensor debe ser recargable y con voltajes de 5 *V* a 12 *V*; la pantalla de visualización debe ir acoplada a la estructura del equipo, debe dar los resultados en concentraciones de lactosa en *mg* y dar aviso si se sobre pasa con el límite de concentración según la normativa colombiana (400 *mg*) y el porcentaje de confiabilidad del prototipo de biosensor dado por el método estadístico ANOVA debe ser del 95 %.

Todos estos requerimientos se tuvieron en cuenta para calcular los objetivos que se cumplieron durante el diseño y construcción de la estructura y etapa instrumental del prototipo, asegurando su calidad, confiabilidad y funcionalidad. Los objetivos determinados y cumplidos fueron los siguientes:

- Construir la estructura del biosensor con un material impermeable y compacto para que no inhiba el proceso químico e inhiba de los componentes de la etapa de instrumentación.
- Diseñar un prototipo de laboratorio de biosensor que sea portable, cómodo, con una metodología sencilla y con un tiempo de respuesta menor a 8 *min*.
- Desarrollar un biosensor con un rango de detección de la concentración de lactosa entre 0.0073 *mol/L* (50 *mg*) y 0.073 *mol/L* (500 *mg*).

- Desarrollar un sistema de acondicionamiento de la señal útil que lleve del orden de los mV al orden de los V .
- Desarrollar un sistema de procesamiento de la señal de salida del sistema de acondicionamiento mediante la programación de una placa de desarrollo y un sistema de visualización de la cantidad de lactosa, de manera didáctica.
- Diseñar una estructura del biosensor donde las etapas de reconocimiento e instrumentación deben estar integradas a nivel funcional y estructural, puesto que lo que se requiere es un equipo unificado.
- Desarrollar un prototipo de laboratorio de biosensor con un porcentaje de confiabilidad dado por el método estadístico ANOVA del 95 %.

Llegando así a concluir que los requerimientos técnicos y del usuario según orden de importancia se convirtieron en objetivos o metas alcanzadas para dar cumplimiento con en el diseño del prototipo de biosensor en su totalidad y satisfacer las necesidades del usuario. Por ello, desde la ingeniería de diseño se continuo con la elaboración y selección de varias alternativas de solución para el diseño de la estructura funcional del prototipo de biosensor y los componentes que lo conforman mediante matrices de decisión, para luego ser llevados a la ingeniería de detalle cómo se observa en las siguientes subfases que conformaron el tercer objetivo específico.

Luego de haber realizado y analizado el método QFD sobre el diseño que sería ideal y cumpliría con las necesidades del cliente, se procedió a generar los bosquejos a mano de los diseños conceptuales que podrían dar solución a los resultados del método QFD.

6.3.2. Diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio

El diseño en ingeniería de la estructura del prototipo de laboratorio de biosensor se compone de dos grandes resultados: en primer lugar de un diseño conceptual donde se seleccionó el diseño de una estructura funcional para el prototipo que cumpliera con los requerimientos en ingeniería planteados por la información dada por el usuario y, en segundo lugar de un diseño detallado a partir del modelamiento y simulación en CAD, lo que llevó a la obtención de unos planos técnicos y un video en vista explosionada del modelado de la estructura para realizar la construcción final de un prototipo de laboratorio de biosensor como resultado de la tercera fase metodológica.

Diseño conceptual del prototipo de laboratorio

El desarrollo del diseño conceptual consistió en el planteamiento de varios diseños de la estructura funcional del prototipo de biosensor mediante bosquejos dentro de los cuales se da a conocer a nivel general las entradas, salidas y proceso interno de la estructura, como se explica en la caja gris realizada para cada uno; partiendo de la necesidad de cumplir con los objetivos formulados de la ponderación dada para los requerimientos por el método QFD y del montaje inicial de la estructura del electrodo combinado, nombrada en la sección de la metodología 5.3.1 (Dieter & Linda, 2013).

Por lo cual, se diseñaron siete diseños conceptuales que daban cumplimiento a la mayoría de los requerimientos técnicos y del cliente; teniendo presente que a medida que se iba realizando el bosquejo y caja gris de un nuevo diseño conceptual, se tenía en cuenta que este cumpliera con la mayor cantidad de requerimientos dados por el método QFD y que el diseño fuera acorde con el alcance del objetivo general y los objetivos específicos del proyecto de grado, así como también, que el tiempo de construcción estuviera dentro de la duración del semestre académico como estipula la facultad.

Por otro lado, previamente a la presentación de los resultados obtenidos, cabe mencionar que todos los diseños propuestos parten de un estructura de forma geométrica rectangular, ya que con esta se pretende: facilitar el agarre del producto por parte del usuario, que sea acorde a la estructura del circuito electrónico como al sistema de dosificación del agente oxidante, proporcione una base lisa y firme para poder realizar las mediciones y no correr el riesgo de que los agentes químicos como la muestra de estudio se puedan regar, tener un recipiente de deposición de la muestra de lactosuero que se acople a la estructura del prototipo para su correcta medición y brinde seguridad al usuario y, permitir una fácil armada y desarmada de la estructura por tener un sistema sencillo de aseguramiento de sus piezas ya que lo facilita este tipo de geometría (Dieter & Linda, 2013).

Y es así como se llega a obtener los siguientes diseños conceptuales, enumerados en orden de creación:

Diseño 1

El diseño 1 consta de una estructura fija tipo maletín con dos secciones separas, la primera de ellas contiene la etapa de instrumentación integrada con una pantalla LCD para la visualización del valor de lactosa, conectada mediante un cable coaxial a la segunda sección que contiene la etapa de reconocimiento donde se encuentran el electrodo combinado, la medición se hace por fuera del dispositivo sacando la etapa de reconocimiento del maletín y depositándolos en un vaso de precipitado con la muestra de lactosuero a analizar.

Diseño 2



Figura 6-52.: Diseño 2. Caja gris. Fuente: Autor.

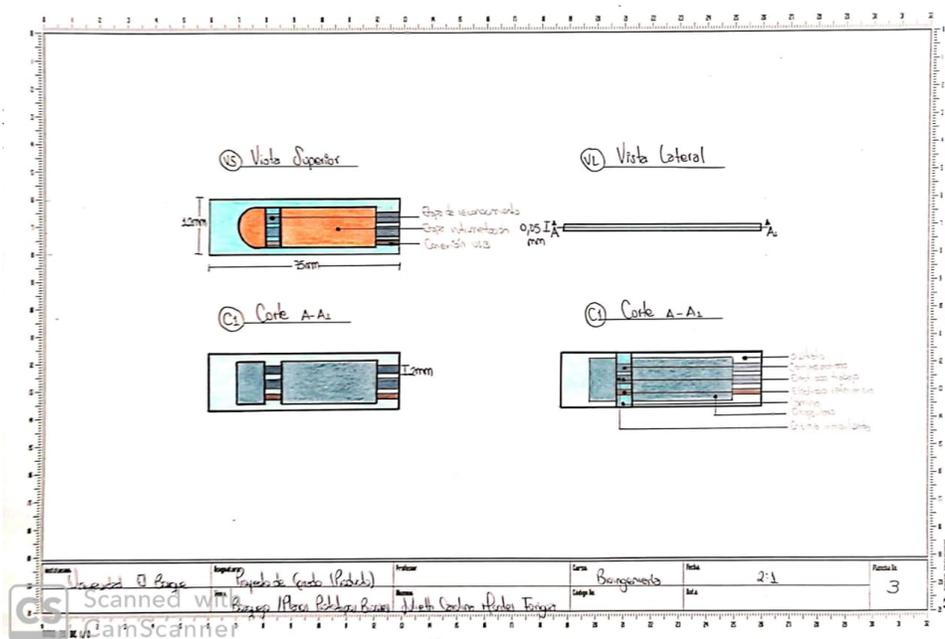


Figura 6-53.: Diseño 2. Diseño conceptual. Fuente: Autor.

El diseño 2 consta de una estructura similar a una USB, donde la etapa de reconocimiento va integrada con la etapa de instrumentación por medio de la inmovilización de enzimas como de la aplicación de la electrónica a escalas pequeñas. En la superficie de esta estructura se dispone de un orificio donde se depositan las gotas de lactosuero y se registra el valor de lactosa en el dispositivo para posteriormente ser conectado a un computador y poder visualizar los datos obtenidos. Este biosensor es similar a un glucómetro, con la diferencia que este usa materiales de alto impacto ambiental por lo cual debe ser desechado, además que no se puede hacer un mantenimiento ya que las fases están integradas y se dañan al entrar en contacto con cualquier líquido de limpieza o agua.

Este prototipo cumple con los requerimientos de ser compacto, evitar la inhibición de la reacción química del lactosuero y el electrodo, es portable gracias a su tamaño reducido lo que permite llevarlo de manera cómoda y utilizarlo cuando se requiera de urgencia, ya sea en un bolsillo o en la mano, su diseño permite guardarlo en un lugar seguro, este diseño es muy llamativo a excepción de que se requiere del uso de un dispositivo electrónico para visualizar cada medición, tiene un tiempo de respuesta óptimo, carece de automatización ya que solo se usa una vez el dispositivo, y la interacción con el usuario es nula ya que en ningún momento éste puede reutilizarlo y tener interacción con el dispositivo.

Diseño 3

El diseño 3 consta de dos estructuras, la primera es un recipiente rectangular con tapa o etapa de reconocimiento, compuesto por dos laminas de grafito como los electrodos y una lamina de vidrio poroso que separa la estructura en dos como un puente salino; esta estructura en sus laterales cuenta con orificios para el llenado con las soluciones requeridas como lo son: la muestra de lactosuero con ácido clorhídrico por el lado izquierdo (electrodo indicador) y la solución de permanganato de potasio en el lado derecho (electrodo de referencia). La tapa de este recipiente permite el acoplamiento de los electrodos como del puente salino a esta facilitando su mantenimiento y limpieza, ya que se tiene contacto directo con sus componentes.

La segunda estructura es una caja a donde llegan los cables provenientes de los electrodos de la primera estructura, estos cables están conectados a las dos laminas de grafito y al puente salino. En esta estructura se encuentra la etapa de instrumentación del biosensor, además que cuenta con un cable de conexión USB al computador para poder visualizar el valor de lactosa cuantificado.

El diseño no es compacto ya que esta compuesto por dos estructuras, además en este caso hay el riesgo que los materiales inhiban la reacción debido a posibles filtraciones entre las láminas, también se limita su función de ser portable ya que consta de dos partes que no se acoplan en una sola por esta razón el diseño tampoco es simple, el dispositivo permite que el electrodo combinado este seguro en todo momento, el tiempo de respuesta es el adecuado, ya que este depende del grosor y características de las láminas, finalizando con una interacción y automatización reducida debido a que no es inalámbrico porque se tiene que llevar al computador la información para poder ser visualizada, además que el usuario siempre tiene que llenar el dispositivo con las soluciones requeridas para cada medición con una jeringa de manera manual.

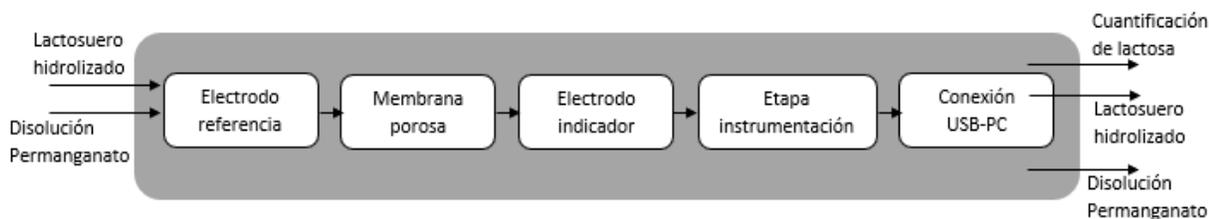


Figura 6-54.: Diseño 3. Caja gris. Fuente: Autor.

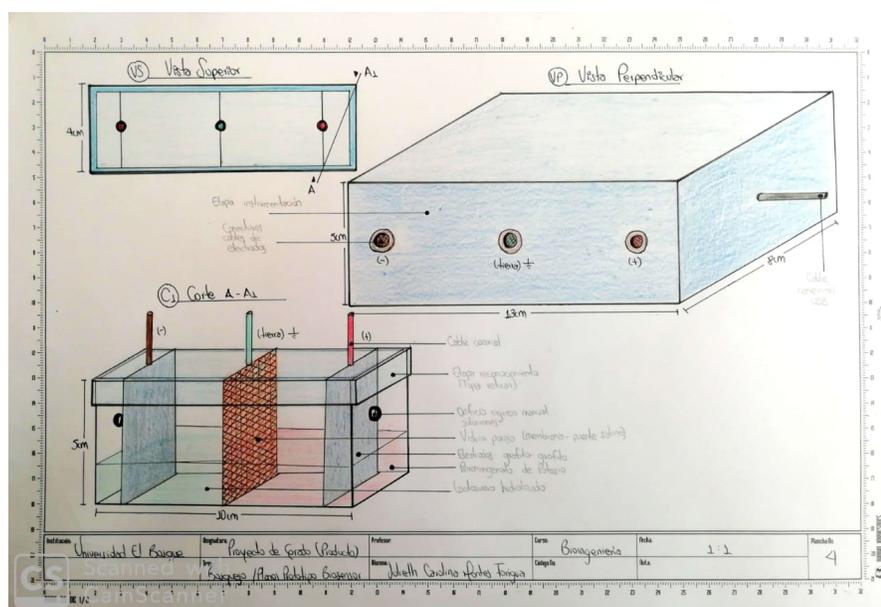


Figura 6-55.: Diseño 3. Diseño conceptual. Fuente: Autor.

Diseño 4

El diseño 4 cuenta con dos recipientes cuadrados unidos por un cilindro de vidrio en cuyo interior se tiene una solución gelatinosa como puente salino para permitir la interacción de iones dentro de la reacción química de esta etapa de reconocimiento, cada recipiente cuenta con un electrodo de grafito acoplado a una tapa por donde se colocan las soluciones a usar (muestra de lactosuero con ácido clorhídrico y permanganato de potasio). Además de estos dos recipientes unidos, se hace el uso de una caja que contiene toda la etapa de instrumentación, es decir, en su interior cuenta con el circuito electrónico y en su exterior con una pantalla LCD y dos potenciómetros como regulador de luz de la pantalla y seleccionador del menú, a esta caja van conectados los electrodos mediante cable coaxial generando el registro del valor de lactosa medido en el lactosuero.

El producto con estas características es medianamente compacto y portable, ya que está dividido en dos piezas de un tamaño considerable, este cumple con la función de no inhibir la reacción entre el lactosuero y los electrodos debido a que cada electrodo está debidamente separado. El arreglo de dos cajas unidas dificulta el mantenimiento debido a que tienden a ser frágiles y romperse al tener un contacto frecuente, el diseño permite además de ser un poco llamativo proteger los electrodos del ambiente y de que sufran rupturas por contacto, impacto o caídas. Al realizarse la reacción por el puente salino el tiempo de respuesta es mucho mayor; para finalizar con una interacción de componentes medianamente aceptable, un proceso de automatización nulo ya que en cada medición es necesario que el usuario llene el recipiente con las soluciones, la interacción es aceptable puesto que el equipo cuenta con un menú manejado a partir de un potenciómetro y visualizado por una pantalla LCD.

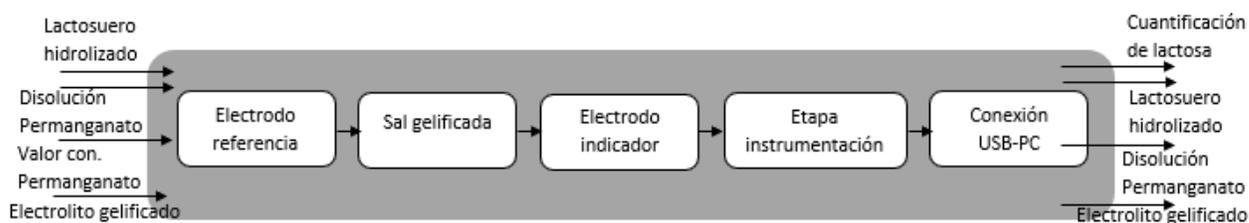


Figura 6-56.: Diseño 4. Caja gris. Fuente: Autor.

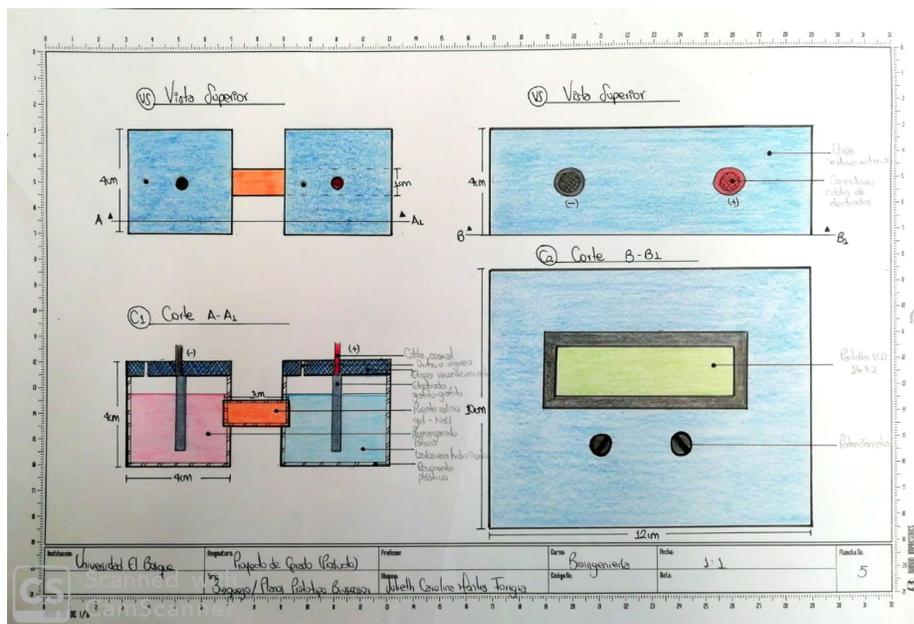


Figura 6-57.: Diseño 4. Diseño conceptual. Fuente: Autor.

Diseño 5

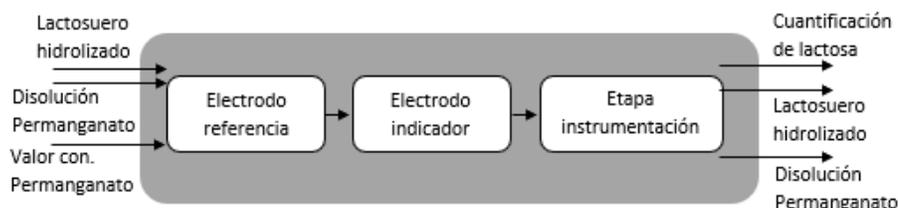


Figura 6-58.: Diseño 5. Caja gris. Fuente: Autor.

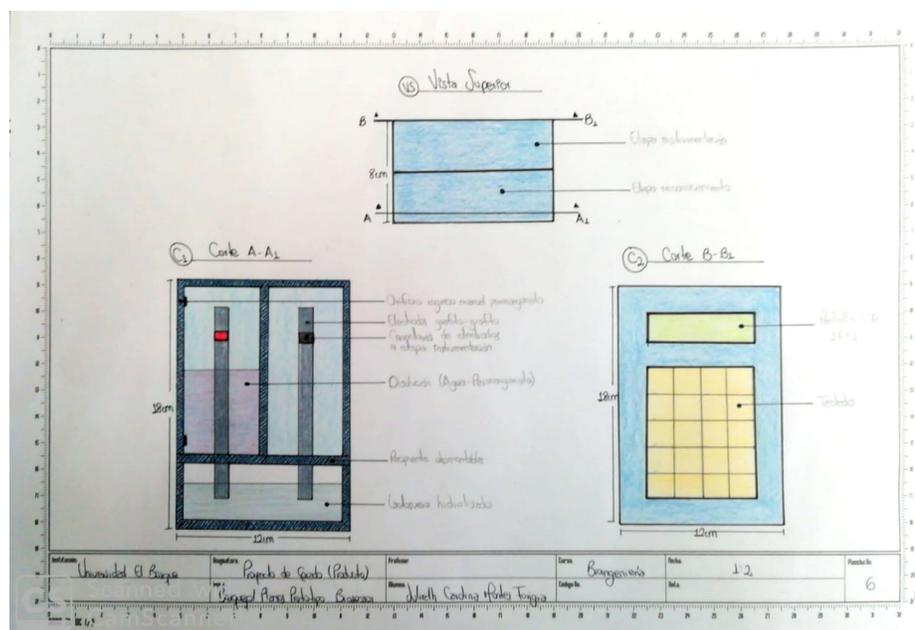


Figura 6-59.: Diseño 5. Diseño conceptual. Fuente: Autor.

El diseño 5 está conformado por una estructura rectangular íntegra y sencilla, esta estructura está dividida en dos compartimientos. El primer compartimiento hace referencia a la etapa de reconocimiento biológico, donde se encuentra seccionada en dos partes iguales, una para la ubicación de cada electrodo de grafito (electrodo de referencia, electrodo indicador) y en una tercera parte de manera horizontal inferior donde se coloca el lactosuero a estudiar. Para el caso del electrodo de referencia la pared lateral tiene dos orificios para permitir el llenado y extracción de la solución del agente oxidante de manera manual por medio de una jeringa.

El segundo compartimiento es la etapa de instrumentación, en la cual se tiene el circuito electrónico,

pantalla LCD y teclado. Esta etapa esta conectada con la primera por medio de dos cables que atraviesan la pared del medio por unos agujeros, con la finalidad de unir la señal captada por el electrodo combinado y llevarla a una señal eléctrica y visual para el usuario en términos de *mg*.

Este diseño se encuentra calificado con respecto a los demás diseños en un término medio, porque satisface los requerimientos en cuanto a facilidad del mantenimiento y calibración, ubicación segura del electrodo combinado, diseño llamativo del producto hacia el usuario y un tiempo de respuesta menor a 8 *min* y presenta inconvenientes al momento de decir que es una estructura automatizable con respecto a la no manipulación del agente oxidante por parte del usuario.

Diseño 6

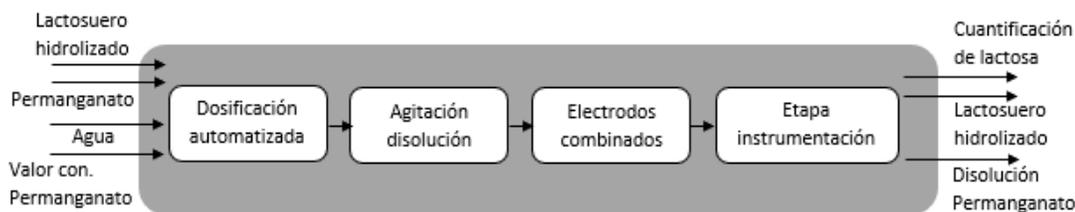


Figura 6-60.: Diseño 6. Caja gris. Fuente: Autor.

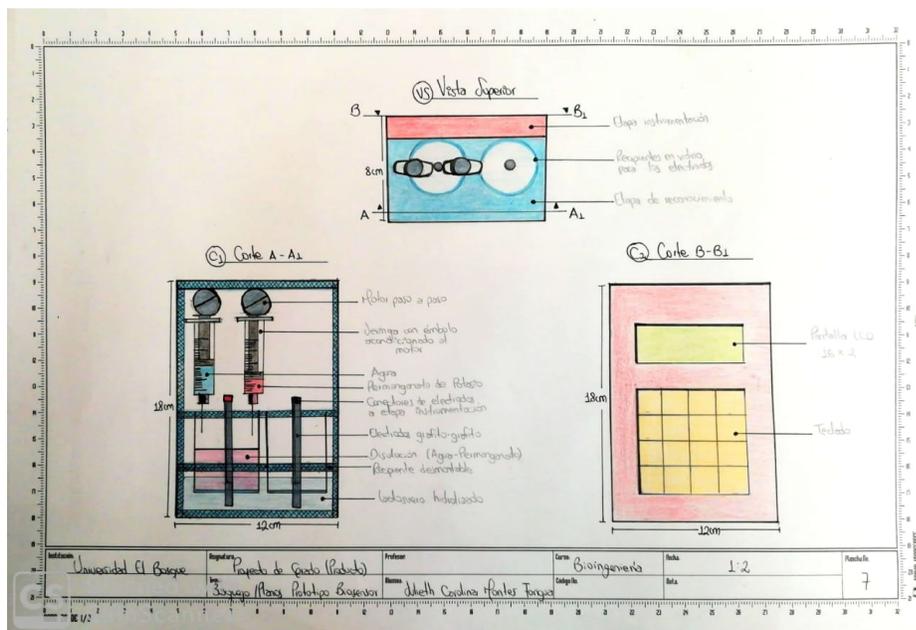


Figura 6-61.: Diseño 6. Diseño conceptual. Fuente: Autor.

El diseño 6 es similar al diseño 5, porque es una estructura rectangular integra que cuenta con un compartimiento para cada etapa del biosensor, pero con la diferencia de que en este caso la etapa de reconocimiento cuenta con un sistema de dosificación del agua y permanganato de potasio concentrado al electrodo de referencia, en donde se encuentra un motor encargado de realizar la agitación de este para obtener una solución del agente químico de manera homogénea, el resto de la descripción de esta etapa es la composición del electrodo combinado por dos recipientes en vidrio ubicados en una pieza rectangular con dos orificios para su deposición, cada recipiente contiene el electrodo de grafito, el cual sobresale de este para poder tener contacto con la muestra de lactosuero hidrolizada previamente de manera manual por el usuario, que es colocada y acondicionada a esta etapa por medio de un recipiente removible. Cabe aclarar que la solución del agente oxidante únicamente es usada una vez por medición y debe ser desechada.

La etapa de instrumentación, cuenta con un circuito electrónico, una pantalla LCD y un teclado como medio de interacción del usuario con el biosensor, por medio de la programación de estos componentes. En donde el usuario puede interactuar y decidir la función que desea que realice el equipo, ya sea dosificar o la lectura de lactosa en la muestra.

Los requerimientos que satisface este diseño son: un producto inalámbrico y portable, puesto que no requiere de un equipo electrónico de más para la lectura del resultado o su fuente de alimentación, un lugar adecuado para ubicar el electrodo combinado, ya que se encuentra dentro de la misma estructura y sus extremos que sobresalen son protegidos por el recipiente removible a esta y un diseño llamativo al usuario. Sin embargo sus dos requerimientos no alcanzados son: el tamaño y simplicidad del producto, como el tiempo de respuesta, esto se debe a que el sistema de dosificación exige complejidad y lleva un tiempo de más al ser un sistema que requiere de la respuesta de dos jeringas y de la agitación de la reacción por parte de un motor hasta que esta se vea totalmente homogénea.

Diseño 7

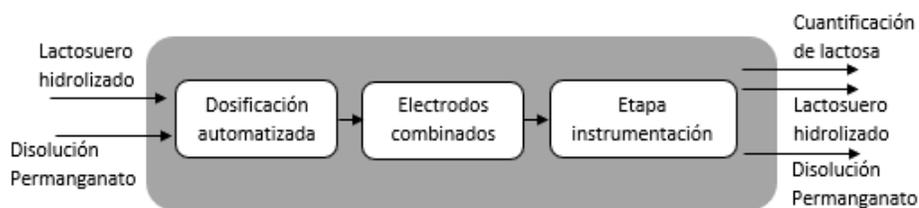


Figura 6-62.: Diseño 7. Caja gris. Fuente: Autor.

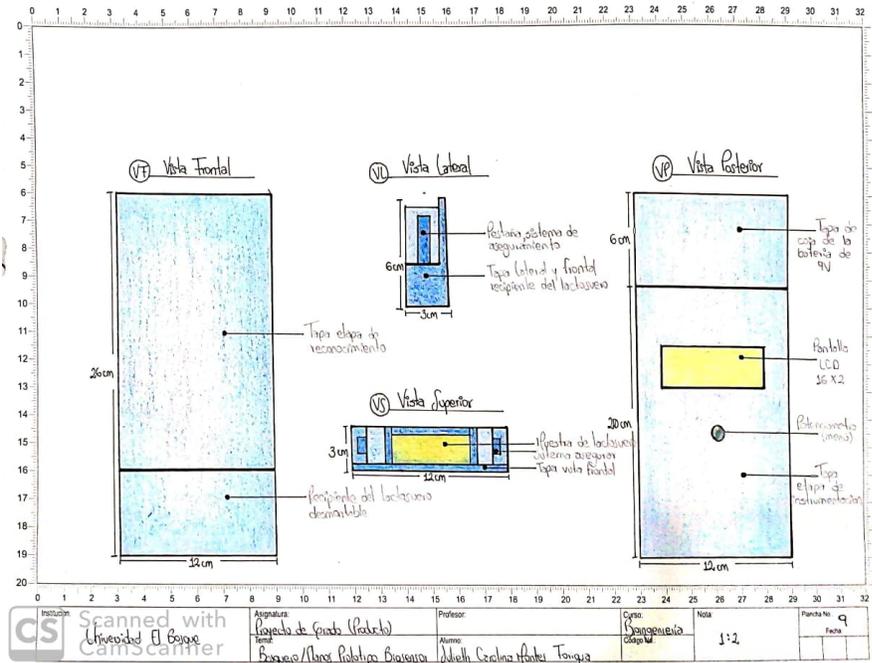


Figura 6-63.: Diseño 7. Diseño conceptual, cara externa. Fuente: Autor.

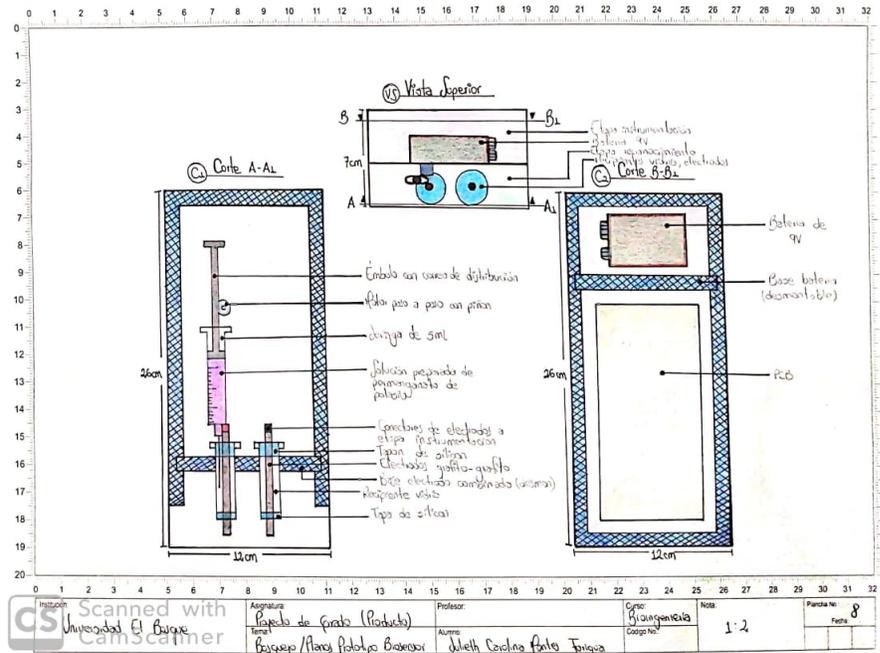


Figura 6-64.: Diseño 7. Diseño conceptual, cara interna. Fuente: Autor.

En el diseño 7 vemos un prototipo compuesto por una estructura integra donde el recipiente que contiene la lactosa es removible, se hace la separación de cada parte del biosensor por paredes que permiten tener la etapa de reconocimiento biológico, etapa de instrumentación y de fuente de alimentación separadas, lo que hace que cada una trabaje tanto individualmente como en conjunto optimizando el funcionamiento del prototipo de laboratorio de biosensor, además este diseño cuenta con una etapa de dosificación automática del agente oxidante permanganato de potasio activada cada vez que se realice una medición donde se deposita esta solución al electrodo de referencia, el dispositivo cuenta con un soporte para los tubos que también es removible en caso de decidir limpiarlo o reemplazar algún componente del electrodo combinado por otro.

La etapa de instrumentación cuenta con una pantalla LCD, y un potenciómetro rotatorio que permite la interacción del usuario con el biosensor mediante un menú de selección de algunas actividades como: dosificación y lectura de la lactosa presente en el lactosuero.

Los requerimientos cumplidos con este diseño son: el producto es compacto lo que permite evitar el deterioro de las piezas y componentes que lo conforman, en este caso los materiales en ningún momento inhiben la reacción desarrollada en cada medición, este diseño al tener una sola estructura integra y tener una fuente de voltaje inalámbrica es portable y de fácil manejo, el prototipo cuenta con tapas removibles por medio de tornillos lo que facilita su mantenimiento y limpieza además de mantener a cada instante los electrodos seguros de rupturas. El diseño del este biosensor lo hace llamativo ya que ofrece una respuesta rápida, una fácil integración de los componentes y es amigable con el usuario brindando una experiencia cómoda y satisfactoria con el servicio que le ofrece.

Cabe mencionar, que este diseño es más eficiente con respecto al diseño 6, ya que su tiempo de respuesta se encuentra dentro de los 8 *min* deseados, porque cuenta con el sistema de dosificación el sistema de visualización e interacción con el usuario y, el sistema de alimentación inalámbrico, todos ellos de manera sintetizada, compacta y específica a la satisfacción de la necesidad del usuario, sin tener que extenderse a sistemas complejos que no son necesarios para este tipo de biosensor y mucho menos aptos para el usuario al que va dirigido.

Luego de la ejecución de los bosquejos y cajas grises de cada diseño planteado, posteriormente, en una matriz de decisión se seleccionó el diseño de la estructura funcional que fue llevado a la ingeniería de detalle. Esta matriz se fundamentó en la evaluación de cada diseño con respecto al cumplimiento de los objetivos calculados a partir de la importancia de los requerimientos técnicos y del cliente dados por el método de calidad QFD (Tabla **6-23**). En la tabla **6-23** se observa la matriz de decisión realizada para evaluar cada diseño conceptual propuesto con respecto a los requerimientos de mayor ponderación y orden de importancia por cumplir, donde el peso total con mayor sumatoria es el que definió qué diseño será llevado a construcción (Dieter & Linda, 2013).

Tabla 6-23.: Matriz de ponderación para la selección del diseño conceptual que mejor cumpla con los requerimientos estipulados por el método QFD. Fuente: Autor.

Requerimientos	Peso relativo (RC / RF)	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
El producto debe ser compacto para impedir el deterioro de los componentes electrónicos	6.2 / 0	5	4	2	2	3	4	5
Los materiales no deben inhibir la reacción entre el lactosuero y el electrodo	6.2 / 0	5	3	2	2	3	4	5
El producto debe ser portable	6.2 / 0	5	5	3	3	3	5	5
Menor tamaño y simplicidad del producto	0 / 5.5	4	5	2	2	3	1	4
La estructura del prototipo debe facilitar el mantenimiento y calibración de cada etapa	6.2 / 0	5	1	5	3	4	4	5
El electrodo combinado debe guardarse en un lugar seguro, para prevenir roturas o riegos	6.2 / 0	5	3	4	3	4	5	5
El diseño del producto debe ser llamativo para el usuario	5.6 / 7.0	4	5	3	3	4	5	5
Tiempo de respuesta de reacción química, componentes electrónicos y programación menor a 8 min	0 / 5.5	4	5	3	3	4	2	5
Integración y automatización de la etapa de reconocimiento e instrumentación	6.2 / 0	2	4	2	2	3	4	5
Peso Total		39	35	26	23	31	34	44

Siendo así, en la Tabla **6-23** se tomaron nueve requerimientos de los cuales todos excepto uno son cumplidos por el diseño siete que fue el escogido con puntuación mayor a los demás diseños, el único requerimiento no cumplido del todo es el de menor tamaño y simplicidad del producto, ya que en este caso lo pasa el diseño dos, pero cabe decir que el diseño dos una vez es realizado su bosquejo es desclasificado, ya que su método de construcción requiere de laboratorios e implementos que están por fuera del alcance del proyecto de grado, lo que sigue haciendo ver al diseño siete como el mejor.

Por otro lado, los diseños tres y cuatro obtuvieron una puntuación de 26 y 23 debido a que son diseños basados en la funcionalidad de una pila galvánica tradicional con puente salino y por ende con materiales delicados y poco confiables, así como su manera de transporte e integración de las etapas en una sola estructura no lo cumplen con lo requerido. Mientras que, los diseños cinco y seis obtuvieron mayor puntuación que el diseño tres y cuatro puesto que estos si tienen las etapas integradas pero sus sistemas de mantenimiento, calibración y automatización no son confiables o no cuentan con esto por tener gran parte de la etapa de reconocimiento manual y de práctica por el usuario; el diseño seis cuenta con sistema de dosificación automático del cofactor y del agua para preparar la solución de este dentro del tubo del electrodo de referencia, sin embargo su sistema es más complejo para el usuario por temas de mantenimiento, portabilidad, tamaño, agitación constante de la solución y que no se veía en la necesidad de hacerlo ya que la solución a preparar dentro del tubo es mínima y el reactivo concentrado no puede estar en estado de almacenamiento por mucho tiempo dentro de una estructura cerrada, según condiciones de seguridad.

El diseño siete, cuenta con la integración de las etapas de reconocimiento e instrumentación, con un sistema de dosificación de la solución del permanganato de potasio (preparada en menor cantidad, más sencilla, fácil de mantenimiento y calibración por parte del usuario) al electrodo de referencia y reducción del tiempo de respuesta por el equipo en general menor a 8 *min*, dando una puntuación final de 44 y siendo el seleccionado.

En la Figura **6-63** se ve el diseño conceptual seleccionado en vistas: frontal, lateral, superior y posterior, donde la vista frontal es la cara de la etapa de reconocimiento dividida en dos secciones: superior-ubicación de los electrodos y sistema de dosificación e inferior-recipiente que contiene 20 *mL* de la muestra de lactosuero residual ya hidrolizado por el agente ácido clorhídrico mediante una dosificación manual. El recipiente es observado en vistas lateral y superior con su respectivo sistema de aseguramiento. Y en la vista posterior, se observa la etapa de instrumentación también seccionada en dos partes: superior-ubicación de la fuente de alimentación inalámbrica e inferior-acoplamiento del circuito electrónico impreso con su respectiva pantalla LCD 16x2 y potenciómetro como seleccionador del menú.

Y en la Figura **6-64** se visualiza la estructura interna del diseño conceptual seleccionado, es decir, las mismas vistas de la anterior figura, pero sin las tapas que protegen del exterior todo el sistema de funcionamiento del prototipo de biosensor. Motivo por el cual, se parte de la vista superior, con dos cortes: en primer lugar, el corte A-A1 donde se ve la etapa de reconocimiento conformada por el electrodo combinado y el sistema de dosificación automático de la solución del cofactor permanganato de potasio; y en segundo lugar el corte B-B1 donde se observa la sección de la fuente de alimentación inalámbrica y la sección del circuito electrónico impreso. De igual manera, cada uno de los bosquejos y vistas del mismo cuentan con la explicación de sus componentes y materiales que inicialmente se plantearon como solución complementaria al diseño conceptual y con los cuales se partió a realizar las matrices de ponderación de sus elementos.

Por otro lado, la Figura **6-62** es la caja gris del diseño seleccionado para llevarlo al detalle, donde se visualiza el sistema de una caja gris cuya entrada son la muestra de lactosuero residual previamente hidrolizado por la concentración estequiométrica de ácido clorhídrico (127.95 mg) y la solución del agente oxidante permanganato de potasio (554.67 mg), para que dentro de la estructura se inicie el proceso de dosificación automática de 1 mL de la solución del cofactor mediante un sistema de deslizamiento del émbolo de una jeringa de 5 mL en un piñón de un motor paso a paso programado al tubo de vidrio del electrodo de referencia.

Luego el electrodo combinado entra en contacto con la reacción química de la muestra de lactosuero residual hasta que se estabiliza el proceso de cuantificación de lactosa; la diferencia de potencial es captada por los electrodos y llevada mediante cable coaxial de la etapa de reconocimiento a la etapa de instrumentación donde se encuentra un circuito amplificador que consta de un amplificador operacional y un acoplamiento de la señal por una placa de desarrollo de Arduino en plataforma Nano programada y alimentada inalámbricamente para expresar el resultado en una pantalla LCD 16×2 ; resultado de la cuantificación de la lactosa considerado como salida, junto con el residuo de la dosificación de la solución del cofactor en el electrodo de referencia y la muestra de lactosuero residual ya evaluada. El equipo es limpiado y acoplado para ser puesto en marcha con una siguiente muestra de lactosuero.

Después de seleccionado el diseño conceptual con su respectiva caja gris que explica cómo esta seccionado la estructura del biosensor y cómo es el funcionamiento de cada sección y en conjunto, se realizó la búsqueda de tres posibles alternativas para cada componente que permitieran el cumplimiento de los requerimientos técnicos, funcionales y de calidad, además del funcionamiento de las etapas del biosensor, las cuales se evaluaron mediante una matriz de decisión, donde la alternativa de solución con mayor calificación fue la escogida (Dieter & Linda, 2013).

Diseño detallado del prototipo de laboratorio

Los resultados para el diseño detallado del prototipo de laboratorio de biosensor parte del modelado, la simulación y los planos técnicos del diseño conceptual seleccionado teniendo en cuenta las dimensiones y distribución de los componentes seleccionados por matrices de decisión (Los resultados de la selección de los componentes hace parte de la metodología Fase III, diseño detallado del prototipo de laboratorio); y la construcción de este diseño presente en CAD a impresión 3D.

Construcción del diseño escogido en el software SolidWorks 2018

El bosquejo del diseño de la estructura del prototipo de laboratorio seleccionado en el diseño conceptual fue llevado a detalle en la presente subfase, para lo cual el bosquejo fue modelado y

simulado en el software SolidWorks 2018 para Windows, teniendo en cuenta las dimensiones de cada pieza, el espacio de ubicación de cada componente y los sistemas de aseguramiento de las piezas a la estructura de partida.

Para ello se plasmó el bosquejo en el CAD con ayuda de las herramientas que este ofrece y de acuerdo a las mediciones dadas inicialmente por el diseño conceptual, sin embargo, para asegurar dichas medidas y los sistemas de aseguramiento, se decide realizar el primer modelo en madera MDF, para lo que se utilizó MDF de 10 mm y de 5 mm, además, de puntillas de 1" sin cabeza y tornillos de 1/2" cabeza plana estrella. De igual forma, a la estructura inicial construida en MDF del prototipo de biosensor se iba acondicionando los componentes de las etapas de reconocimiento e instrumentación, con el objetivo de mirar el espacio y lugar adecuado de la ubicación de estos.



(a) Etapa de reconocimiento con recipiente de la muestra de lactosuero.



(b) Etapa de instrumentación, visualización interna.

Figura 6-65.: Construcción en madera MDF del modelado inicial del diseño. Fuente: Autor.

Durante la construcción del modelo inicial del prototipo de biosensor se realizaron cambios en las mediciones en cuanto a lo largo y ancho, porque anteriormente tenía unos límites dimensionales por encima de lo debido, perdiendo espacio y material. Así mismo, se realizaron cambios en el sistema de acoplamiento del recipiente de la muestra y de la ubicación de la fuente de alimentación.

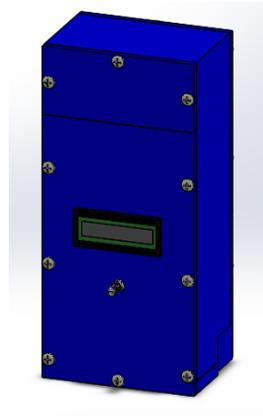
La etapa de reconocimiento cuenta con un electrodo combinado grafito-grafito (permanece vigente el diseño inicial tomado de la búsqueda bibliográfica) (Figura (a) **6-65**), un sistema de dosificación automático por medio del movimiento programado del piñón del motor paso a paso y del émbolo de una jeringa con 5 mL de la solución del cofactor al electrodo de referencia y un recipiente donde se agrega la muestra de lactosuero a evaluar con un sistema de aseguramiento a presión mediante unas

pestañas verticales que encajan del recipiente a la estructura de partida o esqueleto del prototipo de biosensor (Figura (a) 6-65).

La etapa de instrumentación esta dividida en dos secciones, la parte de la fuente de alimentación y la de la instalación del motor paso a paso al circuito electrónico impreso (Figura (b) 6-65).

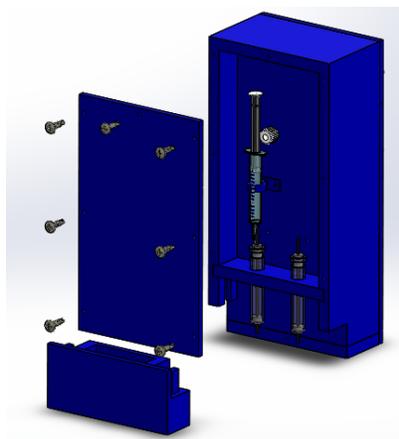


(a) Etapa de reconocimiento, visualización externa.

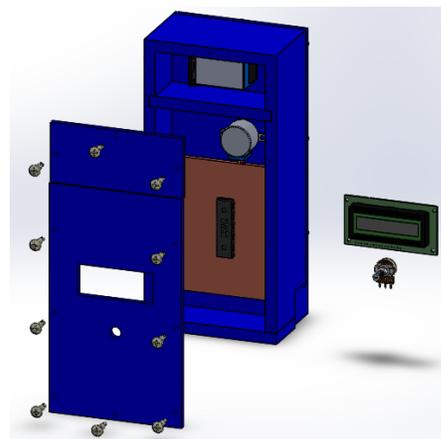


(b) Etapa de instrumentación, visualización externa.

Figura 6-66.: Diseño detallado en SolidWorks 2018 para Windows. Fuente: Autor.



(a) Etapa de reconocimiento, visualización interna.



(b) Etapa de instrumentación, visualización interna.

Figura 6-67.: Diseño detallado en SolidWorks 2018 para Windows. Fuente: Autor.

Este modelo en madera MDF llevó a realizar cambios en el modelo del diseño detallado en el software SolidWorks 2018, dando mayor seguridad de que la impresión 3D será la mejor y de que no habrán cambios y mediciones erróneas en cuanto al desperdicio de material y acoplamiento de los componentes, quedando el diseño detallado definitivo del prototipo de laboratorio de biosensor para su parte exterior e interior (Figura 6-66) (Figura 6-67).

Para su mejor visualización se anexó el video (Ver Anexo G) del ensamble y desensamble del prototipo de laboratorio de biosensor, para verificar que todas sus piezas estuvieran posicionadas correctamente a la estructura de partida y que sus sistemas de aseguramiento fueran los adecuados, por lo que luego de realizada la simulación y extraídos los planos técnicos de cada una de las piezas del prototipo de laboratorio realizadas en SolidWorks. En la Figura 6-68 se observa uno de los planos técnicos obtenidos, mostrado como comprobante de este resultado, los demás planos pueden ser visualizados en el Anexo F.

Una vez finalizado todo el proceso de diseño detallado se decidió llevar a impresión 3D la estructura del biosensor, estos resultados de construcción se explicarán a continuación.

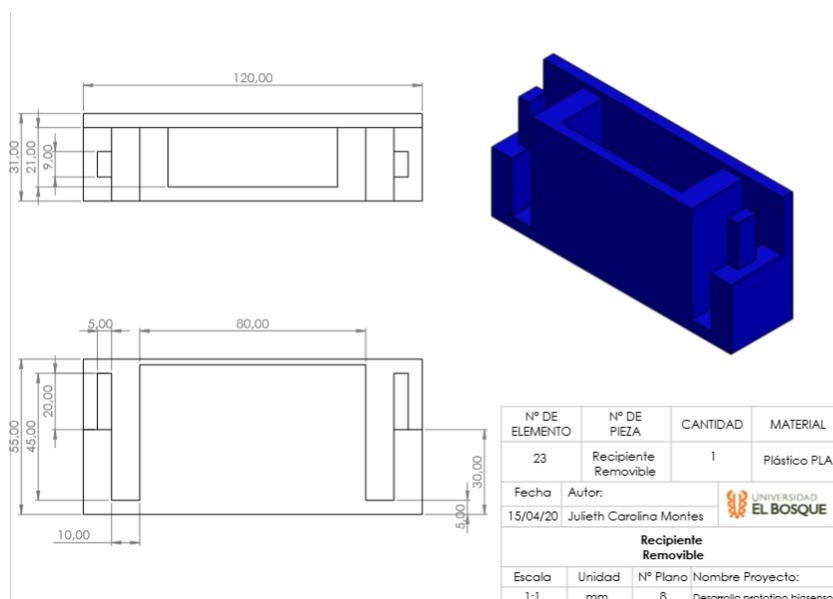


Figura 6-68.: Plano técnico, recipiente removible. Diseño detallado en SolidWorks 2018.
Fuente: Autor.

Construcción del prototipo de laboratorio de biosensor

La impresión 3D de la estructura del prototipo del biosensor constó de 9 piezas en total: 1 estructura

de partida, 1 recipiente de la muestra, 3 divisiones (base electrodos, base división de la sección de la fuente de alimentación y base de la etapa de instrumentación), 3 tapas (etapa de reconocimiento, circuito electrónico impreso y fuente de alimentación) y abrazadera que acopla la jeringa a la estructura de partida.

La impresión salió exitosa, sus piezas y sistemas de acoplamiento cumplieron con las mediciones y funciones requeridas al momento de seleccionarlos en las matrices de decisión del Anexo E, por lo que se acondicionaron a cada una de las etapas de la estructura final del prototipo de biosensor, para dar continuación con el desarrollo y finalización de la etapa instrumental.



(a) Etapa de reconocimiento, visualización interna.



(b) Etapa de instrumentación, visualización externa.

Figura 6-69.: Prototipo de laboratorio. Diseño detallado construido por impresión 3D.
Fuente: Autor.

6.3.3. Diseño en ingeniería de la etapa instrumental

El diseño en ingeniería de la etapa de instrumentación se fundamentó en dos grandes partes, la primera fue el acondicionamiento de la señal donde el resultado es la simulación en el software Proteus y el montaje del sistema de amplificación completo en protoboard y, la segunda fue el procesamiento de la señal que arrojó como resultado el diagrama de flujo de un pseudo-código donde se da a entender el paso a paso de cómo se realizó la programación del sistema de amplificación para la adquisición de la señal y su conversión o regresión lineal en términos de unidades métricas.

Acondicionamiento de la señal útil

En primer lugar se realizó la selección y acoplamiento de cada uno de los componentes electrónicos mediante una matriz de decisión y Proteus Professional 8. La selección de los componentes electrónicos se realizó bajo el método de la matriz de decisión, en donde se evaluó tres alternativas de solución con una calificación de 1 a 5 si cumplía o no con los requerimientos en ingeniería dados en el anteproyecto. Siendo así como se seleccionó en el siguiente orden los componentes: amplificador operacional LM741, batería de 9 V, potenciómetro rotatorio, placa de desarrollo Arduino Nano, sistema de visualización por pantalla LCD 16x2 y placa de montaje en protoboard. En el Anexo E se encuentra al detalle cada una de las matrices de decisión con sus respectivas alternativas de solución y requerimientos a cumplir, como también en el diseño en ingeniería de la Fase III de la metodología.

En segundo lugar, se realizó la simulación del montaje del sistema de amplificación en Proteus, donde se iba colocando cada uno de estos componentes a medida que se iban seleccionando según el orden de importancia a nivel funcional; para finalmente tener la simulación completa.

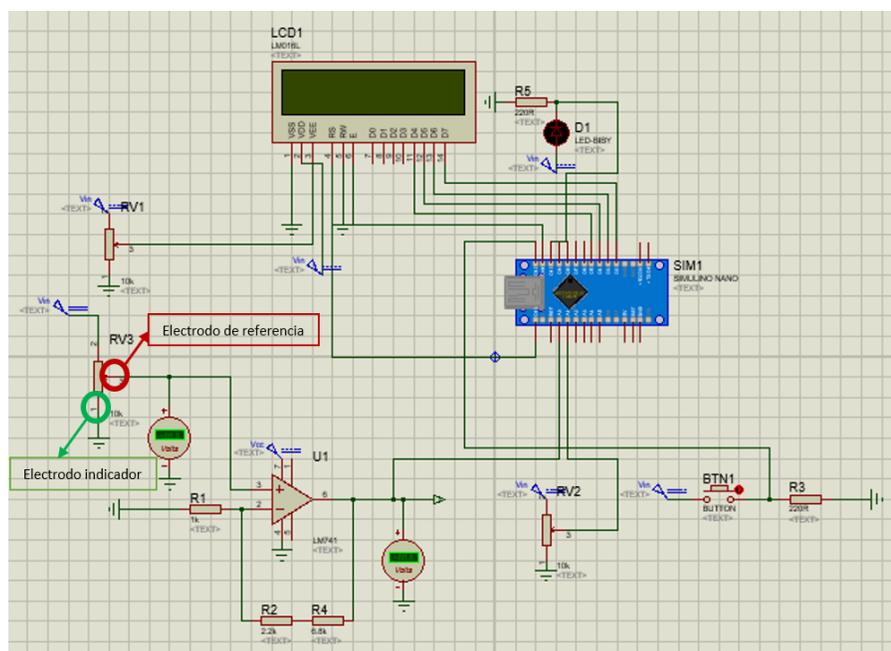


Figura 6-70.: Montaje etapa de instrumentación completa del prototipo de laboratorio de biosensor final en el software Proteus 8 Professional, formato ISIS. Fuente: Autor.

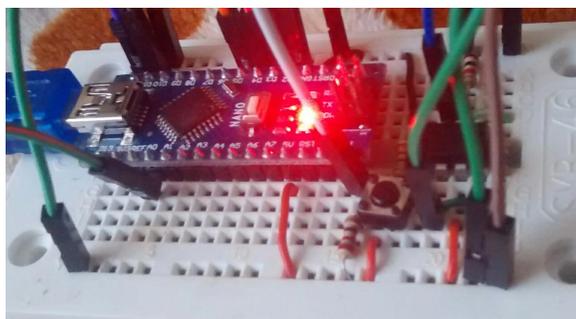
Al momento de seleccionar el sistema de amplificación en primera instancia se idealizó un amplificador operacional inversor, el cual no funcionó porque trabaja con la amplificación de señales senoidales y al momento de medir la entrada y salida del circuito con multímetro, estos datos no eran concordantes con los obtenidos en la pantalla de análisis, teniendo presente que los datos de importancia eran los dados por el multímetro, en donde no se evidenciaba ningún cambio de unidades. Por lo tanto, se seleccionó el amplificador operacional no inversor, puesto que el tema de las ganancias y valores de resistencias a utilizar es similar pero con la diferencia de que dicha señal no se va a encontrar invertida ni desfasada al momento de ser amplificada, al igual que sus potenciales de entrada y salida medidos para los valores del rango de estudio por el multímetro son proporcionales a los cálculos realizados y lo visualizado por la pantalla de análisis.

Todo lo anterior, posiblemente se debe a que la señal que se desea acondicionar previamente ha sido caracterizada y linealizada de manera práctica en laboratorio de acuerdo a relaciones estequiométricas, por lo que lo único que se requiere es que la señal sea amplificada en términos de unidades pero que permanezca igual en términos de linealización, para mejorar la filtración de ruido y hacerla más lineal al momento de programarla. Es por ello que la señal debe ingresar igual al amplificador sin verse interferida por corrientes externas y ser tratada para operar con su ganancia.

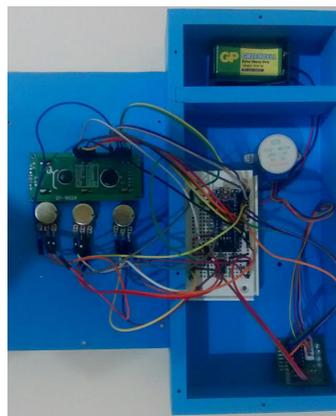
El sistema de amplificación fue un amplificador operacional no inversor con una ganancia de 10 y sus potenciales amplifican del orden de los mV a los V . Por otro lado, sus resistencias adecuadas eran de 1 y 9 $K\Omega$, pero esta última al no ser comercial fue sustituida por dos resistencias en serie de 2.2 $K\Omega$ y 6.8 $K\Omega$, varando el resultado de salida en unidades decimales.

La simulación fue terminada y corroborada de acuerdo a los valores medidos con multímetro, luego fue llevada a protoboard teniendo como guía dicha simulación y teniendo la certeza de que el circuito se encuentra correctamente conectado.

El montaje realizado en físico tuvo que ser montado en protoboard, cuando lo esperado era en una placa para circuito impreso PCB, como lo señalaba la matriz de decisión (Ver Anexo E). Sin embargo, por percances presentados en cuanto a la adquisición del material para impresión del circuito, se optó por la segunda alternativa de solución con mayor ponderación, siendo la protoboard la que se seleccionó. Y por ser la segunda alternativa, cuenta con algunas desventajas como: conexión inestable e insegura de los componentes, fallas continuas en la visualización del resultado e interacción del operario con la interfaz, presentación poco ordenada (cableado de más, confuso y poco ordenado). instrumental.



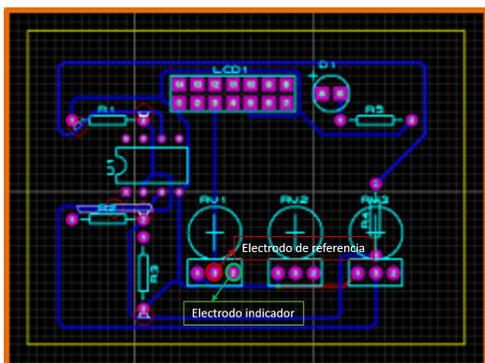
(a) Etapa de instrumentación sola.



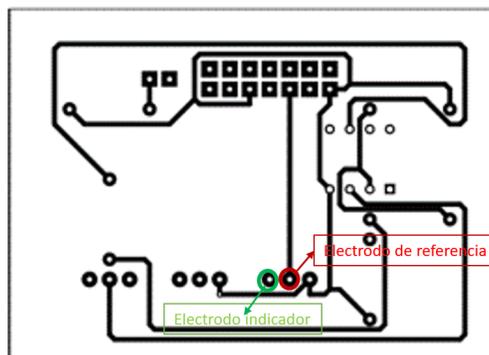
(b) Acoplado a la etapa de instrumentación del prototipo de laboratorio final

Figura 6-71.: Montaje en protoboard del sistema de amplificación de la señal útil. Fuente: Autor.

Razón por la cual, a continuación se planteó el diseño del sistema de amplificación pero en circuito impreso en PCB, realizado en formato ARES mediante el software Proteus, para posteriormente su impresión y acoplamiento.



(a) PCB en Proteus 8, formato ARES.



(b) PCB lista para ser llevada a impresión.

Figura 6-72.: Montaje etapa de instrumentación completa en el software Proteus 8 Profesional, formato ARES. Fuente: Autor.

Procesamiento de la señal útil

Una vez se seleccionó, simuló y montó en protoboard el sistema de amplificación, se realizó la programación en el software de Arduino para procesar la señal proveniente del circuito electrónico en términos de potencial V a mg de lactosa y, así mismo, permitir al usuario interactuar con el biosensor mediante una interfaz presentada en un sistema de visualización-pantalla LCD 16x2. Por ende, se creó el código en Arduino realizando de manera general: inicialización de variables, llamado de librerías, inicializaciones de pines, lectura, mapeo, función condicional switch y dentro de cada caso las respectivas funciones que realizará el menú (mensaje de bienvenida, dosificación y lectura).

Este código es convertido en formato .HEX y llevado a simulación en el software Proteus, con el objetivo de verificar que el circuito electrónico como el código programado en Arduino ejecutaran las funciones deseadas y al llevarlos a la protoboard tuvieran un funcionamiento válido.

En las Figuras 6-73 y 6-74 se puede comprobar el correcto funcionamiento del circuito electrónico como de la programación al momento de integrar lo que se consideró como la etapa de instrumentación del prototipo de laboratorio.

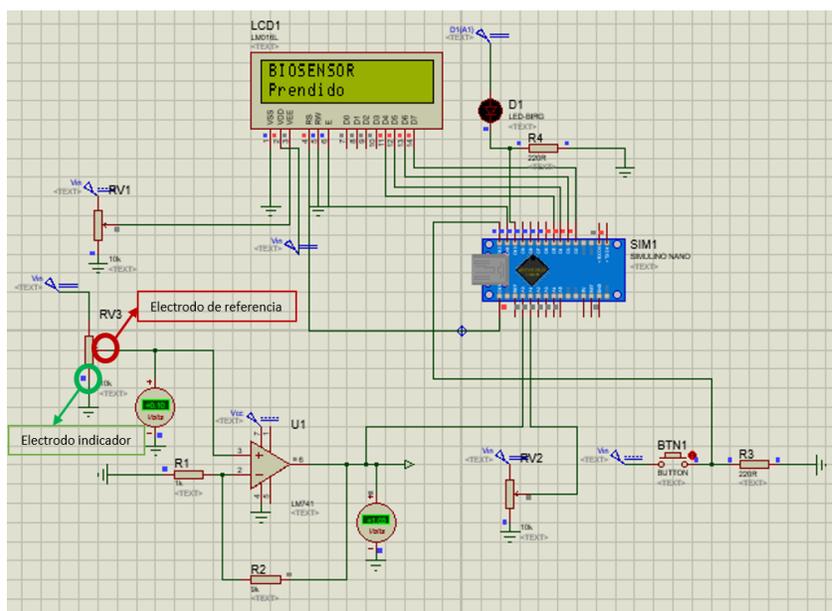


Figura 6-73.: Simulación de la visualización del menú para interacción del biosensor con el usuario, software Proteus Professional 2018, formato ISIS. Fuente: Autor.

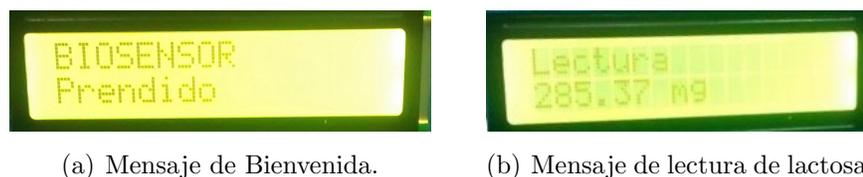


Figura 6-74.: Visualización del menú para interacción del biosensor con el usuario. Montaje en Protoboard de la etapa de instrumentación. Fuente: Autor.

En las Figuras 6-73 y (a) 6-74 se puede observar el funcionamiento del sistema de amplificación junto con la programación en el software de Arduino del menú que es visualizado en la pantalla LCD; en este caso se visualiza el anuncio de inicio del biosensor.

Mientras que en la Figura (b) 6-74, se encuentra el resultado arrojado de la cuantificación de lactosa en términos de mg cuando en el menú se escoge la opción lectura de la muestra de lactosuero. En este caso, la cuantificación mostrada por la pantalla LCD es el resultado de rotar el potenciómetro como simulador de la muestra del vertimiento. Cabe aclarar que al rotar el potenciómetro no son los mismos potenciales de entrada y por ello son diferentes los resultados.

La programación e interfaz con el usuario cumple con los requerimientos en ingeniería planteados desde un principio, sin embargo, para un futuro el sistema puede contar con una interfaz gráfica y un teclado para mejor interacción y menor contacto del operario con los componentes químicos y electrónicos que componen el funcionamiento interno del biosensor. De igual manera, se puede enriquecer el contenido del menú con más opciones como historial, lectura de la muestra según el tipo de lactosuero, calibración del biosensor y otros más.

6.3.4. Montaje y evaluación de la etapa de instrumentación

En esta subsección se trabajó el montaje en protoboard de la etapa de instrumentación y la evaluación del prototipo de laboratorio de biosensor. Como resultado de esto, se obtuvo el montaje completo de la etapa de instrumentación y el acoplamiento de las dos etapas en conjunto a la estructura del prototipo de laboratorio de biosensor, donde es evaluada la etapa de instrumentación y simulado el funcionamiento de la etapa de reconocimiento por medio de un potenciómetro rotatorio, ya que no se cuentan con los agentes químicos y tampoco con la muestra de lactosuero para hacer la evaluación completa del biosensor.

Montaje de la etapa de instrumentación

Habiendo simulado en el software Proteus y adelantado el montaje del sistema de amplificación en protoboard, como su programación, se realizó el montaje y adecuación completa de la etapa de instrumentación en la estructura impresa del prototipo de laboratorio.



Figura 6-75.: Prototipo de laboratorio de biosensor final, cara frontal etapa de instrumentación en Protoboard de la etapa de instrumentación implementado en lactosuero residual. Fuente: Autor.

En la Figura 6-75 se tiene la construcción final del prototipo de laboratorio con sus etapas integradas, en la cara frontal se ve la etapa de instrumentación seccionada por dos compartimientos, de superior a inferior se tiene la sección para la batería y la sección del sistema de amplificación. Además, en la tapa de esta última sección cuenta con tres potenciómetros y un pulsador, de izquierda a derecha se encuentra: el potenciómetro que enciende la pantalla y regula la intensidad de luz, el potenciómetro seleccionador del menú y el potenciómetro simulador de la muestra de lactosuero. Finalmente, en la parte inferior se cuenta con un pulsador que se encarga de encender el sistema de dosificación para llevar a cabo el sistema de dosificación.

Las Figuras 6-76, 6-77 y 6-78, son la evidencia del funcionamiento en conjunto de la etapa instrumental, donde se encuentra acoplado el sistema de amplificación con la estructura del prototipo, en ellas se puede observar las tres opciones que tiene el menú, como son: mensaje de ingreso (Figura 6-76), dosificación (Figura 6-77) y lectura (Figura 6-78) y las cuales son direccionadas por los tres potenciómetros y el pulsador que se observan en estas Figuras.



Figura 6-76.: Visualización primera opción del menú mediante la pantalla LCD ubicada en la etapa instrumental del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor.



Figura 6-77.: Visualización segunda opción del menú mediante la pantalla LCD ubicada en la etapa instrumental del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor.



Figura 6-78.: Visualización tercera opción del menú mediante la pantalla LCD ubicada en la etapa instrumental del prototipo de laboratorio. Fuente: Autor.

Teniendo el prototipo de laboratorio de biosensor construido en su totalidad se puede confirmar la importancia de realizar un diseño en ingeniería desde la búsqueda bibliográfica de información, levantamiento de requerimientos, diseño conceptual, realización de matrices de decisión, diseño detallado hasta la construcción y acoplamiento del prototipo; debido a que con todo esto una vez se realiza cada uno de estos procesos de manera rigurosa y no se requiere de corregir o volver a realizar todo desde un comienzo, ya que se va progresando de manera segura y razonable, bajo unos criterios y métodos sólidos.

Evaluación de la etapa de instrumentación

La etapa de instrumentación es evaluada a partir del funcionamiento del sistema de amplificación y de la programación en conjunto cuando los electrodos combinados entran en contacto con la muestra de campo del lactosuero residual. Pero como no se tiene al alcance la muestra y tampoco los agentes químicos, se decide simular la etapa de reconocimiento mediante un potenciómetro rotatorio.

La evaluación de la etapa consistió en tomar los rangos de estudio o los rangos límite de potencial medidos por el biosensor y proporcionarlos al sistema de amplificación a través de la rotación del potenciómetro, visualizando en un tiempo de retraso de 3 *seg* máximo el resultado de la cantidad de lactosa presente en la supuesta muestra, como se observa en la Figura 6-79.



(a) Lectura lactosa sin alarma.

(b) Lectura lactosa con alarma.

Figura 6-79.: Prototipo de biosensor para la cuantificación de lactosa. Diseño detallado construido por impresión 3D. Fuente: Autor.

Los resultados arrojados por la pantalla LCD 16x2 son ubicados en una tabla y representados gráficamente en Excel. Los rangos de potencial evaluados son 100 *mV*, 200 *mV*, 300 *mV*, 400 *mV* y 500 *mV*, y los resultados en términos de cantidad de lactosa proporcionados por la etapa instrumental del prototipo de laboratorio son los siguientes:

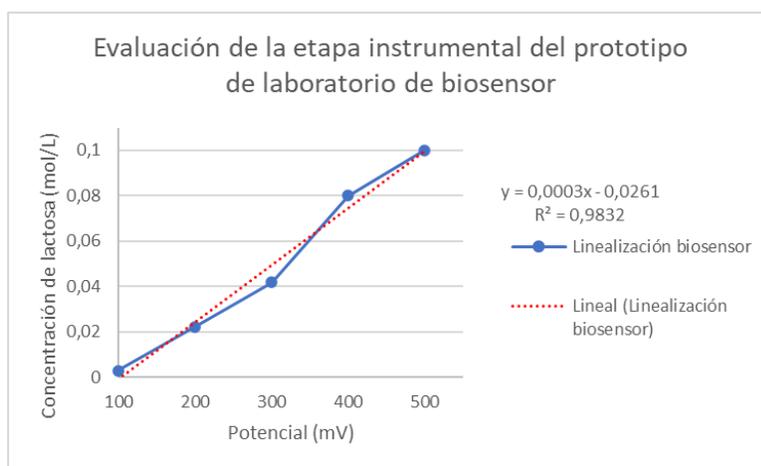


Figura 6-80.: Evaluación de la etapa de instrumentación a partir de la simulación del lactosuero residual mediante la rotación de un potenciómetro.

Tabla 6-24.: Evaluación de la etapa de instrumentación a partir de la simulación del lactosuero residual mediante la rotación de un potenciómetro. Fuente: Autor.

Potencial (mV)	Concentración de lactosa (mg)(mol/L)
100	20.59 (0.0030)
200	152.98 (0.0223)
300	285.37 (0.0417)
400	550.14 (0.0800)
500	682.53 (0.1000)

En la Tabla **6-24** se puede observar los potenciales que se sometieron a evaluación dentro del rango límite del biosensor, el cual es de 100 mV a 600 mV y las cantidades de lactosa resultantes en términos de mg , así como su concentración de lactosa en mol/L . Estos datos fueron corroborados con el desarrollo de la ecuación de regresión lineal escrita en la programación, encontrándose dos datos por fuera de la linealización, estos datos son la concentración de lactosa para 400 mV y 500 mV , ya que con la medición del biosensor dieron 0.0800 mol/L y 0.1000 mol/L y los datos correctos eran 0.0619 mol/L y 0.0803 mol/L .

Esto se puede observar de mejor manera con la gráfica lineal de la Figura **6-80**, en donde se evidencia la varianza de los datos con respecto a la línea de tendencia y se corrobora con el coeficiente de correlación el cual es de 0.9832.

El error con respecto a las mediciones por fuera de la linealización posiblemente se debe a la calibración del potenciómetro, ya que esto mismo ocurrió cuando se simuló el sistema de amplificación en Proteus, por lo cual se recomienda revisar la calibración de este componente o usar un potenciómetro trimmer con mayor posibilidad de calibración y posicionamiento en resultados menos variantes. Y así es como se llega a validar que la etapa de instrumentación del biosensor cuenta con un porcentaje de confiabilidad del 98.3%, cumpliendo con uno de los objetivos planteados a partir de la matriz QFD, por lo que este diseño, montaje y construcción de la etapa de instrumentación aprueba la evaluación para su uso en el prototipo de laboratorio.

6.3.5. Montaje y programación del sistema de dosificación de la solución del agente oxidante

El sistema de dosificación de la solución del cofactor al electrodo de referencia de acuerdo a las matrices de decisión presentes en el Anexo E esta conformado por los siguientes componentes: un motor paso a paso con un piñón en su eje, una jeringa de 5 *mL* con aguja y en su émbolo con una correa de distribución de impresora, como se observa en la siguiente figura:

En la Figura 6-82 se encuentra el prototipo de laboratorio de biosensor final en vista isométrica, donde la parte frontal pertenece a la etapa de reconocimiento, la cual se observa dividida en dos compartimientos: superior e inferior. El superior es donde se encuentra el sistema de dosificación y el electrodo combinado, y el inferior es el recipiente donde se agrega y prepara la solución del lactosuero a estudiar, el cual está asegurado a la estructura principal del prototipo de laboratorio.

Mientras que en la Figura 6-81 se observa que el sistema de dosificación ingresa al electrodo de referencia por medio de una aguja, la cual permite el llenado del electrodo de 1 *mL* de la solución del agente oxidante cada vez que se requiera medir una muestra de lactosuero residual. Para ello, el sistema debió contar con una caracterización del motor paso a paso donde por cada 1024 pasos el émbolo recorre 10 *mm* y por ende, desocupa de la jeringa 1 *mL* de la solución. Además, de que el prototipo de laboratorio de biosensor cuenta con un menú manejado por tres potenciómetros y un pulsador donde se debe seleccionar la opción prender equipo, dosificar, ejecutar y luego realizar lectura de la muestra; la programación de este sistema se encuentra unido al diagrama de flujo de la etapa de instrumentación que se explicó en la subfase 6.3.3 de la sección de resultados.



Figura 6-81.: Sistema de dosificación automático, etapa de reconocimiento, prototipo de laboratorio de biosensor, visualización interna. Fuente: Autor.



Figura 6-82.: Sistema de dosificación automático, etapa de reconocimiento, prototipo de laboratorio de biosensor, visualización externa.

Sin embargo, el sistema únicamente cuenta con el sistema de dosificación y no de eliminación del residuo líquido de manera automática, para este caso se debe manualmente retirar el tapón de silicón de la parte inferior del tubo del electrodo de referencia y dejar caer el residuo de la solución en el recipiente de la muestra.

Conclusión Fase III

La tercera fase o tercer objetivo específico llega a su terminación con la evaluación de los requerimientos en ingeniería mediante el método QFD, la realización de matrices de decisión para la selección de los componentes, bosquejos y cajas grises de los diseños conceptuales propuestos para la construcción de la estructura del prototipo de laboratorio; modelado, planos técnicos y video de la vista explosionada de la estructura llevada a detalle, así como también la construcción por impresión 3D y acoplamiento de esta junto con los componentes de la etapa de reconocimiento y etapa instrumental. Al igual se obtuvo de este objetivo la programación y pseudocódigo (diagrama de flujo) de la etapa instrumental y del sistema de dosificación; finalizando con la evaluación de la etapa de instrumentación una vez se tiene el prototipo de laboratorio final. Por lo que se sugiere ir al Anexo I y visualizar el video de funcionamiento del prototipo final diseñado, construido, programado e implementado.

6.4. Fase IV. Formulación de un protocolo de evaluación del funcionamiento del biosensor

6.4.1. Introducción del protocolo a formular

Se considera el protocolo de evaluación del funcionamiento del prototipo de biosensor como el conjunto de actividades que describan cómo realizar las mediciones, qué mediciones se esperarían y cómo adquirir la información de la respuesta de las etapas integradas del biosensor, todo con la finalidad de evaluar el desempeño del equipo; siendo este una tecnología que le apuesta a la innovación con biosensores electroquímicos, puesto que en la actualidad no se cuentan con biosensores que cuantifiquen lactosa en aguas residuales y con esta evaluación se puede dar paso al mejoramiento del biosensor para su comercialización. Es por lo mismo que dicho protocolo debe seguirse paso a paso y es necesario realizar la unificación de criterios para implementar un sistema práctico de evaluación de desempeño de este.

Para llevar al desarrollo del protocolo, se requiere de establecer información que debe ser tomada en cuenta como: pruebas de validación, estado de los componentes del equipo y recomendaciones. Además, las pruebas que se plantean fueron diseñadas exclusivamente para la evaluación de este prototipo y no pueden ser aplicadas para ningún otro tipo de biosensor, puesto que son realizadas de acuerdo a su diseño de construcción.

Por lo tanto, las pruebas propuestas surgen de la agrupación de los requerimientos en ingeniería y funciones para cada etapa del biosensor, además de tener en cuenta: variables de medida del equipo, intervalos de medida y de trabajo, número de valores a medir y número de repeticiones.

Una vez es implementado el protocolo y se desarrolladas las pruebas en conjunto y para cada etapa del biosensor, se debe analizar los resultados y generar un reporte cuantitativo y cualitativo sobre el estado y desempeño de este para generar finalmente un reporte que permita conocer los resultados obtenidos y saber si estos están acorde o no a lo deseado, es decir si presentan un error y poder entender cómo solucionarlo. El reporte final se debe realizar en Excel, teniendo como guía los resultados con los que se fabricó el prototipo de laboratorio los formatos de inventario también se encuentran allí (Ver Anexo H).

6.4.2. Validación de la etapa de reconocimiento biológico

El protocolo para la validación de la etapa de reconocimiento a nivel general se explica a continuación en el diagrama de flujo de la Figura 6-83, donde se da a conocer el orden del proceso a llevar a cabo.

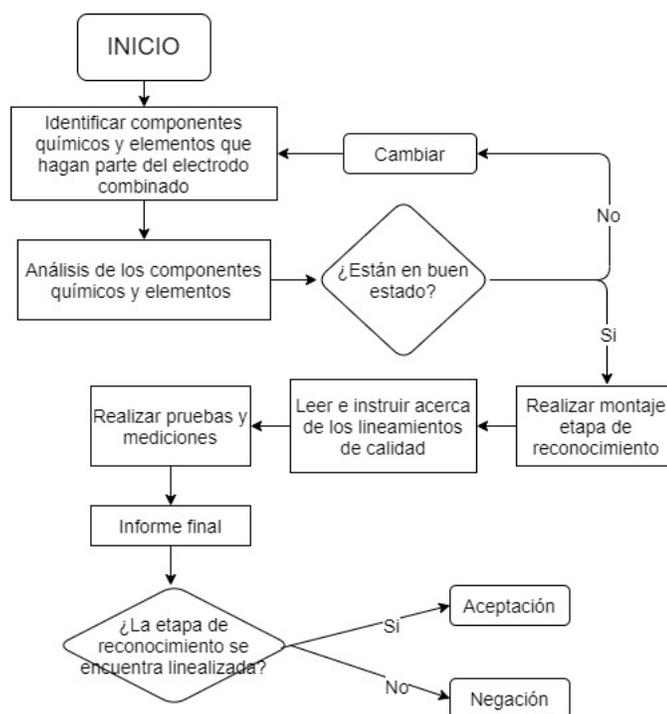


Figura 6-83.: Diagrama de flujo, protocolo de validación de la etapa de reconocimiento biológico. Fuente: Autor.

Inventario de los componentes

En primer lugar, se debe realizar el diligenciamiento del formato indicado en la Figura 6-84, el cual contiene la lista de los componentes necesarios, sus cantidades, sus especificaciones y observaciones. Con la finalidad de corroborar el estado de los componentes que serán sometidos a validación (Ver Anexo H).

Inventario y análisis de los componentes de la etapa de reconocimiento				
Componente	Cantidad requerida	Cantidad real	Especificaciones	Observaciones
Muestra de lactosuero	20 mL		Refrigerada a 4°C	
Vaso de precipitado	2 ud		Volumen de 50 mL	
Tubo de vidrio electrodo	2 ud		Limpio y desinfectado	
Electrodo grafito	2 ud		Sin fisuras	
Tapones de silicón	4 ud		Aseguren sellamiento completo	
Agua de la llave	20 mL		Incolora e inodora	
Permanganato de potasio	1 mL		Fecha vencimiento no alcanzada	
Ácido clorhídrico	1 mL		Fecha vencimiento no alcanzada	

Figura 6-84.: Formato inventario de los componentes de reconocimiento biológico. Fuente: Autor.

Plan de pruebas funcionales para validación

La evaluación de la etapa de reconocimiento, parte de tres triplicados durante tres días, donde cada triplicado esta compuesto por tres réplicas de la muestra de lactosuero residual con una concentración incógnita de lactosa.

El montaje consiste en: tomar 20 mL del lactosuero campesino y agregarle 5.32 mg de ácido clorhídrico en un vaso de precipitado de 50 mL, disolverlo con una espátula cuchara y dejarlo actuar por 3 min. Al mismo tiempo, en otro vaso de precipitado de 50 mL se adicionan 20 mL de agua de la llave con 23.07 mg del agente oxidante permanganato de potasio, se diluye y se agrega 1 mL de esta solución al tubo de vidrio del electrodo de referencia, se sella con la tapa en silicón y se coloca el electrodo combinado (grafito-grafito) en la solución de lactosuero preparado. Luego, con el multímetro se mide los voltajes dados por la oxidación de la solución en milivoltios.

El procedimiento mencionado se repitió para las cantidades de los agentes químicos dadas por la tabla estequiométrica realizada en la sección 5.1.2. (Ver Tabla 5-1). Los valores arrojados durante el estudio de lineamiento de control de calidad analítico deben ser ubicados en tablas y gráficas en Excel según el día de la medición de cada triplicado, y con estas se debe realizar el análisis estadístico ANOVA.

En el formato de evaluación de la etapa de reconocimiento se ubican los datos pedidos por el análisis estadístico, se comparan con los datos de referencia e interpreta los resultados de acuerdo al cumplimiento o no de los requerimientos en ingeniería para la etapa (Ver Anexo H).

6.4.3. Validación de la etapa de instrumentación

Para realizar la validación de la etapa de instrumentación, se seccionó esta en dos partes, en la evaluación del electrodo combinado o transductor y en la evaluación del sistema de acondicionamiento y procesamiento de la señal útil. Ambas etapas parten de dos procesos básicos como son: inventario de los componentes y plan de pruebas para validar cada parte de esta etapa. Sin embargo, el proceso interno de validación difiere para cada caso.

Validación del funcionamiento del transductor

La validación del transductor o más conocido como electrodo combinado consiste en la identificación y análisis de los componentes del electrodo mediante un formato, en caso de que no estén en buen estado se deben cambiar y en caso de que sí lo estén se proseguir con el plan de pruebas funcionales basados en lineamientos de control de calidad. El resultado es analizado mediante el método estadístico ANOVA y con sus datos se diligencia el formato de evaluación final.

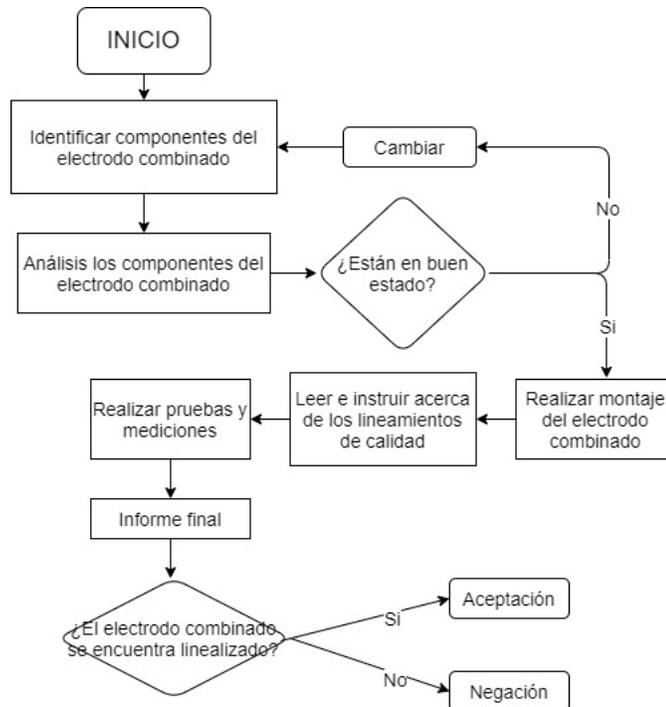


Figura 6-85.: Diagrama de flujo, protocolo de validación del electrodo combinado acoplado al transductor. Fuente: Autor.

Inventario de los componentes

Para este caso, se utiliza el mismo formato de inventario que para la etapa de reconocimiento, puesto que los componentes a evaluar son los mismos pero con variabilidad de la parte de estudio como de la sección (Ver Anexo H).

Inventario y análisis de los componentes del electrodo combinado				
Componente	Cantidad requerida	Cantidad real	Especificaciones	Observaciones
Muestra de lactosa	Tabla estequiométrica		Refrigerada a 4°C	
Vaso de precipitado	2 ud		Volumen de 50 mL	
Tubo de vidrio electrodo	2 ud		Limpio y desinfectado	
Electrodo grafito	2 ud		Sin fisuras	
Tapones de silicón	4 ud		Aseguren sellamiento completo	
Agua de la llave	20 mL		Incolora e inodora	
Permanganato de potasio	1 mL		Fecha vencimiento no alcanzada	
Ácido clorhídrico	1 mL		Fecha vencimiento no alcanzada	

Figura 6-86.: Formato inventario de los componentes que conforman el transductor. Fuente: Autor.

Plan de pruebas funcionales para validar el funcionamiento del transductor

Se lleva a cabo la caracterización del transductor (grafito-grafito) que permite transformar la señal generada por la reacción química, en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa.

Razón por la cual, se realiza un análisis estadístico, partiendo de lineamientos de control de calidad analíticos en el orden científico y experimental, como lo es con la obtención, procesamiento y análisis de datos en milivoltios a partir de dos lineamientos principales: triplicados y réplicas.

Por ello, el procedimiento para llevar a cabo el análisis estadístico, consiste en realizar tres triplicados o tres tomas de mediciones en diferentes días, donde cada triplicado se fundamenta en la toma de mediciones consecutivas o réplicas para la misma concentración de lactosa en tres vasos de precipitado de 50 mL y, usando el montaje inicial del electrodo combinado se miden los valores en términos de voltaje con la implementación instrumental del multímetro (ver Figura 5-8).

Cada muestra para la toma de datos y su posterior análisis estadístico fue montada de acuerdo a la relación estequiométrica de los componentes químicos ya establecidos para cada concentración de lactosa (de 50 mg a 500 mg) (ver Tabla 5-1).

Por ende, el montaje se ejecuta de la siguiente manera: se toman 20 mL de agua de la llave con 50 mg de lactosa pesados por una balanza digital, y adicionados a un vaso de precipitado de 50 mL; a continuación se agrega 5.32 mg de ácido clorhídrico, se disuelve con una espátula cuchara

y se deja actuar por 3 min. Mientras tanto, en otro vaso de precipitado de 50 mL se adicionaron 20 mL de agua de la llave con 23.07 mg del agente oxidante permanganato de potasio, se diluye y se agrega 1 mL de esta solución al tubo de vidrio del electrodo de referencia, se sella y coloca el electrodo combinado (grafito-grafito) en la solución de lactosa preparada. Posteriormente, se miden los voltajes dados por la oxidación de la glucosa con ayuda del multímetro, registrando los respectivos valores en milivoltios.

Luego de haber registrado las mediciones dadas por el multímetro, se realiza en Excel tablas y curvas de calibración para cada triplicado, y sus datos son puestos en un formato de evaluación donde se analiza la varianza entre los valores de voltaje obtenidos por las mediciones de los electrodos en presencia de reacciones químicas, mediante regresión lineal (Ver Anexo H).

Validación del acondicionamiento y procesamiento de la señal útil

A continuación se indican los diagramas de flujo a seguir para corroborar el funcionamiento del sistema de amplificación y de programación de la señal de salida, con el objetivo de permitir la interacción del usuario con respecto a las diferentes opciones presentadas en un menú y mejor linealización de los datos adquiridos después de acoplar dicho sistema.

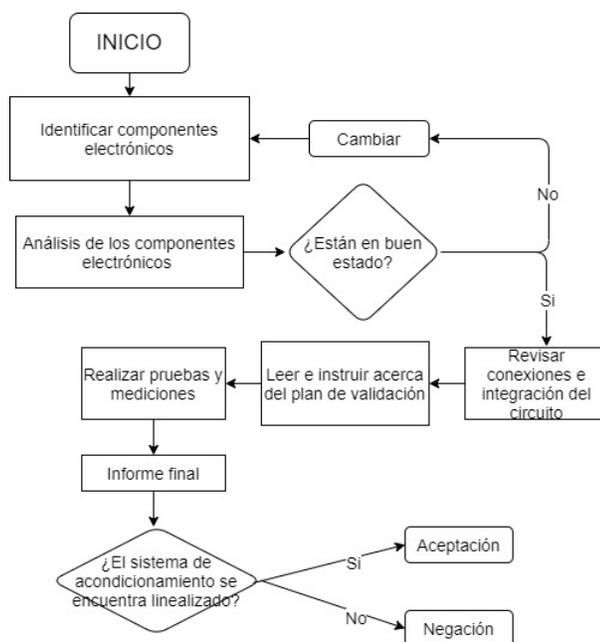


Figura 6-87.: Diagrama de flujo, protocolo de validación del sistema de acondicionamiento de la señal útil. Fuente: Autor.

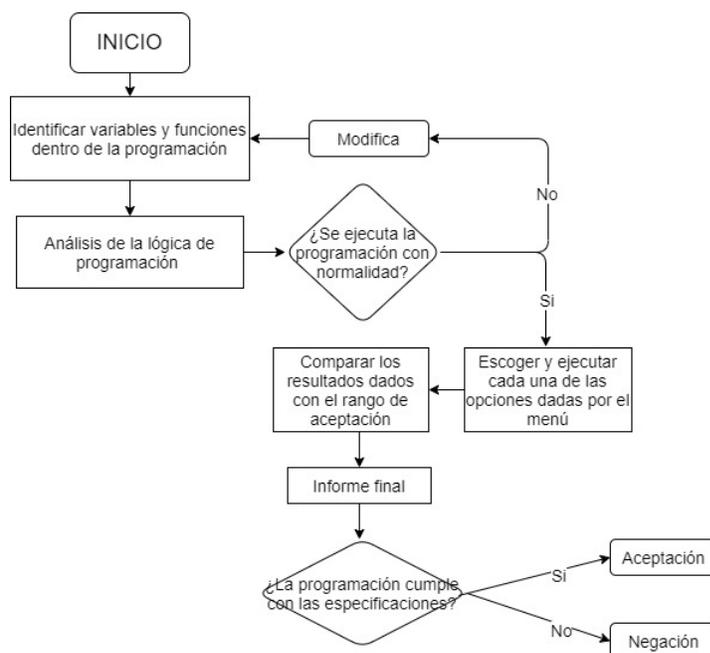


Figura 6-88.: Diagrama de flujo, protocolo de validación del sistema de procesamiento de la señal útil. Fuente: Autor.

Inventario de los componentes

Inventario y análisis de los componentes para el acondicionamiento de la señal útil				
Componente	Cantidad requerida	Cantidad real	Especificaciones	Observaciones
PCB	1		Estado corrosión	
LM741	1		Comprobar el paso de corriente	
Resistencia 220 ohm	2		Permita el funcionamiento de LCD y pulsador	
Resistencia 1 Kohm	1		Cumpla con el AO no inversor	
Resistencia 10 Kohm	1		Cumpla con el AO no inversor	
Pulsador	1		Tenga contacto correcto al oprimir	
Potenciómetro 10 Kohm	3		Incolora e inodora	
Pantalla LCD 16X2	1		Fecha vencimiento no alcanzada	
Arduino Nano	1		Fecha vencimiento no alcanzada	

Figura 6-89.: Formato inventario de los componentes que conforman el sistema de ampli-ficación de la etapa de instrumentación. Fuente: Autor.

Inventario y análisis de los componentes para el procesamiento de la señal útil				
Componente	Cantidad requerida	Cantidad real	Especificaciones	Observaciones
Software Arduino	1		Actualizado y con librerías requeridas	
PCB	1		Estado corrosión	
LM741	1		Comprobar el paso de corriente	
Resistencia 220 ohm	1		Permita el funcionamiento de LCD y pulsador	
Resistencia 1 Kohm	1		Cumpla con el AO no inversor	
Resistencia 10 Kohm	1		Cumpla con el AO no inversor	
Pulsador	1		Tenga contacto correcto al oprimir	
Potenciómetro 10 Kohm	3		Incolora e inodora	
Pantalla LCD 16X2	1		Fecha vencimiento no alcanzada	
Arduino Nano	1		Fecha vencimiento no alcanzada	

Figura 6-90.: Formato inventario de los componentes que conforman el sistema de acondicionamiento de la etapa de instrumentación. Fuente: Autor.

Para llevar a cabo el plan de validación de la etapa de instrumentación, en primer lugar se debe realizar la verificación de los componentes, sus cantidades, cumplimiento de las especificaciones y observaciones de los componentes electrónicos y del orden y funciones de programación del biosensor. Diagrama que para esta parte del biosensor es de suma importancia, ya que se debe contar y estar seguros de que estos componentes estén completos en cantidad, instalados adecuadamente y funcionando sin interrupciones (Ver Anexo H).

Plan de pruebas funcionales para validación

El procedimiento para la cuantificación de lactosa directamente del lactosuero residual de la industria láctea (simulado con potenciómetro rotatorio) consiste en tomar el montaje realizado en protoboard, proporcionarle una fuente de alimentación con una batería de 9 V, prender la pantalla LCD, elegir la opción del menú a ejecutar y seleccionarlo. Esa opción empezará su curso y el potenciómetro vareador de potencial debía ser rotado según rango de estudio de la lactosa (100 mV a 600 mV), pasando dicho potencial por el sistema amplificación no inversor y llegando a la placa de desarrollo Arduino Nano donde internamente es convertido a concentración de lactosa (mol/L) y luego a cantidad de lactosa (mg), siendo finalmente llevado a visualización por medio de la pantalla LCD 16x2.

Los datos visualizados deben ser registrados en una tabla y representados en una gráfica de potencial en función de concentración de lactosa en Excel, además de ser comparados con los datos guía que se tienen en este formato de validación (Ver Anexo H).

6.4.4. Evaluación de las etapas en conjunto

Para dar por culminado el desarrollo del prototipo de biosensor detector de lactosa y la puesta en funcionamiento del mismo, se debe someter a diversas muestras de lactosuero residual de diferentes industrias lácteas, ya que es un proyecto de grado en modalidad producto.

Previo a la evaluación integra de las dos etapas que conforman el prototipo de biosensor que cuantifica lactosa, se debe realizar la ficha técnica para dos tipos de lactosuero residual (como son los residuos generados luego de la producción de queso campesino y queso doble crema), a partir de la medición de algunos parámetros fisicoquímicos como lo son: temperatura ($^{\circ}C$), pH y acidez ($^{\circ}D$), a través de un potenciómetro y una titulación.

La titulación para determinar los grados Dornic del respectivo lactosuero residual, consiste en tomar 10 *mL* de la muestra de lactosuero en un vaso de precipitado de 50 *mL* y evaluarla con hidróxido de sodio (*NaOH*) a una concentración de 0,1 *N* contenido en una bureta y en presencia de fenolftaleína como indicador por medio de una pipeta de Pasteur. Una vez la coloración de la solución resultante tiene viraje a rosa pálido se multiplica por 10 los mililitros utilizados de hidróxido de sodio, obteniendo así los grados Dornic de ácido láctico presentes en la muestra.

Razón por la cual, se debe ir a la industria láctea y tomar las muestras de lactosuero residual, teniendo en cuenta que se debe llevar una botella plástica estéril de 250 *mL* y la recolección de la muestra debe realizarse dentro de esta misma agua con ayuda de unos guantes de nitrilo, un tapabocas, un gorro y una bata. Una vez se toma la muestra de ambos tipos de lactosuero residual en la botella, estas deben ser llevadas a almacenamiento en un refrigerador portátil con temperatura aproximada 4 $^{\circ}C$ durante un periodo máximo de tres días antes de que alcancen una fermentación mayor y su acidez afecte las mediciones realizadas, dando potenciales (*mV*) fuera del rango de detección por del prototipo de biosensor. Como guía, a continuación se presenta la ficha técnica para queso campesino y doble crema:

Tabla 6-25.: Ficha técnica lactosuero residual queso campesino. Fuente: Autor.

Temperatura ($^{\circ}C$)	pH (adimensional)	Acidez ($^{\circ}D$)
28.6	5.42	17

Tabla 6-26.: Ficha técnica lactosuero residual queso doble crema. Fuente: Autor.

Temperatura ($^{\circ}C$)	pH (adimensional)	Ácidoz ($^{\circ}D$)
29.1	6.75	19

De acuerdo a las fichas técnicas de los lactosueros residuales provenientes del queso campesino (Tabla 6-25) y doble crema (Tabla 6-26), se observa que para llevar a cabo la producción de queso doble crema, sus componentes deben estar sometidos a mayor temperatura que con respecto al queso campesino y, así mismo, se puede observar en su acidez que el queso campesino contiene menos ácido láctico que el doble crema, lo que influye de manera directamente proporcional la medición de la concentración de lactosa por el prototipo de biosensor, ya que si su acidez es alta, su fermentación será más rápida y, por ende el valor de lactosa será mayor y cercano o igual al límite permisible de lactosa en los vertimientos de las industrias lácteas (400 mg de lactosa).

Por otro lado, teniendo las muestras de lactosuero residual refrigeradas, se procede a realizar el montaje para evaluar el funcionamiento íntegro de las etapas de reconocimiento e instrumentación. Para lo cual, primero se debe finalizar la construcción de la etapa de instrumentación al 100% (circuito electrónico diseñado en ARES, impreso, soldado y programado). Para ello, se guarda el archivo del circuito electrónico en formato ARES por medio del software Proteus 8 Professional, en donde se edita y modifica algunos caminos de corriente que conectan entre sí los componentes del circuito electrónico, teniendo en cuenta la pautas para impresión casera de circuitos electrónicos.

Después de tener la etapa de instrumentación diseñada, impresa, soldada y programada; esta debe ser acoplada a la estructura de la etapa de instrumentación, con la finalidad de poder adquirir la señal electroquímica, amplificarla y llevarla de analógica a digital para poder ser visualizada en términos de concentración de lactosa pura (mol/L).

Posteriormente, se procedió a realizar las pruebas de validación del prototipo de biosensor detector de lactosa en el lactosuero residual de una industria láctea del municipio de Sopó. Para lo cual: en primer lugar se realizó la preparación de la muestra de lactosuero a evaluar, colocándose 20 mL del mismo en el recipiente destinado a las muestras del biosensor, 127,95 mg del agente oxidante ácido clorhídrico, agitándose y dejándose actuar por 5 min (tiempo de estabilización de la reacción química); en segundo lugar el prototipo de biosensor es encendido y en la opción menú se activa la dosificación automática de la solución del cofactor (554,67 mg) al electrodo de referencia (1 mL) y se continúa con la opción lectura de la muestra; en tercer lugar se acopla el recipiente a la estructura de la etapa de reconocimiento, en donde el electrodo combinado se sumerge en la muestra e interacciona oxidando la solución incógnita de lactosuero y permitiendo que los electrodos grafito-grafito capten la diferencia de potencial generado por electrones libres; en cuarto lugar, se visualiza

en la pantalla LCD la concentración de lactosa detectada en la muestra de lactosuero por medio de las etapas de reconocimiento e instrumentación y; en último lugar se retira el recipiente destinado para las muestras con la solución del lactosuero evaluado, se retira la tapa inferior del electrodo de referencia dejando que el reactivo pase al recipiente para ser depositado en un envase destinado para los desechos químicos. Una vez utilizado el biosensor, es limpiado y dejado en su lugar cada una de las partes que lo componen. Cabe aclarar que el biosensor es alimentado por una batería de 9 V, de manera inalámbrica y recargable.

Finalmente, a continuación se dejan planteadas las ecuaciones para la evaluación de sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión del biosensor.

La fórmula exactitud es la siguiente:

$$Exactitud = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN} \quad (6-1)$$

La fórmula precisión es la siguiente:

$$Precision = \frac{VP}{VP + FP} \quad (6-2)$$

Para determinar la sensibilidad y especificidad del prototipo de laboratorio de biosensor se fabrica una matriz donde se resumirán los valores de pruebas de resultado positivo y negativo relacionados con mediciones verdaderas y falsas obteniendo lo siguiente:

	Medición verdadera	Medición falsa
Prueba Positiva	a	b
Prueba Negativa	c	d

Figura 6-91.: Matriz sensibilidad y especificidad. Fuente: Autor.

Donde a es el valor de pruebas que dieron resultado positivo siendo una medición verdadera, b es una prueba positiva siendo una medición falsa, c es una prueba negativa siendo una medición verdadera y por último d siendo una prueba negativa con una medición falsa. La fórmula sensibilidad es la

siguiente:

$$\textit{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c} \quad (6-3)$$

La fórmula especificidad es la siguiente:

$$\textit{Especificidad} = \frac{d}{b + d} \quad (6-4)$$

En este caso la sensibilidad del estudio es su capacidad para detectar mediciones verdaderas, mientras que la especificidad es su capacidad de detectar mediciones falsas arrojadas por el biosensor, este valor se da en porcentaje.

Conclusión Fase IV

El resultado final del cuarto y último objetivo específico del presente proyecto de grado son la ficha técnica del lactosuero residual de la industria láctea, la formulación del protocolo o plan de pruebas a seguir para evaluar el funcionamiento del prototipo y el manual de usuario de este, para ver el manual se debe dirigir al Anexo J.

7. Conclusiones

- La metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual fue establecida luego de una detallada búsqueda bibliográfica, evaluación y selección de los agentes hidrolizante y oxidante, así como de su validación en lactosuero residual de la industria láctea, de donde se obtuvo dos diagramas metodológicos, cuyo orden de ejecución debe ser de acuerdo al tipo de reacción química a ejecutar sobre 20 mL de la muestra de lactosuero residual, es decir, primero se realiza el paso a paso del diagrama metodológico para la reacción química de hidrólisis del disacárido lactosa en glucosa y galactosa, y segundo la ejecución del diagrama metodológico a seguir para la reacción química de oxidación del monosacárido glucosa a ácido glucónico.

Durante el proceso de establecimiento de la metodología se seleccionó los agentes químicos encargados de llevar a cabo cada reacción química: el ácido clorhídrico como agente hidrolizante y el permanganato de potasio como agente oxidante con un rango de detección de 260 mV y 595 mV de lactosa y un coeficiente de correlación de 0.9435. Se recomienda trabajar en la estequiometría de los agentes químicos con la finalidad de reducir la cantidad de reactivos implementados o establecer un método de inmovilización enzimática, para hacer del producto algo más eficiente a la hora de competir con biosensores electroquímicos en el mercado.

- La caracterización del tipo de transductor que permita transformar la señal generada por la reacción química, en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa se realizó con la evaluación y selección de varios pares de electrodos a partir de la metodología selectiva establecida, de los cuales se seleccionó el par grafito-grafito, ya que fue el que mejor compatibilidad tuvo con la metodología, porque tuvo un coeficiente de correlación fue de 0.9224, un rango de detección de 178 mV a 501 mV y una respuesta directamente proporcional a las concentraciones de lactosa que fue sometido. El material de los electrodos actualmente es aplicado en la tecnología por ser un excelente conductor eléctrico, flexible pese a su dureza, de bajo costo, con estabilidad a la temperatura; razón por la cual su aplicación en el prototipo de laboratorio de biosensor, conduce a este a apostarle a la investigación y construcción de biosensores electroquímicos de tercera generación.
- El diseño e implementación del prototipo de laboratorio de biosensor para la cuantificación

de lactosa en el lactosuero residual fue construido con robustez, ya que partió de los requerimientos del operario que fueron catalogados en técnicos, funcionales y de calidad para ser cumplidos a lo largo del diseño en ingeniería de la estructura del prototipo, de lo cual se obtuvo por impresión 3D una estructura portátil rectangular con cuatro compartimientos para permitir el funcionamiento integro y automatizado en su mayoría de las dos etapas del biosensor, pero con un mantenimiento independiente de cada una para impedir el contacto y deterioro de los componentes electrónicos con los químicos; lo que evita que el operario de producción deba monitorear de manera insegura los vertimientos por métodos analíticos tradicionales.

Por otro lado, la etapa instrumental constituida por el sistema de acondicionamiento y procesamiento de la señal útil, parte del diseño electrónico de un sistema de amplificación operacional no inversor, alimentado con una batería de 9 V y visualizada la medición resultante por medio de una pantalla LCD de 16x2 y la interacción del operario con una interfaz dinámica básica. Se obtuvo un circuito electrónico inestable al ser realizado sobre una protoboard y cableado con jumpers, sin embargo, presenta los resultados esperados por el operario sin afectar sus requerimientos de mayor ponderación, con un rango de variación de 20 mg a 600 mg de lactosa con un coeficiente de correlación de 0.9800. Por lo que, esta etapa del biosensor se puede mejorar en cuanto a la reducción del sistema de acondicionamiento en un circuito impreso (PCB), con conexiones soldadas y mejora de la interfaz que relaciona el biosensor con el usuario y el sistema.

La implementación de un sistema de dosificación del agente oxidante permite al operario tener menor contacto con el manejo de reactivos químicos y hace del biosensor un equipo completo que optimiza el trabajo y tiempo del operario en su labor de monitorización; esto se obtuvo por medio del movimiento perpendicular de un émbolo de una jeringa de 5 mL al rozar con el piñón de un motor paso a paso, el cual fue caracterizado de acuerdo a la relación de sus pasos por mililitro de dosificación, pero al tener un torque de desplazamiento de 0.34 kg por cm, no es capaz de dosificar la cantidad precisa del agente oxidante, por lo que se sugiere un motor con mayor torque de desplazamiento.

- El protocolo formulado para llevar a cabo la evaluación del funcionamiento del biosensor, fue construido con base en la metodología selectiva establecida y los procedimientos desarrollados a lo largo del proyecto, con el fin de comparar valores específicos de mediciones obtenidas por medio de lineamientos de control de calidad analíticos y el método estadístico ANOVA de cada una de las etapas del biosensor, así como, evaluar dichas etapas en conjunto con muestras de lactosuero residual y verificar el funcionamiento completo del mismo, asegurando el resultado final de un producto listo para ser implementado por el operario y que posteriormente para sus mejoras con el protocolo formulado se pueda replicar los procedimientos las veces necesarias e identificar nuevos cambios en el prototipo de laboratorio en diferentes tiempos de su evolución.

8. Recomendaciones

- A parte del equipo y manual del usuario como producto, al usuario se le debe entregar un kit de elementos para su funcionamiento y calibración a nivel químico y electrónico.
- Buscar un diseño de recipientes en los cuales se le pueda entregar al operario 100 *mL* de cada agente químico y que sin necesidad de estar en riesgo por contacto con este, se pueda dosificar la cantidad deseada de manera sencilla y segura.
- Mejorar el diseño del electrodo combinado, buscando reducir sus dimensiones, haciéndolo más llamativo y de fácil manejo al usuario.
- Realizar el rediseño ingenieril de la estructura del prototipo de laboratorio que parta de unos lineamientos más robustos en cuanto a forma, ergonomía y accesibilidad a componentes internos.
- Al momento de realizar la impresión 3D el material debe estar totalmente compacto para evitar la filtración de sustancias líquidas cuando este entre en contacto con ellas y así mismo prevenir el daño de los componentes internos del prototipo.
- Se recomienda reducir el circuito electrónico con el uso de un microcontrolador que de igual manera que Arduino, sea de manejo fácil, didáctico y entendimiento por parte del operario de producción de la industria láctea.
- Teniendo en cuenta que el circuito electrónico no se llevó a montaje en PCB sino en proto-board, se recomienda que el siguiente paso a seguir en caso de darle continuidad al proyecto sea su impresión y acoplamiento en la etapa de instrumentación del prototipo de laboratorio.
- Se recomienda buscar un método de conexión segura entre los componentes electrónicos que se encuentran en la tapa de la estructura y el circuito impreso montado en la PCB.
- La fuente de alimentación del prototipo de laboratorio debe ser de mejor calidad, ya que la batería recargable de 9 *V* debe alimentar toda la etapa instrumental del biosensor y satisfacer

la mayor cantidad de mediciones posibles en diferentes momentos.

- El sistema de dosificación requiere del diseño de un sistema de acoplamiento firme y seguro de este a la estructura del prototipo de laboratorio, de tal manera que no le permita al émbolo desviarse y perder contacto con el piñón del motor, dosificando cantidades inadecuadas del agente oxidante.
- El motor paso a paso debe ser un motor con mayor velocidad y fuerza de arrastre al momento de girar y desplazar el émbolo en el interior de la jeringa en el menor tiempo de respuesta posible.
- A parte de mejorar el sistema de dosificación como se mencionaba, se sugiere realizar un sistema automatizado que permita eliminar la solución del agente oxidante una vez es usado.
- Buscar un método de procesamiento de los desechos químicos obtenidos al final de la medición por el biosensor, de manera que no vayan a contaminar el ecosistema y afectar la salud de los entes vivos.
- El menú para este tipo de biosensor no requiere de muchas opciones, sin embargo se puede mejorar la interfaz, por ejemplo de manera gráfica y con un teclado, o donde la información sea mandada a un documento, el cual luego se abra desde un computador o un celular y se pueda analizar posteriormente sin necesidad de estar en la zona de estudio.

A. Anexo: Levantamiento de Requerimientos.

Se realizó el levantamiento de requerimientos con el objetivo de desarrollar el prototipo de laboratorio de un biosensor para cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual. Por lo tanto, en el anexo se encuentra la tabla de requerimientos con las tareas, requerimientos y entregables según sea el tipo de requerimiento (técnico, calidad y funcional) y objetivo específico trabajado. Todo con el fin de llevar las demandas del usuario a la calidad del diseño y construcción del prototipo de biosensor. (Archivo adjunto PDF: A.Anexo.).

Levantamiento de Requerimientos, con el objetivo de desarrollar el prototipo de un biosensor para cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual, según objetivos específicos del Proyecto de Grado.

Se realiza el levantamiento de requerimientos para cada uno de los objetivos específicos. El cual, consiste en una tabla con tres tipos de requerimientos: técnicos, calidad y funcionalidad debidamente; de los cuales se desglosa una serie de tareas o actividades que dependen de unos requerimientos que algunas veces pueden tener o no entregable:

Tabla 1. Fase I (Establecer una metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual):

Tipo de Requerimiento	Tarea	Requerimiento	Entregable
Técnico	Definir concentraciones de materiales para realizar y comprobar metodología.	Variables químicas: -Cantidad muestra de lactosuero. -Cantidad de enzimas. -Cantidad de reactivos.	Tabla datos de las concentraciones
	Obtener los rangos patrón, para hidrólisis, oxidación y electrodo libre.	Patrones comerciales para hidrólisis, oxidación y electrodo libre.	Curvas patrón.
Calidad	Realizar un ANOVA entre el método seleccionado y el método estandarizado.	Paquete estadístico para el análisis de los datos.	Análisis estadístico y diferencia significativa entre los métodos evaluados.
	Métodos para	-Hidrólisis de lactosa.	

Funcional	detectar lactosa a partir de reacciones químicas.	-Oxidación de glucosa. -Electrodo libre.	Esquemático de la metodología.
	Métodos estandarizados que realicen el mismo proceso que los propuestos.	-Hidrólisis de un disacárido. -Ensayo de tubo. -Oxidación estequiométrica. -Celda con electrodo de referencia.	Datos corroboración efectiva del desarrollo del método.
	Detección de lactosa por reacciones químicas.	Registro de datos tomados del proceso de oxidación en escala del tiempo.	-Montaje de la metodología. -Curva de linealización o de tendencia de la reacción.

En la Tabla 1, se destaca la definición y establecimiento de las cantidades de concentración del lactosuero, enzimas y reactivos, como de los métodos a ejecutar de acuerdo a los resultados deseados y reacciones químicas esperadas. Requerimientos de los cuales se obtiene entregables en forma de tablas de datos, cálculos estequiométricos y montaje, para así, llegar a la generación de la curva de linealización como resultado final de la fase y comprobación de la buena ejecución de la misma.

Tabla 2. Fase II (Caracterizar el tipo de transductor que permita transformar la señal generada por la reacción química, en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa):

Tipo de Requerimiento	Tarea	Requerimiento	Entregable
	Definir tipo de electrodo a trabajar, de acuerdo a las enzimas	-Electrodo electroquímico. -Material electrodo.	Electrodos

	implementadas .		
Técnico	Seleccionar elementos electrónicos a utilizar en la etapa de acondicionamiento de la señal. .	-Cables de conexión. -Protoboard -Amplificadores instrumentales. -Resistencias.	Montaje etapa de instrumentación
	Procesar la señal eléctrica para poder leer concentraciones de lactosa, a partir de voltajes y, luego poderlos visualizarlos.	-Tarjeta (Arduino Nano). -Software (Arduino).	Lenguaje programa
Calidad	Determinar distancia y distorsión de los datos obtenidos del electrodo a comparación de los datos por la reacción química.	Método estadístico (ANOVA).	Análisis estadístico y diferencia significativa de los datos registrados.
	Calcular y diseñar etapa de instrumentación si es necesario.	Variables técnicas: -Voltaje. -Límites y rangos del proceso químico.	Plano etapa de instrumentación.

Funcional	Análisis y acondicionamiento de la señal eléctrica, para lograr una correlación con el proceso químico.	Registro de datos tomados del proceso, antes y después de la etapa de instrumentación.	-Curva de caracterización de los electrodos antes de acondicionar. -Curva de caracterización luego de la etapa de instrumentación.
	Cuantificación de la lactosa luego de la fase de caracterización de la señal eléctrica.	-Lectura y procesamiento de la señal. -Software (Arduino).	Gráfica de la concentración de lactosa.

De acuerdo a la tabla anterior, se puede observar que para cumplir la fase II, se debe realizar algunas tareas de calcular y analizar la señal eléctrica adquirida por los electrodos antes y después de la etapa de instrumentación, teniendo en cuenta, el material de los electrodos, los elementos de instrumentación, las variables técnicas y el uso de un software para leer y procesar la señal, logrando planos de la etapa, curvas de caracterización y, lo requerido por el usuario, la gráfica de concentración de lactosa.

Tabla 3. Fase III (Evaluar el funcionamiento del biosensor basado en la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero residual de los vertimientos de la industria láctea en el municipio de Sopó):

Tipo de Requerimiento	Tarea	Requerimiento	Entregable
	Conseguir agua residual de la industria láctea.	-Industria láctea, Sopó (Cundinamarca). -Desecho luego de la producción de lácteos. -Ubicado antes de ser procesado o vertido.	Muestras agua residual.

Técnico	Evaluar la calidad del agua residual sin procesar.	-DQO -DBO -Sólidos Totales -Carbohidratos	Ficha técnica del estado del agua.
	Definir concentración de la muestra de lactosuero	Variabes técnicas: -Mediciones físicas -Mediciones químicas. -Cantidad lactosuero.	Tabla datos de las variables y concentración .
Calidad	Encontrar invarianza y error porcentual con relación del dato requerido y el obtenido.	Método estadístico (ANOVA).	Análisis estadístico y diferencia significativa entre los métodos evaluados.
	Conocer los límites permisibles de vertidos de industria láctea.	Normativa de vertimientos (Resolución 631 de 2015)	
Funcionales	Análisis de la cuantificación de lactosa presente en el lactosuero, corroboración de la viabilidad y eficiencia del producto.	-Lectura y procesamiento de la señal. -Software (Arduino). -Límites según legislación. -Límites según caracterización biosensor.	Gráfica de la concentración de lactosa, evaluada en el lactosuero de la industria láctea.

En la Tabla 3, se pretende evaluar las dos fases anteriores, mediante una prueba real del lactosuero de la industria láctea, siempre y cuando, se tenga en cuenta los conceptos que aseguran la calidad del vertimiento y del biosensor al momento de comparar sus límites y rangos de concentraciones con los permisibles por la legislación colombiana y los datos estadísticos entre lo requerido y lo obtenido. Los entregables, son tablas de datos, cálculos y gráfica de la concentración del lactosuero estudiado.

Tabla 4. Fase IV (Realizar el diseño de detalle del prototipo de biosensor para la cuantificación de lactosa en el lactosuero residual que se encuentra en los vertimientos de la industria láctea del municipio de Sopó):

Tipo de Requerimiento	Tarea	Requerimiento	Entregable
Técnico	<p>Seleccionar elementos electrónicos a utilizar para la reducción de las fases.</p>	<p>-Cantidad lactosuero. -Cantidad enzimas. -PCB -Amplificadores instrumentales. -Resistencias.</p>	<p>-Esquemático metodología completa. -Montaje fases del biosensor.</p>
	<p>Realizar plano técnico de la estructura del biosensor.</p>	<p>-Medidas reales. -Bosquejo. -Software CAD (Fusion 360 o Solid Work).</p>	<p>Plano técnico de la estructura del biosensor.</p>
	<p>Elegir qué máquina se implementará para realizar el corte de la estructura.</p>	<p>-Impresión en 3D. -Cortadora láser.</p>	
	<p>Escoger materiales para realizar la fabricación y ensamble de la estructura.</p>	<p>-Ligero. -Compacto. -Impermeable. -Textura lisa. -Materiales de ensamble</p>	<p>Estructura en físico del biosensor.</p>

Calidad	Evaluar el menor grado de afectación e intervención del material de la estructura en los resultados del biosensor.	-Propiedades del material. -Software CAD (Fusion 360 o SolidWorks).	Simulación resistencia y comportamiento del material.
Funcionales	Garantizar el funcionamiento del biosensor luego de ser simplificado e introducido a su estructura.	-Muestra de lactosuero. -Estructura acoplada al usuario.	Producto biosensor para cuantificación de lactosa

En la Tabla 4 de la fase IV, se indica que, para poder llegar a la obtención de un esquemático en la metodología, plano técnico de la estructura, simulación de las propiedades de su material cuando es sometido a cargas externas y producto final, se requiere tener en cuenta las cantidades y parámetros que debe tener la reducción de las fases, como también, la estructura, medidas, distribución del área y, software a utilizar. Todo lo anteriormente mencionado, permite la obtención del diseño de detalle de un biosensor para la cuantificación de lactosa del lactosuero.

B. Anexo: QFD para el desarrollo del prototipo de laboratorio de biosensor.

La evaluación de los requerimientos técnicos y del cliente se realizó por medio del método de despliegue de la función calidad (QFD), donde se obtuvo como resultado una sumatoria para cada requerimiento que indica el orden de mayor importancia a menor importancia y, así mismo, permitió calcular los objetivos necesarios para llegar a cada uno de ellos durante el desarrollo de ingeniería de la fase III. (Documento adjunto en Excel: B.Anexo.).

C. Anexo: Tablas y gráficas, estandarización de la metodología selectiva para detectar lactosa.

Para llegar a establecer una metodología para detectar selectivamente la lactosa presente en el lactosuero residual se estableció el agente hidrolizante y oxidante, se evaluó las curvas de linealización resultantes de las mediciones a partir de lineamientos de control de calidad analíticos y analizados mediante el método estadístico ANOVA. (Documento adjunto en Excel: C.Anexo.).

D. Anexo: Tablas y gráficas, caracterización del par de electrodos que permite transformar la señal química en eléctrica.

Para llegar a caracterizar el transductor (electrodo indicador: grafito, electrodo referencia: grafito) que permita transformar la señal generada por la reacción química, en una señal eléctrica para poder cuantificar la lactosa, en el orden de los milivoltios, se evaluó las curvas de linealización resultantes de las mediciones a partir de lineamientos de control de calidad analíticos y analizados mediante el método estadístico ANOVA. (Documento adjunto en Excel: D.Anexo.).

E. Anexo: Matriz de decisión para la selección de cada uno de los componentes del prototipo laboratorio de biosensor.

Una vez se tuvo el diseño conceptual y se iba a llevar a detalle, se realizó la lista de los componentes funcionales que se utilizarían para cumplir con los requerimientos en ingeniería. Además, para darle tranquilidad al usuario respecto al funcionamiento y uso del biosensor, se escogen tres posibles alternativas de solución para cada componente y por medio de una matriz de decisión se evaluó las opciones para cada componente; el componente de mayor sumatoria fue el seleccionado para conformar el prototipo de laboratorio de biosensor. (Documento adjunto en PDF: E.Anexo.).

Objetivo 3	Componente	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Diseño estructura	Método de construcción (estructura)	Impresión 3D	Corte láser	Corte manual
	Material construcción (estructura)	PLA	ABS	Acrílico
	Jeringa	1 mL	5 mL	10 mL
	Sistema desplazamiento de jeringa	Poleas	Piñones	Piñon, correa de desplazamiento
	Sistema de aseguramiento (estructura)	Tornillos	Cloruro de metileno	Super bonder
	Tornillo	3/8"	1/2"	5/8"
Diseño etapa instrumental	Placa montaje circuito	PCB	Baquela	Protoboard
	Placa de desarrollo	Arduino	PIC 18F4550	PIC 16F84
	Fuente de alimentación	Bateria	Pila	Fuente de Voltaje
	Motor	Paso a paso	Servomotor	DC
	Método visualización resultados	LCD	PC	Celular
	Regulador menú de visualización	Potenciómetro rotatorio	Potenciómetro trimmer	Pulsador
	Amplificador operacional	LM741	LM386	LM324

CRITERIOS	Alternativas de solución Método de construcción (estructura)		
	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Requerimientos			
Estructura robusta para impedir el deterioro de los componentes electrónicos	4	4	2
La estructura del prototipo debe estar integrada	5	3	2
El recipiente de la muestra debe ser removible	5	4	3

Fácil adaptación del sistema de aseguramiento en la estructura (tapas-recipiente)	4	3	3
PESO TOTAL	18	14	10

CRITERIOS	Alternativas de solución Material construcción (estructura)		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El material debe ser resistente a las condiciones ambientales	5	3	4
El material no debe inhibir el funcionamiento del biosensor	5	5	5
El material debe ser económico	2	3	5
El material debe ser biodegradable y reutilizable	5	1	1
PESO TOTAL	17	12	15

CRITERIOS	Alternativas de solución Jeringa		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Capacidad de almacenamiento del cofactor óptima	1	5	3
La longitud debe ser proporcional a la dimensión de la estructura	4	5	2
El émbolo debe tener fácil movilidad	5	5	4
La jeringa debe ser liviana	5	4	3
PESO TOTAL	15	19	12

CRITERIOS	Alternativas de solución Sistema desplazamiento de jeringa		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Fácil acoplamiento entre los elementos	3	2	5
Debe tener un desplazamiento perpendicular al eje del motor	4	2	5
Fácil acondicionamiento al motor y al émbolo de la jeringa	4	4	5
Menor tamaño y simplicidad	2	3	4

Fácil mantenimiento del sistema	2	3	4
PESO TOTAL	15	14	23

CRITERIOS	Alternativas de solución Sistema de aseguramiento (estructura)		
	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El aseguramiento de las partes debe ser seguro	5	4	3
El sistema debe ser sencillo y de fácil limpieza	5	1	1
El sistema debe ser desarmado en un tiempo mínimo a 10 min	5	1	1
El sistema debe estar acoplado a la estructura	4	2	2
Se requiere que el sistema sea compatible con el material de construcción	3	5	3
El sistema de aseguramiento debe dar buena presentación al equipo	3	5	5
PESO TOTAL	25	18	15

CRITERIOS	Alternativas de solución Tornillo		
	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El tornillo debe ser cabeza plana estrella	5	5	5
El tornillo debe tener punta fina	5	5	5
Debe tener diámetro menor a 5 mm	5	5	5
Debe tener longitud entre 15 y 25 mm	1	5	2
No se debe aflojar ni obstruir el sistema de aseguramiento	1	4	2
PESO TOTAL	17	24	19

CRITERIOS	Alternativas de solución Placa montaje circuito		
	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El circuito debe tener una conexión segura	5	4	2

El circuito debe ocupar un espacio mínimo	4	2	1
Se requiere de una placa conductora e invidora de interferencias	4	3	2
Debe facilitar el mantenimiento y calibración	5	4	3
PESO TOTAL	18	13	8

CRITERIOS	Alternativas de solución Fuente de alimentación		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El voltaje de alimentación debe ser de 9 V	5	3	5
La fuente de alimentación debe ser inalámbrica	5	3	1
Menor tamaño y fácil manipulación	4	3	1
La fuente de alimentación debe ser recargable	5	2	1
PESO TOTAL	19	11	8

CRITERIOS	Alternativas de solución Motor		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El voltaje de operación debe ser menor a 9 V	5	5	3
Peso mayor a 4 g	5	5	4
Debe tener una velocidad angular nominal 1.6 RPM	4	3	5
Debe ser programable	5	5	1
PESO TOTAL	19	18	13

CRITERIOS	Alternativas de solución Sistema visualización resultados		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El resultado debe verse de manera inmediata	5	4	3
El resultado debe ser de fácil interpretación por el operario	4	2	3
El producto debe ser portable	5	1	3
Menor tamaño y simplicidad del producto	4	1	2
PESO TOTAL	18	8	11

CRITERIOS	Alternativas de solución Placa de desarrollo		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Se requiere un voltaje de entrada de 9 V aprox	5	1	1
Requiere de un PWM de 8 bits	5	5	5
Necesita de menos de 14 pines digitales	4	1	5
Memoria flash de aprox. 32 KB	5	5	4
Frecuencia de 16 MHz	5	3	3
La estructura del prototipo debe facilitar el mantenimiento y calibración de cada etapa	5	3	3
PESO TOTAL	29	18	21

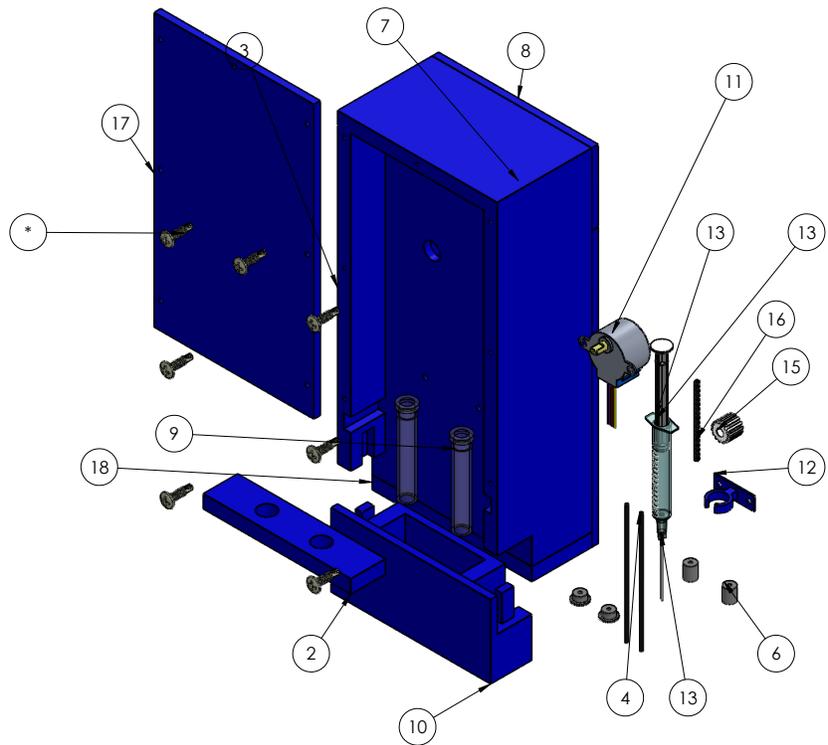
CRITERIOS	Alternativas de solución Regulador menú de visualización		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
El regulador debe ser de fácil mantenimiento	5	4	1
Se requiere de la selección sencilla de un menú	5	1	4
El regulador debe tener durabilidad	5	4	1
El regulador debe tener un tamaño óptimo según el sistema de visualización	4	2	2
El regulador debe controlar la luz del sistema de visualización	5	4	1
PESO TOTAL	24	15	9

CRITERIOS	Alternativas de solución Amplificador operacional		
Requerimientos	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Requiere un voltaje de suministro de máximo de 22 V	5	5	5
Requiere de un voltaje de entrada máximo de 15 V	5	5	5
Debe tener un voltaje offset para una resistencia de 10 K Ohm de 1 a 6 mV	5	1	5
El amplificador debe tener máximo 4 pines	5	1	1
PESO TOTAL	20	12	16

F. Anexo: Planos técnicos de la estructura funcional del prototipo de laboratorio, luego de su diseño detallado en el software SolidWorks 2018.

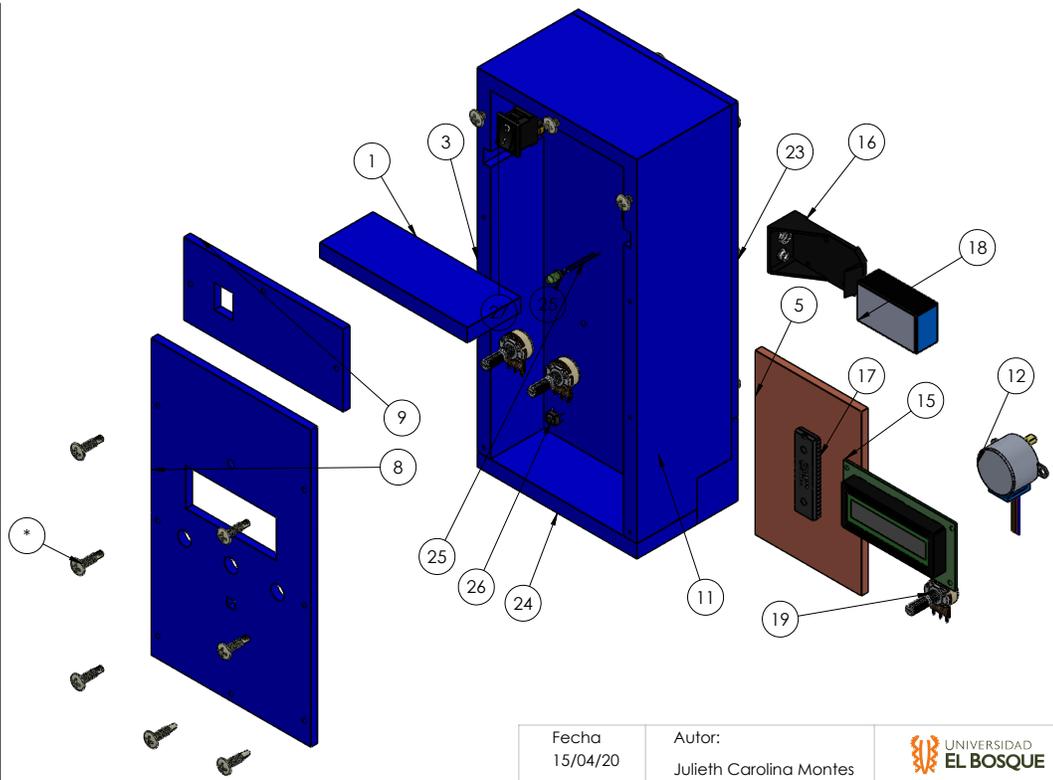
Luego de realizar el modelado y construcción del diseño detallado en el software SolidWorks 2018, se extrajo los planos técnicos del prototipo de laboratorio de biosensor en conjunto como de cada una de las piezas que lo conforman, para ser llevado a impresión 3D. (Archivo adjunto PDF: F.Anexo.).

N.º DE ELEMENTO	N.º DE PIEZA	CANTIDAD
1	Base batería	1
2	Base electrodo	1
3	Estructura básica	1
4	Mina grafito	2
5	Tapa silicón	2
6	Tapón silicón	2
7	Tapa circuito	1
8	Tapa batería	1
9	Tubo electrodo	2
10	Recipiente removible	1
11	Step Motor (28BYJ-48)	1
12	Abrazadera jeringa	1
13	Jeringa 5mL	1
14	Tornillo estrella 1/2"	7
15	Piñón motor paso	1
16	Correa distribución	1
17	Tapa electrodo	1
18	Base estructura	1

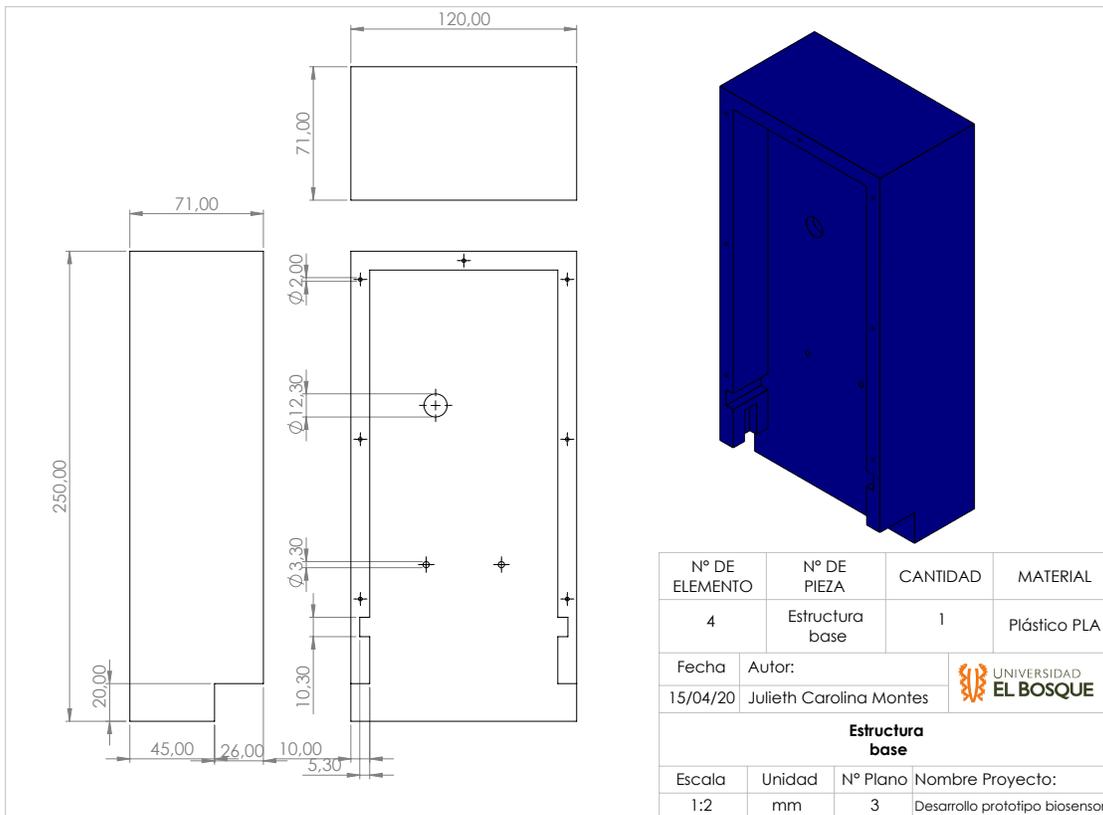


Fecha 15/04/20	Autor: Julieth Carolina Montes		
Vista explosionada, etapa de reconocimiento biológico			
Escala 1:2	Unidad mm	Nº Plano 2	Nombre Proyecto: Desarrollo prototipo biosensor

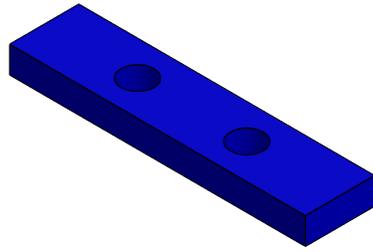
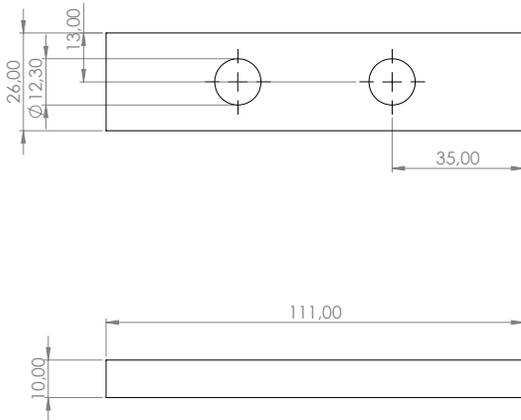
N.º DE ELEMENTO	N.º DE PIEZA	CANTIDAD
1	Base estructura	1
2	Base batería	1
3	Estructura base	1
4	Mina grafito	2
5	Placa circuito	1
6	Tapa silicón	2
7	Tapón silicón	2
8	Tapa circuito	1
9	Tapa batería	1
10	Tubo electrodo	2
11	Recipiente removible	1
12	Step Motor (28BYJ-48)	1
13	Abrazadera jeringa	1
14	Jeringa 5 mL	1
15	Pantalla LCD	1
16	Portador de Batería	1
17	Placa de desarrollo	1
18	Batería 9V	1
19	Potenciómetro PCI 10K	3
20	Tornillo de estrella 1/2"	17
21	Piñón motor paso	1
22	Correa distribución	1
23	Tapa electrodo	1
24	Base estructura	1
25	LED	1
26	Switch encender	1
27	Pulsador	1



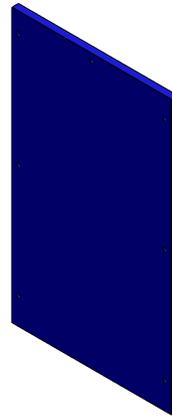
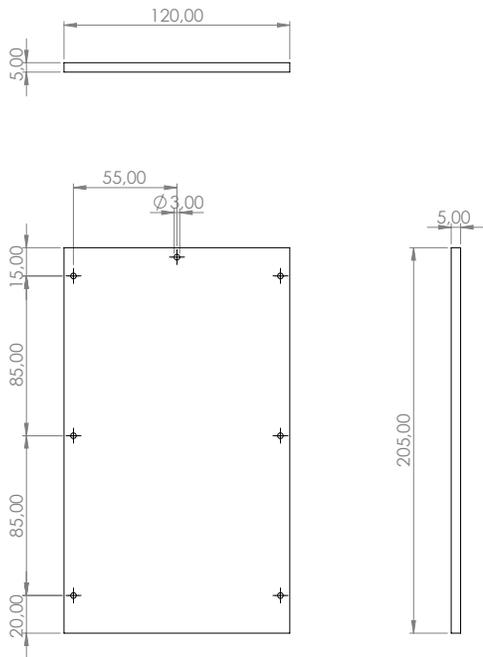
Fecha 15/04/20	Autor: Julieth Carolina Montes		
Vista explosionada, etapa de instrumentación			
Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:2	mm	1	Desarrollo prototipo biosensor



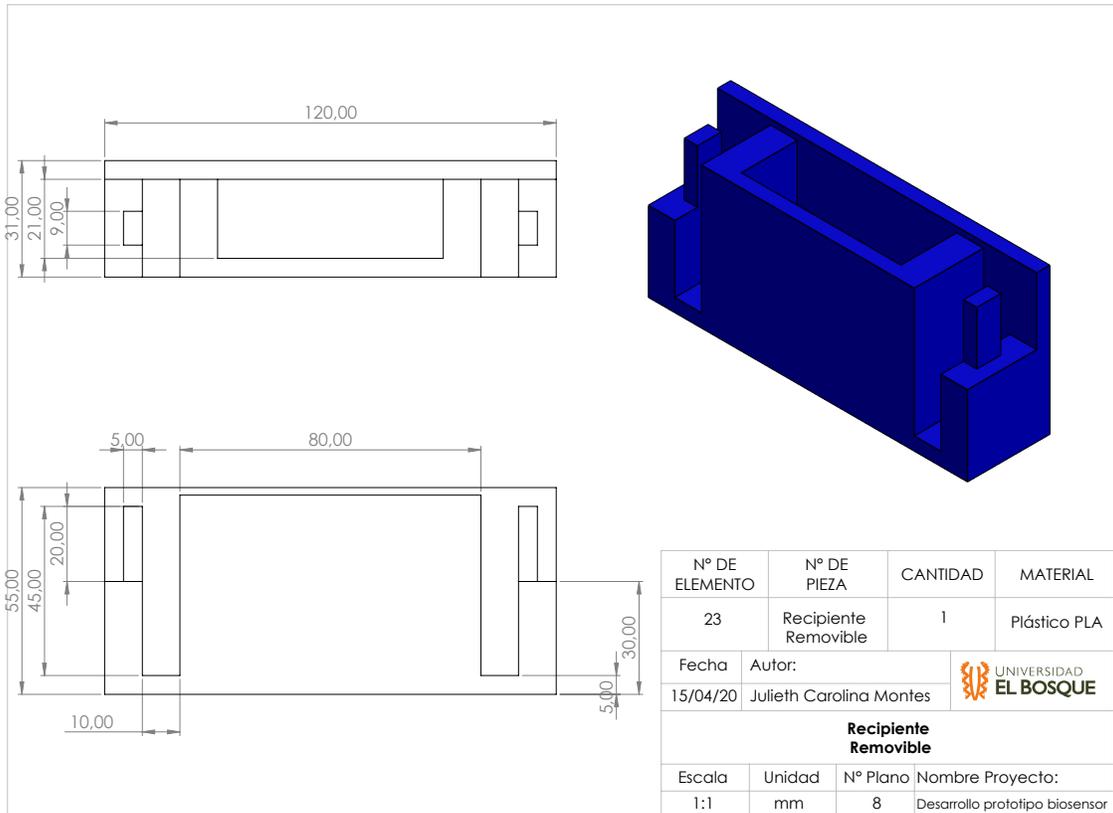
N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
4	Estructura base	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Estructura base			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:2	mm	3	Desarrollo prototipo biosensor



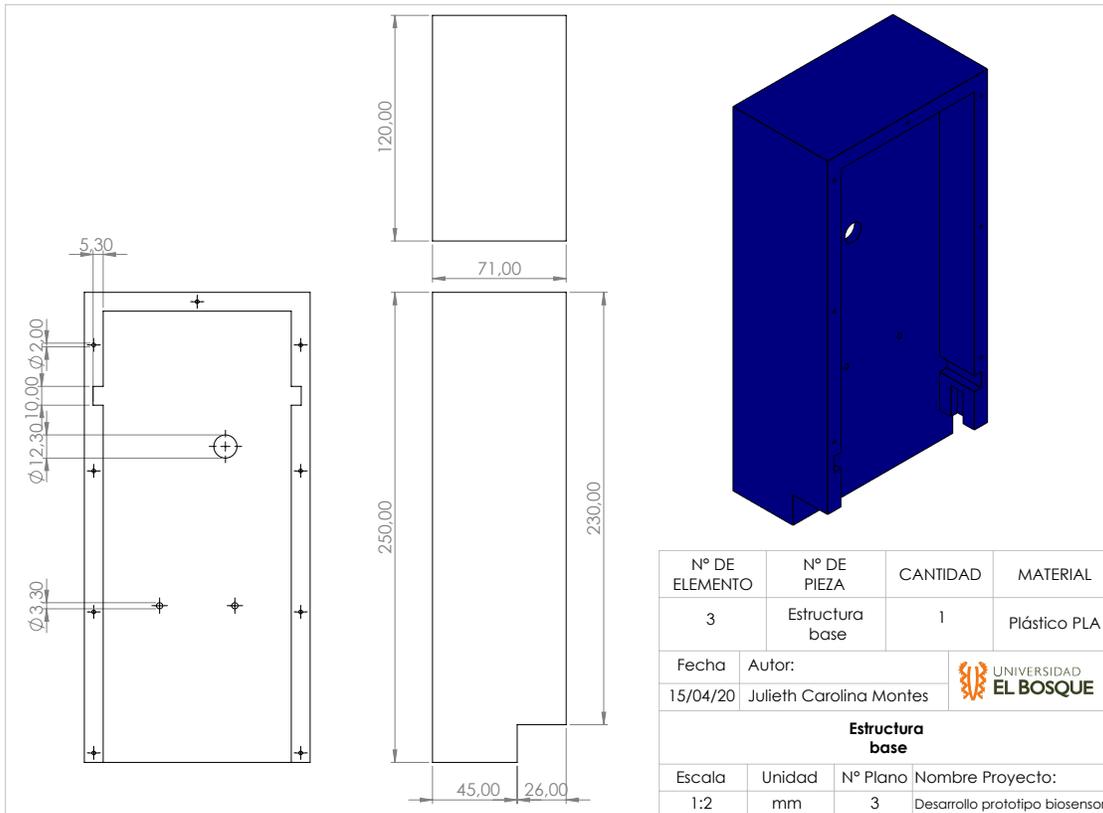
N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
	Base electrodos	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Base Electrodo			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	6	Desarrollo prototipo biosensor



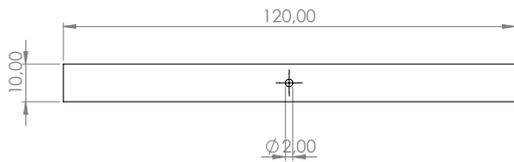
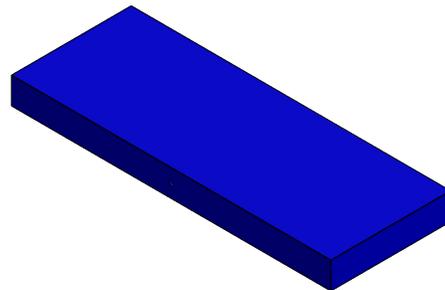
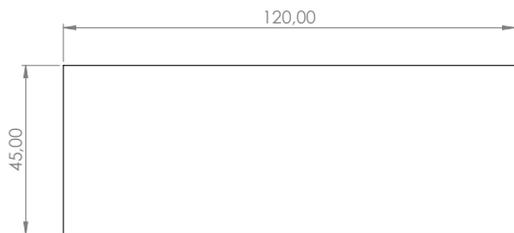
N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
	Tapa electrodos	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Tapa Electrodo			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:2	mm	7	Desarrollo prototipo biosensor



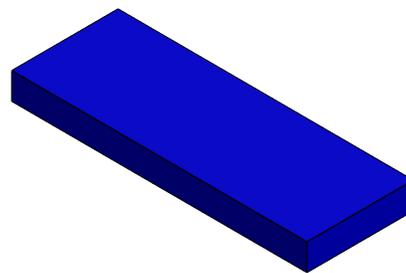
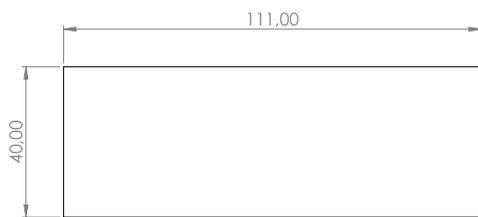
N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
23	Recipiente Removible	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:		 UNIVERSIDAD EL BOSQUE
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Recipiente Removible			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	8	Desarrollo prototipo biosensor



N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
3	Estructura base	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Estructura base			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:2	mm	3	Desarrollo prototipo biosensor



N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
24	Base estructura	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Base Estructura			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	5	Desarrollo prototipo biosensor



N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
1	Base batería	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:		 UNIVERSIDAD EL BOSQUE
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Base Batería			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	9	Desarrollo prototipo biosensor

G. Anexo: Simulación o video de la vista explosionada del prototipo de laboratorio de biosensor, SolidWorks 2018.

En el diseño detallado luego de realizar el modelado y construcción del mismo en el software SolidWorks 2018, se creó un video que contiene la vista explosionada de cada una de las piezas del prototipo, como guía al usuario para ensamblar y desarmar el producto. (Archivo adjunto MP4: G.Anexo.).

H. Anexo: Formatos propuestos en el protocolo para la evaluación del funcionamiento del prototipo de laboratorio de biosensor de manera íntegra

El cuarto objetivo específico consiste en formular un protocolo de evaluación del funcionamiento de biosensor basado en la cuantificación de lactosa, por lo que se consideró el uso de formatos de evaluación para que el usuario pueda comparar los resultados obtenidos con respecto a medidas estándares y así mismo pueda analizar si los resultados son correctos o no con respecto al funcionamiento óptimo del biosensor; permitiendo que el usuario lo pueda realizar las veces que considere necesario. (Archivo adjunto Excel: H.Anexo.).

I. Anexo: Video funcionamiento paso a paso del prototipo de laboratorio de biosensor de lactosa

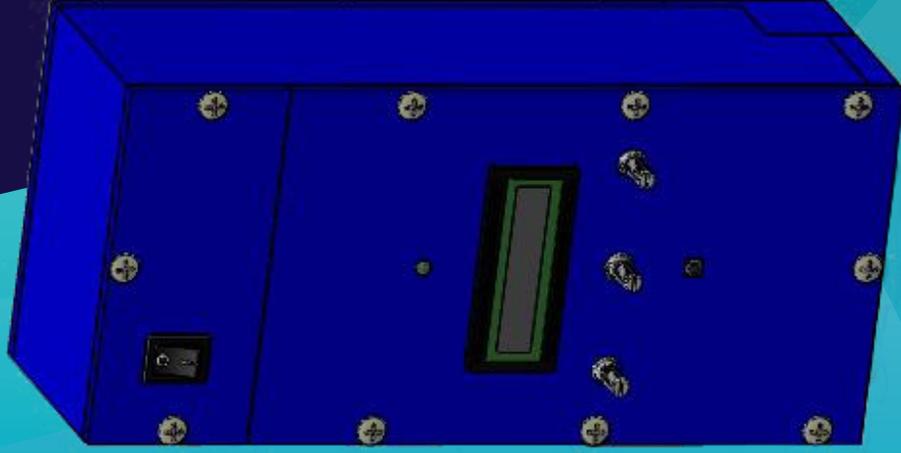
Como resultado general del proyecto de grado, se realizó el video que muestra el funcionamiento en conjunto de las etapas del prototipo de biosensor, como guía al usuario para su correcto funcionamiento y como evidencia de la finalización del presente proyecto. (Archivo adjunto MP4: I.Anexo.).

J. Anexo: Manual del usuario.

Como parte de los resultados del objetivo cuatro y del producto final se creó un Manual de Usuario, el cual da a conocer los componentes y funcionalidad del prototipo de laboratorio de biosensor, además del plan de pruebas de validación y evaluación, mostrando cada paso a seguir para la correcta medición de lactosa presente en el lactosuero a estudiar, finalizando con la limpieza y puesta en marcha para el mejoramiento del equipo si así desea el lector. (Archivo adjunto PDF: J.Anexo.).



Manual de usuario de prototipo de laboratorio de Biosensor de lactosa en lactosuero residual



Julieth Carolina Montes Forigua
Bioingeniería, Universidad El Bosque
2020

ÍNDICE

01

Introducción

02

Instrucciones de seguridad importantes

03

Información importante del lactosuero

04

Contenido

05

Configuración

5.1. Funciones principales

5.2. Pantalla del biosensor

06

Realizar prueba

07

Mantenimiento

08

Especificaciones

ANEXOS

01

INTRODUCCIÓN



El siguiente manual da a conocer los componentes y funcionalidad del prototipo de laboratorio de biosensor, además del plan de pruebas de validación y evaluación, mostrando cada paso a seguir para la correcta medición de lactosa presente en el lactosuero a estudiar, finalizando con la limpieza y puesta en marcha para el mejoramiento del equipo si así desea el lector.



INSTRUCCIONES DE USO

El sistema de monitoreo de lactosa en lactosuero residual esta diseñado para industrias lácteas que produzcan queso de cualquier tipo. Para el funcionamiento de este sistema, las pruebas de cuantificación de lactosa deben partir de muestras frescas de lactosuero y no deben ser utilizados para diagnosticar o realizar pruebas de lactosa en productos lácteos o entes vivos.



PRINCIPIO DE USO

La lactosa en el lactosuero residual es medida por un potencial eléctrico a través de un transductor y una etapa de instrumentación, el cual es producido cuando una muestra de lactosuero reacciona con unos agentes químicos especiales presentes en la etapa de reconocimiento biológico. El potencial eléctrico cambia de acuerdo a la cantidad de lactosa que se encuentra en la muestra de lactosuero. El biosensor mide el potencial eléctrico, calcula la cantidad de lactosa en el lactosuero y luego muestra el resultado en **mg**. El prototipo de biosensor de lactosa ha sido diseñado y validado para ser probado como un sistema que produce resultados precisos de lactosa en el lactosuero.

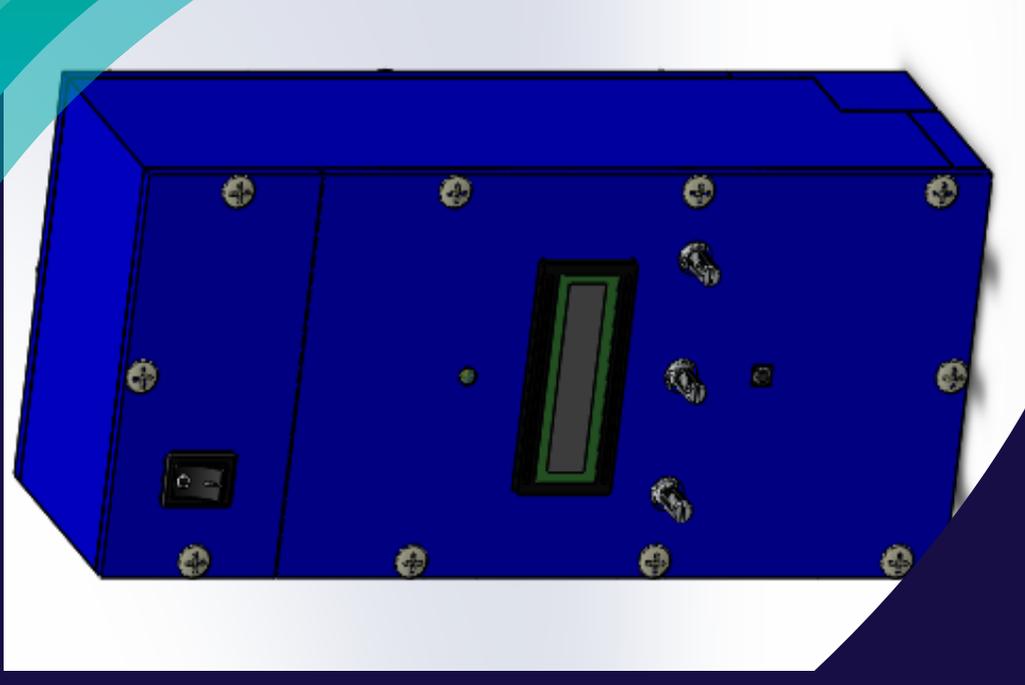
02

INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD



IMPORTANTES

- Utilice el dispositivo solamente para el uso indicado en el manual.
- No utilice componentes que no cumplan con las referencias especificadas por el fabricante.
- Antes de utilizar el producto para cuantificar la lactosa en el lactosuero residual, lea todas las instrucciones con atención y realice la prueba.
- Ejecute todos los planes de prueba para validación y evaluación, consulte con un profesional en Bioingeniería especializado en aguas residuales.
- El prototipo de laboratorio de biosensor debe ser manipulado con elementos de protección personal (cofia, guantes, tapa bocas, gafas de seguridad).
- Todos los componentes de la etapa de reconocimiento biológico pueden ser considerados de alto riesgo, por lo que se recomienda mantener fuera del alcance de personas que no han leído o sido instruidas en su uso, además de mantener sellados los reactivos, como armado, limpio y desinfectado el prototipo de biosensor.
- Los componentes de la etapa de instrumentación no deben entrar en contacto con sustancias químicas o componentes que generen descomposición de sus materiales, deben estar adecuadamente conectados y caracterizados.



03

INFORMACIÓN IMPORTANTE DE PRUEBA DE SOLUCIÓN DE



CONTROL



01

Las soluciones de los agentes químicos deben ser las proporcionadas por el fabricante, manipularse en las cantidades adecuadas, mantenerse a temperatura ambiente y con fecha de vencimiento mayor a tres meses.

02

Los componentes electrónicos deben tener las referencias dadas, proporcionar corriente, voltaje e información análoga o digital requerida y mantenerse a temperatura ambiente.

03

La batería debe ser recargada una vez se acaba su potencial de alimentación y cambiada por una batería cargada de 9 V. Esto es evidenciado en funcionamiento incompleto del prototipo de biosensor.

04

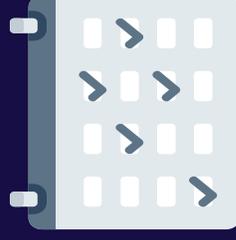
La muestra del lactosuero residual debe tener menos de tres días de recolección y almacenarse a temperatura de 4 °C. Las variables físico-químicas deben ser:
-**Queso Campesino:** 28.6 °C, pH 5.42, 17 °D.
-**Queso Doble Crema:** 29.1 °C, pH 6.75, 10 °D.

05

El sistema de dosificación debe cumplir con la ecuación de relación *pasos por mL* de solución, no debe presentar escape de esta, debe estarse limpiando y recargando cada quinta muestra a estudiar. El *mL* de solución dosificada únicamente es utilizada para cuantificar lactosa en una muestra de lactosuero.

04

CONTENIDO



El prototipo de biosensor de lactosa se encuentra solamente disponible como un biosensor compuesto por una etapa de reconocimiento biológico y una etapa de instrumentación, con un kit de soluciones químicas (100 **ml** de cada agente). Favor revisar los contenidos de su producto para confirmar que todos los componentes están incluidos según el siguiente listado.



LA ETAPA DE RECONOCIMIENTO INCLUYE:

Inventario y análisis de los componentes del electrodo combinado			
Componente	Cantidad requerida	Cantidad real	Observaciones
Muestra de lactosa	Tabla estequiométrica		Especificaciones Refrigerada a 4°C
Vaso de precipitado	2 ud		Volumen de 50 mL
Tubo de vidrio electrodo	2 ud		Limpio y desinfectado
Electrodo grafito	2 ud		Sin fisuras
Tapones de silicón	4 ud		Aseguren sellamiento completo
Agua de la llave	20 mL		Incolora e inodora
Permanganato de potasio	1 mL		Fecha vencimiento no alcanzada
Ácido clorhídrico	1 mL		Fecha vencimiento no alcanzada

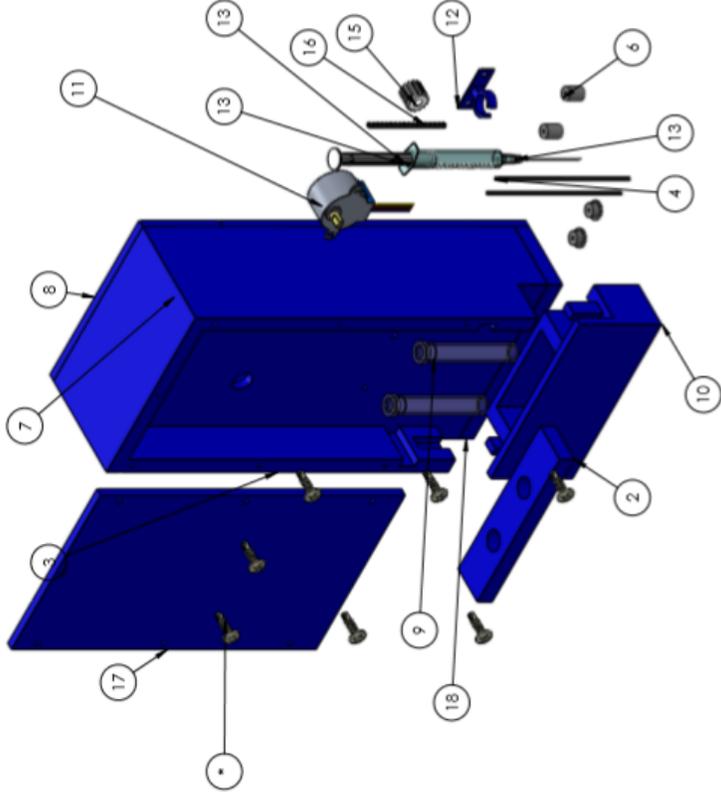


LA ETAPA DE INSTRUMENTACIÓN INCLUYE:

Inventario y análisis de los componentes para el procesamiento de la señal útil			
Componente	Cantidad requerida	Cantidad real	Observaciones
Software Arduino	1		Actualizado y con librerías requeridas
PCB	1		Estado corrosión
LM741	1		Comprobar el paso de corriente
Resistencia 220 ohm	1		Permita el funcionamiento de LCD y pulsador
Resistencia 1 Kohm	1		Cumpla con el AO no inversor
Resistencia 10 Kohm	1		Cumpla con el AO no inversor
Pulsador	1		Tenga contacto correcto al oprimir
Potenciómetro 10 Kohm	3		Cumpla con la caracterización requerida
Pantalla LCD 16X2	1		Visualice el menú y resultados
Arduino Nano	1		Programación cargada, funcionamiento pines



LA ETAPA RECONOCIMIENTO INCLUYE:



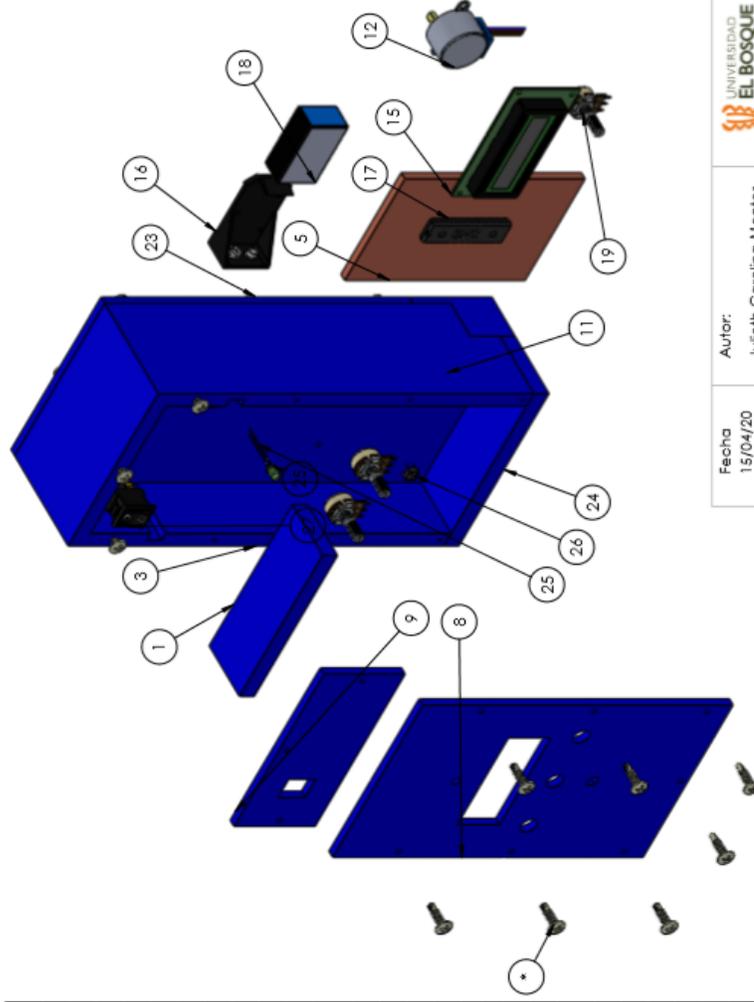
N.º DE ELEMENTO	N.º DE PIEZA	CANTIDAD
1	Base batería	1
2	Base electrado	1
3	Estructura básica	1
4	Mina grafito	2
5	Tapón silicón	2
6	Tapón silicón	2
7	Tapón circuito	1
8	Tapo batería	1
9	Tubo electrado	2
10	Recipiente removible	1
11	Step Motor (28BY-48)	1
12	Abrazadera jeringa	1
13	Jeringa 5ml	1
14	Tornillo estrella 1/2"	7
15	Piñón motor paso	1
16	Correa distribución	1
17	Tapo electrado	1
18	Base estructura	1

Fecha	15/04/20	Autor:	Julieith Carolina Montes	UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
Escala	1:2	Unidad	mm	Nº Plano	2
Vista explosionada, etapa de reconocimiento biológico			Nombre Proyecto:	Desarrollo prototipo biosensor	



LA ETAPA INSTRUMENTACIÓN INCLUYE:

N.º DE ELEMENTO	N.º DE PIEZA	CANTIDAD
1	Base estructura	1
2	Base batería	1
3	Estructura base	1
4	Mina grafito	2
5	Placa circuito	1
6	Tapa silicón	2
7	Tapón silicón	2
8	Tapa circuito	1
9	Tapa batería	1
10	Tubo electrado	2
11	Recipiente removible	1
12	Step Motor (28BYJ-48)	1
13	Abrazadera jeringa	1
14	Jeringa 5 mL	1
15	Pantalla LCD	1
16	Forrador de Batería	1
17	Placa de desarrollo	1
18	Batería 9V	1
19	Potenciómetro PCl 10K	3
20	Tornillo de estrella 1/2"	17
21	Piñón motor paso	1
22	Carrea distribución	1
23	Tapa electrado	1
24	Base estructura	1
25	LED	1
26	Switch encender	1
27	Pulsador	1

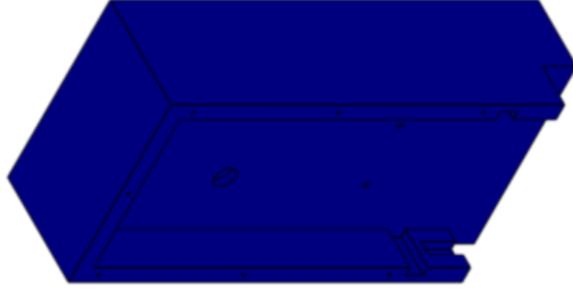
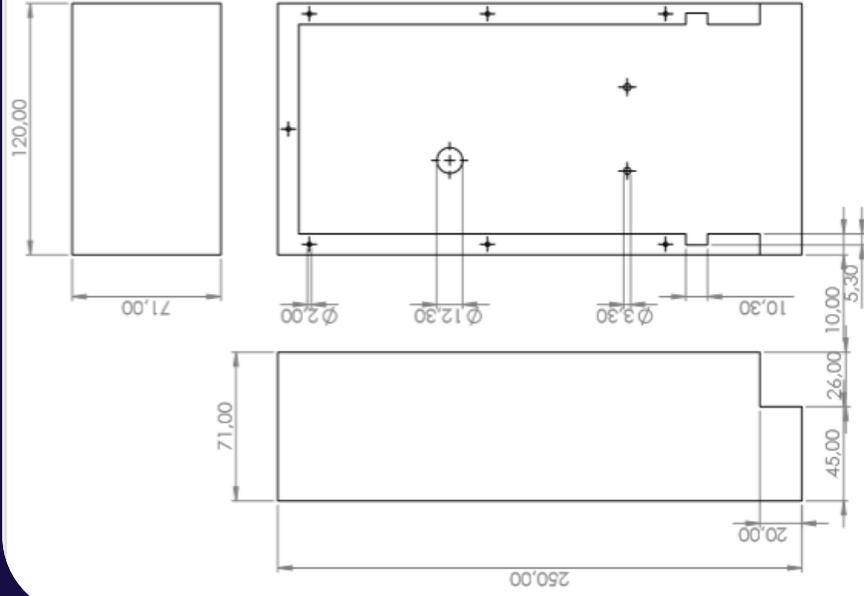


Fecha	15/04/20	Autor:	Julieth Carolina Montes	UNIVERSIDAD EL BOSQUE			
Vista explosionada, etapa de instrumentación							
Escala	1:2	Unidad	mm	Nº Plano	1	Nombre Proyecto:	Desarrollo prototipo biosen

13	mm	1	Desarrollo biosen
14	mm	1	Desarrollo biosen
15	mm	1	Desarrollo biosen



PLANOS TÉCNICOS ETAPA RECONOCIMIENTO:



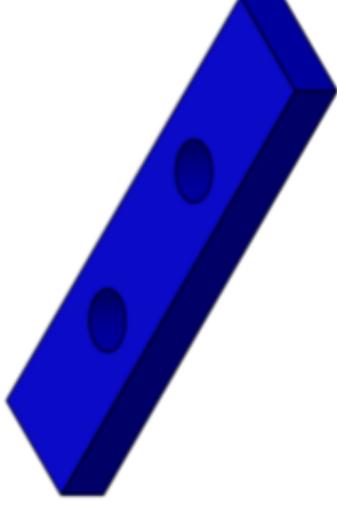
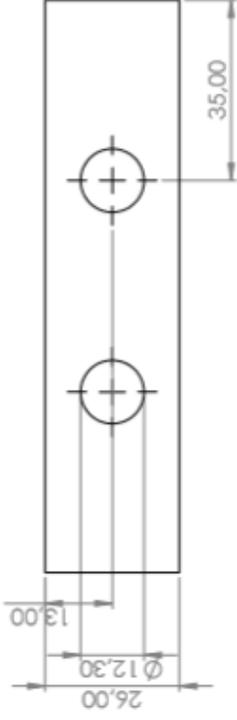
N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
4	Estructura base	1	Plástico PLA

Fecha	Autor:	UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieth Carolina Montes		

Estructura base			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:2	mm	3	Desarrollo prototipo biosenso

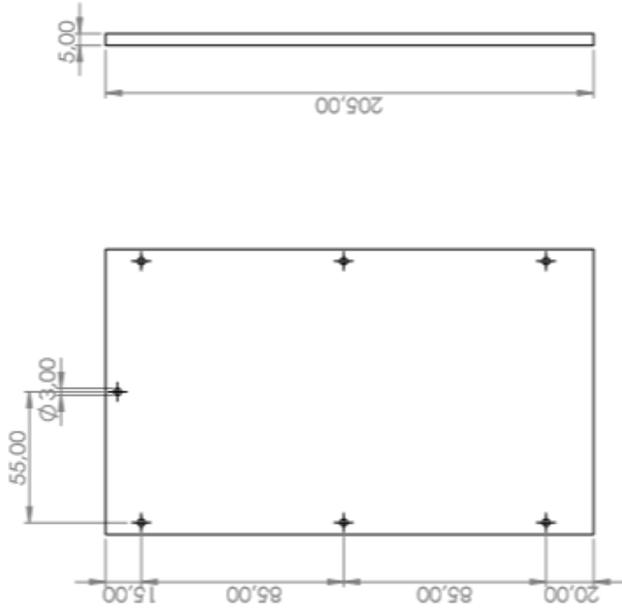
13 mm
Etapa 1/3 plano / parte prototipo

Desarrollo prototipo biosenso



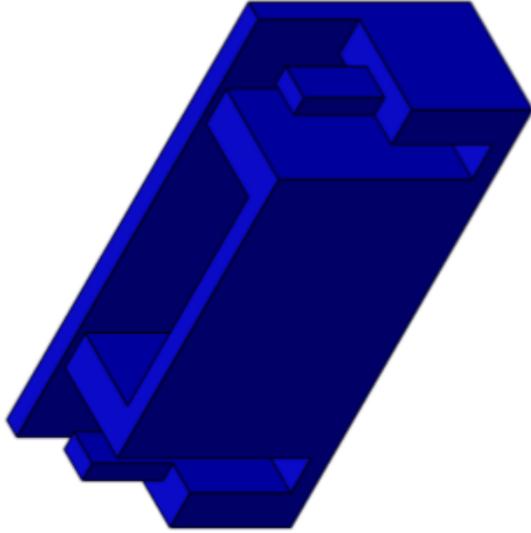
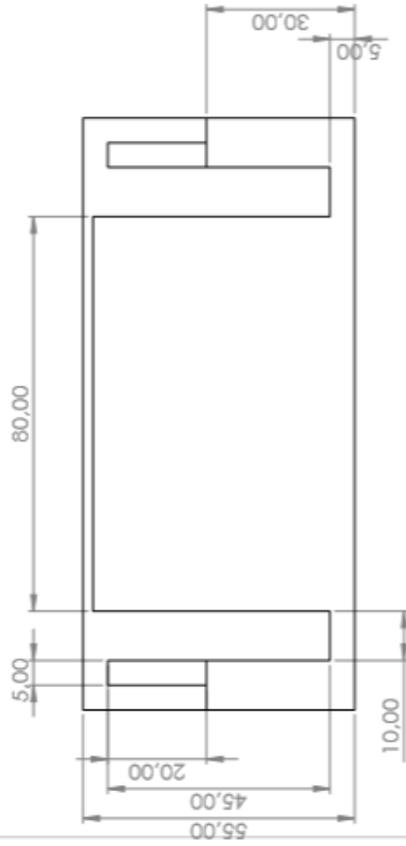
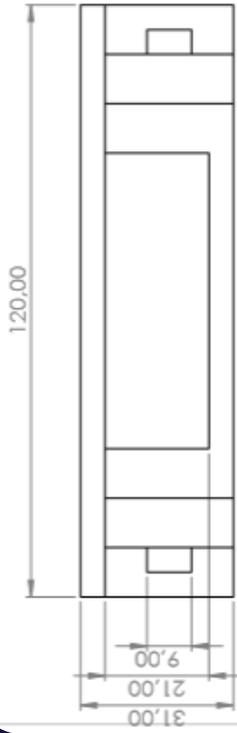
Nº DE ELEMENTO	Nº DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
	Base electrodos	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:		
15/04/20	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE		
Base Electrodo			
Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	6	Desarrollo prototipo biosenso

Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	6	Desarrollo prototipo biosenso



Nº DE ELEMENTO	Nº DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
	Tapa electrodos	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:		
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Tapa Electrodo			
Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:2	mm	7	Desarrollo prototipo biosensores





Nº DE ELEMENTO	Nº DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
23	Recipiente Removible	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:		
15/04/20	Julieth Carolina Montes		
Recipiente Removible			
Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	8	Desarrollo prototipo biosen

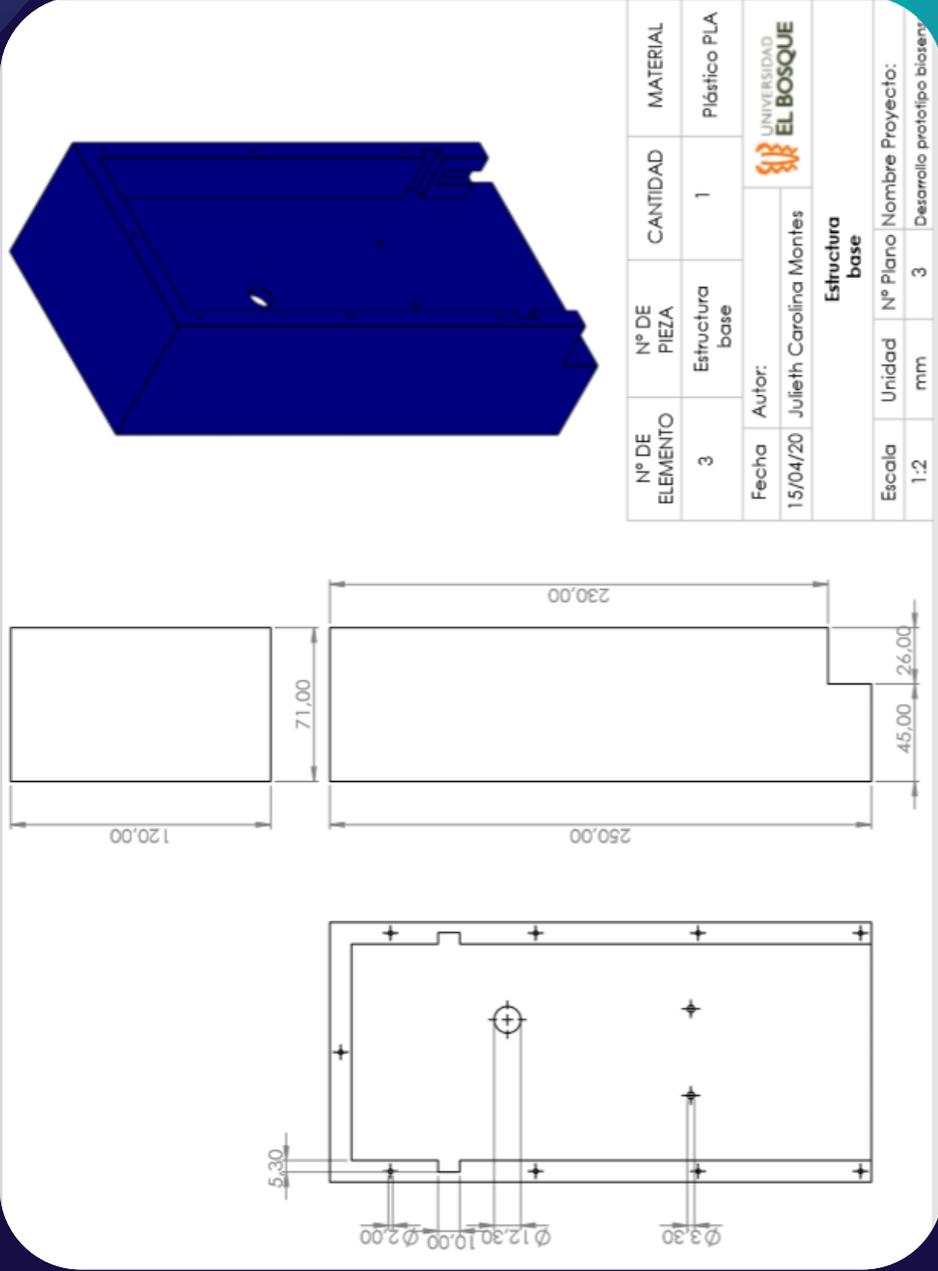


Escala: 1:1
Unidad: mm
Nº Plano: 8
Nombre Proyecto: Desarrollo prototipo biosen

Detalle: Detalle biosen prototipo
Nº Plano: 9
Nombre Proyecto: Desarrollo prototipo biosen

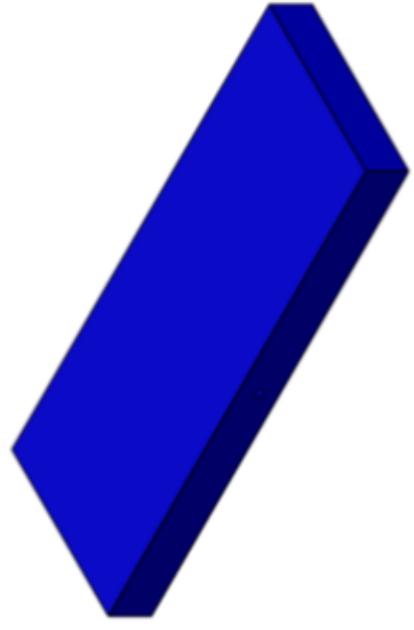
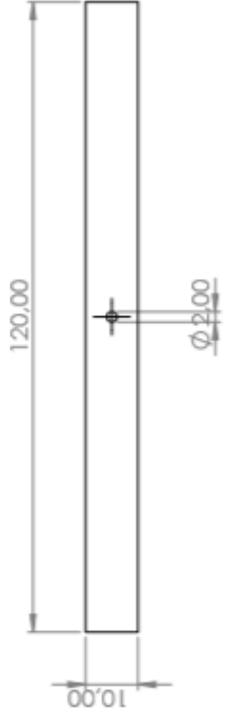


PLANOS TÉCNICOS ETAPA INSTRUMENTACIÓN



1:3 mm
Escala: 1:3
3 Desarrollo prototipo biosens

1:2 mm
Escala: 1:2
3 Desarrollo prototipo biosens



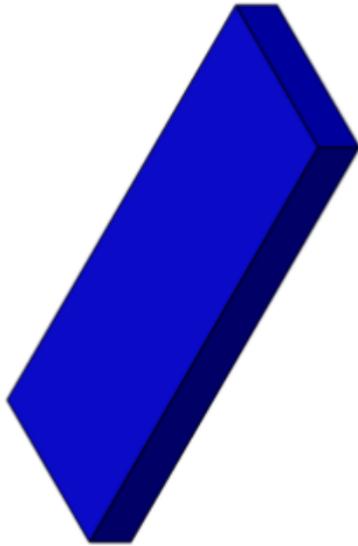
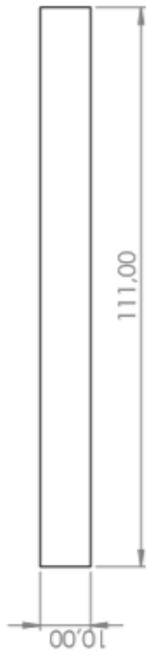
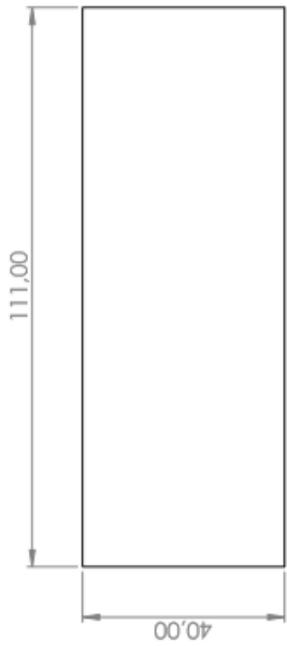
Nº DE ELEMENTO	Nº DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
24	Base estructura	1	Plástico PLA

Fecha	Autor:	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE
15/04/20	Julieth Carolina Montes	

Base Estructura

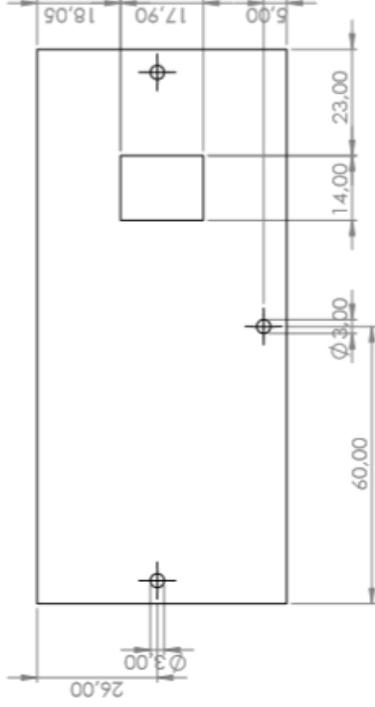
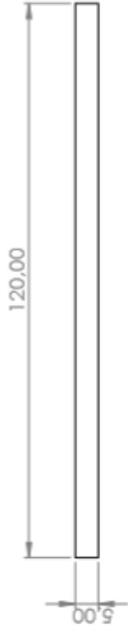
Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	5	Desarrollo prototipo bioens...

Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	2	Detalle bioajuste prototipo



N° DE ELEMENTO	N° DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
1	Base batería	1	Plástico PLA
Fecha	Autor:	 UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieith Carolina Montes		
Base Batería			
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	9	Desarrollo prototipo biosens...

Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	8	Desarrollo prototipo biosens...
Escala	Unidad	N° Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	10	Desarrollo prototipo biosens...

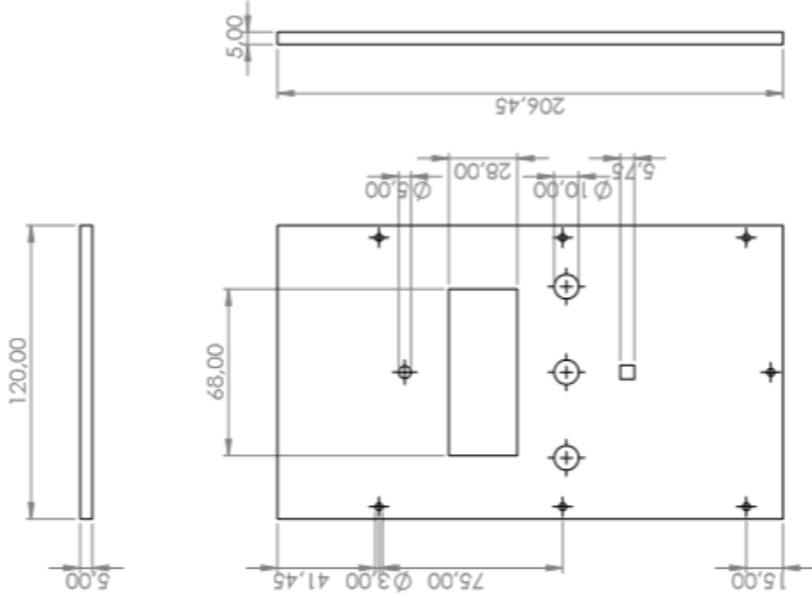


Nº DE ELEMENTO	Nº DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
7	Tapa batería	1	Plástico PLA

Fecha	Autor:	UNIVERSIDAD EL BOSQUE	
15/04/20	Julieth Carolina Montes		

Tapa Batería			
Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	10	Desarrollo prototipo biosensores

Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:1	mm	10	Desarrollo prototipo biosensores



Nº DE ELEMENTO	Nº DE PIEZA	CANTIDAD	MATERIAL
8	Tapa circuito electrónico	1	Plástico PLA
Fecha		Autor:	
15/04/20		Julieth Carolina Montes	
UNIVERSIDAD EL BOSQUE			
Tapa circuito electrónico			

Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:2	mm	11	Desarrollo prototipo biosensores

Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:3	mm	11	Desarrollo biosensores proteccion ambiental

Escala	Unidad	Nº Plano	Nombre Proyecto:
1:3	mm	11	Desarrollo biosensores proteccion ambiental

05



CONFIGURACIÓN

5.1. FUNCIONES PRINCIPALES



FUNCIONES ETAPA RECONOCIMIENTO:

Sistema de dosificación del agente oxidante

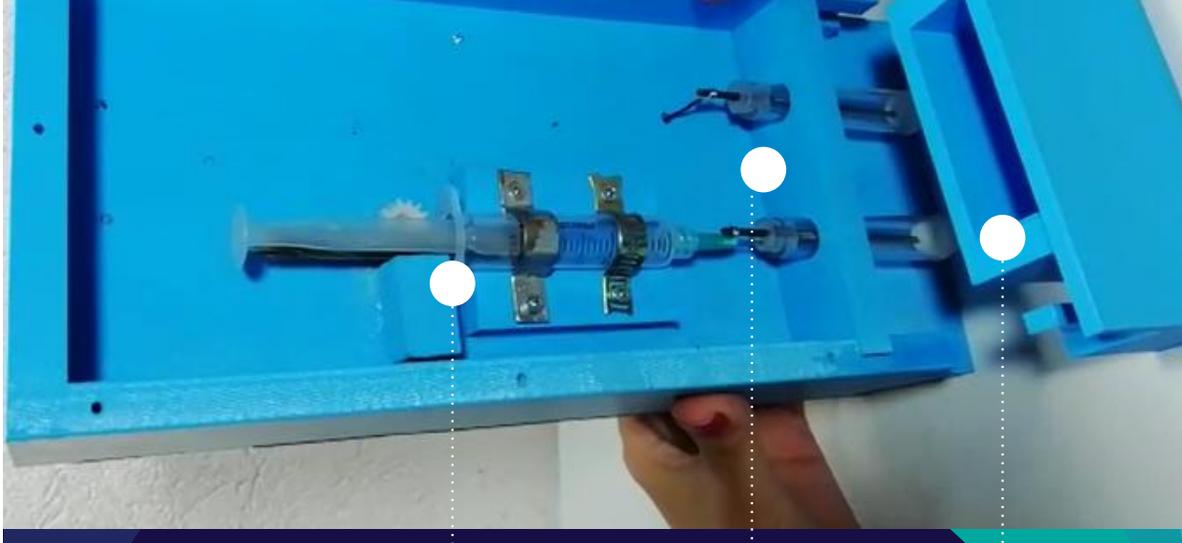
Se debe ir con el potenciómetro a la opción dosificación del menú, presionar el botón y esperar que el estado Off de la pantalla pase a On y nuevamente a Off. Dosifica 1 mL del agente en el electrodo de referencia.

Electrodo combinado

Permiten la transducción de la señal química obtenida de la reacción de los agentes químicos con la muestra de lactosuero en potencial eléctrico. Este debe entrar en contacto con la muestra.

Recipiente removible

En el recipiente se debe agregar 20 mL de la muestra de lactosuero a estudiar, esta cantidad es aproximadamente la mitad por debajo del borde superior del recipiente. Además de 127.95 mg del agente oxidante y dejarlo actuar por 3 min antes de ser acoplado al biosensor para su medición de lactosa.



5.1. FUNCIONES PRINCIPALES



FUNCIONES ETAPA INSTRUMENTACIÓN:

Switch encendido

Permite encender o apagar el prototipo de biosensor, va conectado a la fuente de alimentación (Batería recargable de 9 V).

LED indicador límite de lactosa

Diodo LED que sirve como alarma visual para conocer cuándo el lactosuero está por encima del límite permisible de lactosa (>400 mg).

Pantalla LCD

Guía al usuario a través de la visualización de un menú por mensajes simple para realizar tres funciones: mensaje bienvenida, estado dosificación y lectura de la muestra.

Botones vareadores

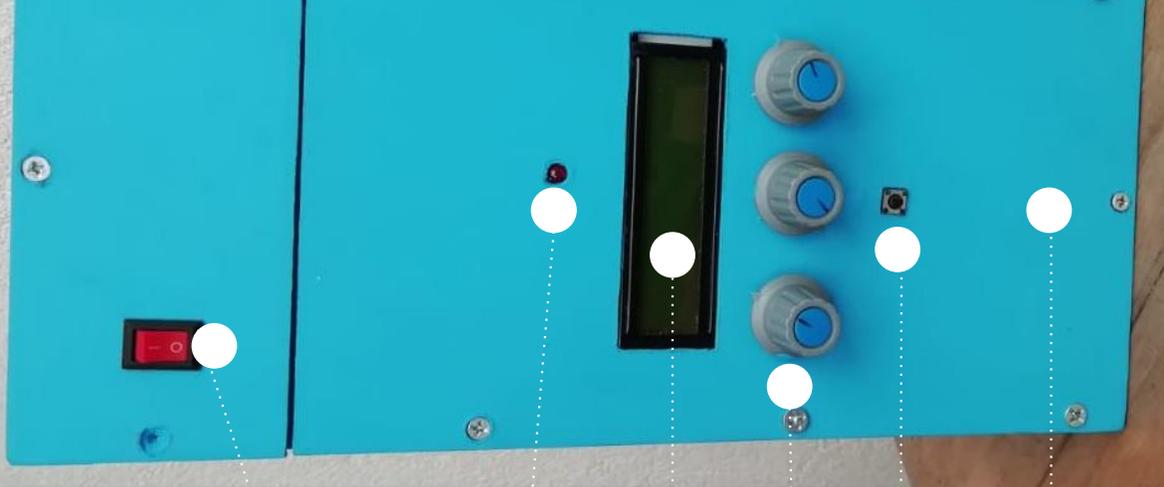
De derecha a izquierda hay tres botones: 1. Regulador intensidad luz pantalla, 2. Seleccionador del menú, 3. Calibrador lectura muestra.

Botón dosificación

Enciende el sistema de dosificación del agente oxidante en la etapa de reconocimiento del prototipo de biosensor.

Circuito electrónico

Sistema de acondicionamiento y procesamiento del potencial electrónico captado por el electrodo combinado para ser visualizado por el usuario en términos de mg.



5.2. PANTALLA BIOSENSOR

Mensaje de bienvenida

Es la primera opción del menú que indica al usuario que el prototipo de biosensor esta listo para ser dosificado y luego poder realizar la lectura de la muestra del lactosuero.



Estado dosificación

Mensaje simple que indica si el sistema de dosificación esta activo o no, mediante la visualización de la palabra Off u On.



Lectura de la muestra

Resultado de la cuantificación de la lactosa presente el lactosuero residual estudiado, por medio del mensaje lectura y su cuantificación en *mg*, para mejor interpretación por parte del usuario.



06



REALIZAR PRUEBA

Se considera como el conjunto de actividades que describen cómo realizar las mediciones, qué mediciones se esperarían y cómo adquirir la información de la respuesta de las etapas integradas del biosensor, todo con la finalidad de evaluar el desempeño del equipo. Este protocolo debe seguirse paso a paso y es necesario realizar la unificación de criterios para implementar un sistema práctico de evaluación de desempeño de este.

- Tomar las muestras de lactosuero residual, teniendo en cuenta que se debe llevar un recipiente estéril de 250 **mL** y elementos personales de seguridad para este fin. Una vez se toma la muestra del lactosuero residual en el recipiente, esta debe estar en almacenamiento en un refrigerador portátil con temperatura aprox 4 °C durante un periodo máximo de tres días antes de que alcancen una fermentación mayor.



- Se debe realizar la ficha técnica para el lactosuero a partir de la medición de algunos parámetros físico-químicos como lo son: temperatura (°C), pH y acidez (°D), a través de un potenciómetro y una titulación.

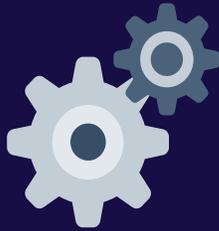
- Se realiza la preparación de la muestra de lactosuero colocándose 20 **mL** del mismo en el recipiente removible destinado a las muestras del biosensor, 127.95 **mg** del agente oxidante ácido clorhídrico, agitándose y dejándose actuar por 3 min (tiempo de estabilización de la reacción química).



- El prototipo de biosensor es encendido y se debe dirigir a la opción dosificación del menú y oprimir el botón de activación de este sistema, pasando del estado Off al estado On.
- Luego se acopla el recipiente removible al prototipo de biosensor, se selecciona la opción de lectura de la muestra y en la pantalla LCD se visualiza la concentración de lactosa detectada en la muestra de lactosuero.
- Posteriormente se retira el recipiente con la muestra analizada, se retira la tapa inferior del electrodo de referencia dejando que el agente oxidante pase al recipiente para ser depositado en un envase destinado para los desechos químicos.
- Una vez utilizado el biosensor, es limpiado, acoplado y dejado en un lugar fuera del alcance de las personas externas a su manipulación.



07



MANTENIMIENTO

- Se debe retirar el recipiente removible, lavarse con agua de la llave y jabón, posteriormente con agua desionizada y dejar secar.
- Se debe retirar los tornillos de cada una de las tapas con ayuda de un destornillador, se retiran las tapas teniendo cuidado en sus componentes acoplados.
- Para la etapa de reconocimiento se debe retirar la jeringa, lavarse con abundante agua de la llave, retirar los tubos de vidrio del electrodo combinado y lavarlos con agua de la llave y jabón. Dejar secar e instalar nuevamente.
- Por otro lado, para la etapa de instrumentación se retira la batería, se cambia por una recargada y esta es llevada al cargador, se verifica su conexión con el circuito electrónico y en este se verifica la conexión entre componentes como su paso de voltaje y corriente. Si se requiere cambiar algún componente o reforzar alguna conexión se debe realizar inmediatamente.
- La estructura internamente del prototipo como sus tapas deben ser limpiadas con una brocha delgada y con una toalla húmeda con agua desionizada y alcohol.
- Todos los elementos deben ser acoplados, las tapas aseguradas con los tornillos.



08

ESPECIFICACIONES



Especificaciones



Dimensiones

260 mm (L) x 120 mm (W)
x 80 mm (H)



Condición de operación

10 °C – 40 °C



Fuente de energía

1 batería alcalina
recargable de 9 V



Condición de almacenamiento

4 °C – 30 °C



Pantalla

LCD 16x2



Unidades de medición

mg



Salida externa

-Descarga automática de la muestra -Electrododos combinados -Solución de los agentes químicos
-Aviso de límite de lactosa -Dosificación automática



Rango de medición

50 mg – 500 mg

K. Bibliografía

Alcaldía de Sopó. (13 de Abril de 2020). Mi municipio, ecología. Obtenido de Alcaldía de Sopó: <http://www.sopo-cundinamarca.gov.co/MiMunicipio/Paginas/Ecologia.aspx>

Alegret, S., Del Valle, M., & Merkoci, A. (2004). Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.

ALPINA, S.A. (2013). VERTIMIENTOS ALPINA S.A.
Obtenido de <http://sgalpinasa123.blogspot.com.co/2013/08/sistema-de-gestion-ambiental-alpina-sa.html>

Álzate, E., Montes, J., & Escobar, R. (Agosto de 2012). Acondicionamiento del sensor de pH y temperatura para realizar titulaciones potenciométricas. Obtenido de Scientia Et Technica: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84923910028.pdf>

Amit, S., Rama, T., Shikhar, V., & Nishi, S. (2014). A novel method for quantification of lactose in mammalian milk through HPTLC and determination by a mass spectrometric technique. *Analytical Methods*, 7268-7276.

Amman, M., & Fransaer, J. (2010). Two-enzyme lactose biosensor based on -galactosidase and glucose oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, ScienceDirect, 583-589.

Arduino. (2008). Arduino Nano Manual.
Obtenido de <https://www.arduino.cc/en/uploads/Main/ArduinoNanoManual23.pdf>

Berg, J., Stryer, L., & Tymoczko, J. (2007). Bioquímica. España: Reverté.

Bernal, J. (18 de Octubre de 2012). Despliegue de la función calidad (QFD): Guía de uso. Para qué sirve el QFD y cómo realizarlo. Obtenido de Grupo PDCA Home.: <https://www.pdcahome.com/1932/qfd-despliegue-calidad/>

BIOLAN. (2017). Biosensor de lactosa en productos lácteos. BIOLAN, 1-2.

- Bollella, P., Schulz, C., & Favero, G. (2016). Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor. *Electroanalysis. An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices*, 77-86.
- Bonetto, M. (2013). Desarrollo de biosensores/bioensayos para la determinación rápida de parámetros indicadores de calidad de agua: Técnicas electroquímicas, BOD y toxicidad. Universidad de Buenos Aires, Argentina, 1-199.
- Campuzano, C. (2013). Medida de la concentración de lactosa. *SCRIBD*, 1-8.
- Cárdenas, G., & Sánchez, I. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. Scielo.
- Castaño, S. (2018). Control Automático Educación. Obtenido de Motot paso a paso arduino: <https://controlautomaticoeducacion.com/arduino/motor-paso-a-paso-arduino/>
- Castro, L., Luna, V., & Villalobos, L. (2007). ESTADO DEL ARTE Y PERSPECTIVAS DEL USO DE BIOSENSORES AMBIENTALES EN MÉXICO. *Revista internacional de contaminación ambiental*.
- Chen, A., & Shaha, B. (2013). Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry. *Journal Analytical Methods*, 1-16.
- Correa, Y., & Mosquera, W. (2015). Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima. *LIMENTECH*, 81-91.
- Cova, P., Yusmary, & Bompal, J. (6 de Julio de 2017). Acondicionamiento sensores generadores. Obtenido de Mediciones Industriales: <https://medind10ma.blogspot.com/2017/07/6-acondicionamiento-sensores-generadores.html>
- Crespo, E. (2017). Aprendiendo Arduino. Obtenido de Motor paso a paso con Arduino: <https://aprendiendoarduino.wordpress.com/tag/motor-paso-a-paso/>
- DANE. (2015). Sopó, Cundinamarca. Obtenido de Gobierno de Colombia, DNP: file:///C:/Users/user/Desktop/sopo_ficha_25758.pdf
- Dieter, G., & Linda, S. (2013). *Engineering Desing*. United States of America: Mac Graw Hill.
- Dorothee, G., Robert, M., Janos, V., & Erik, R. (2008). *Electrochemical Biosensors - Sensor Prin-*

ciples and Architectures. *Sensors*, 1400-1458.

Engineering Zone. (23 de 03 de 2018). Engineering Zone. Obtenido de Como hacer un Anova en Excel y Minitab?: <https://www.youtube.com/watch?v=YONmUo2iriM>

Espinosa, M. d., León, Y., & Rodríguez, X. (2013). Problemática de la determinación de especies nitrogenadas (nitrógeno total y amoniacal) en aguas residuales. *REVISTA CENIC, CIENCIAS QUÍMICAS*.

Estados Unidos Mexicanos, Secretaría de Economía. (2012). Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-155-SCFI-2012*, 1-19.

F, C., M, G., S, C., M, R., A, R., & J, P. (2010). An Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of Lactose in Milk and Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7141-7148.

Fusch, G., Choi, A., Rochow, N., & Fusch, C. (2011). Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC-tandem mass spectrometry. *ELSEVIER*, 31-62.

García, E., & Fernández, I. (2006). Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte. Universidad Politécnica de Valencia, 1-6.

Gerstner, C., Bernal, C., Marsili, N., Maccari, M., & Williner, M. (2014). Identification and quantification of sugars by micellarelectrokinetic chromatography in reverse phase in modified milk. *Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina*, 11-22.

González, E., & Darbyn, C. (Mayo de 2007). Sensores electroquímicos. Obtenido de Mediciones industriales Erika y Darbyn: <http://mierikaydarbyn.blogspot.com/2007/05/blog-post.html>

Goyal, R., Gupta, V., & Chatterjee, S. (2010). Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 252-258.

Gürsoy, O., Çelik, G., & Şen Gürsoy, S. (2014). Electrochemical Biosensor Based on surfactant doped polypyrrole (PPy) matrix for lactose determination. *Journal of Applied Polymer Science* 131.

HaiNguyen, B., ThanhNguyen, B., & Vu, H. (2015). Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminonaphthalene) film. *Current Applied Physics*,

135-140.

IDECUT. (2018). Sopó. Obtenido de IDECUT: <http://www.idecut.gov.co/index.php/sabana-centro/sopo>

Jaramillo, L. G. (2015). Contexto arqueológico y alcance social del estudio. En L. G. Jaramillo, Sopó en contexto: estudio arqueológico y documental sobre el poblamiento de la cuenca baja del río Teusacá (pág. 274). Bogotá: Uniandes.

Jasti, L., RaniDola, S., & Fadnavis, N. (2014). Co-immobilized glucose oxidase and β -galactosidase on bovine serum albumin coated allyl glycidyl ether (AGE)-ethylene glycol dimethacrylate (EGDM) copolymer as a biosensor for lactose determination in milk. *Enzyme and Microbial Technology*, 67-73.

Jiménez, C., & León, D. (2009). BIOSENSORS: IMPLEMENTATION AND OUTLOOK IN THE CONTROL AND PROCESS QUALITY AND FOODSTUFFS. *REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 144-154.

Jordá, C. (2018). DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO DE FOSFATO. Obtenido de Universidad de Alicante: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/94910/1/Desarrollo_de_sensores_electroquimicos_para_el_medio_mar_Jorda_Garcia_Celina.pdf

Kučerová, P., Komenská, P., & Tomková, H. (2017). Determination of lactose in milk products: a comparison of three-enzyme amperometric biosensor and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 517-524.

Liua, H., Lib, H., Yinga, T., Suna, K., Qina, Y., & Qia, D. (1998). Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, β -galactosidase and mutarotase in β -cyclodextrin polymer. *Analytica Chimica Acta*, 137-144.

Malhotra, B., Singhal, R., Chaubey, A., Sharma, S., & Kumar, A. (2005). Recent trends in biosensors. *Current Applied Physics* 5, 92-97.

Manizales, U. C. (2017). Importancia del análisis de contaminantes. Universidad Católica de Manizales.

Mapas y Guías. (2018). Datos generales de Sopó. Obtenido de Mapas y Guías: <http://sopo.info/datos-generales-de-sopo/>

Méndez, M., Briceño, J., & González, A. (2009). Oxidación electroquímica de compuestos orgánicos

de un efluente proveniente de una planta procesadora de productos lácteos. Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela.

MERSEN. (2017). MERSEN. Obtenido de VENTAJAS DEL GRAFITO:
<https://www.edm.mersen.com/es/ventajas-del-grafito/>

MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. (18 de Abril de 2015). ICBF. Obtenido de https://www.redjurista.com/Documents/resolucion_631_de_2015_ministerio_de_ambiente_y_desarrollo_sostenible.aspx#/

Montero, M. (28 de Junio de 2019). Biosensor de sudor alimentado por NFC para glucosa y lactato. Obtenido de Tecnoticias: <https://tecnoticias.net/2019/06/28/biosensor-de-sudor-alimentado-por-nfc-para-glucosa-y-lactato/>

Montilla, F. (15 de Noviembre de 2015). Investigadores de la UA desarrollan biosensores más eficaces para el control de los niveles de glucosa. Obtenido de Universidad de Alicante: <https://web.ua.es/es/actualidad-universitaria/2015/noviembre2015/noviembre2015-9-15/investigadores-de-la-ua-desarrollan-biosensores-mas-eficaces-para-el-control-de-los-niveles-de-glucosa.html>

Municipios de Colombia. (2020). Sopó. Obtenido de Municipios de Colombia:
<https://www.municipio.com.co/municipio-sopo.html#territory>

Oliva, J. (2014). PIC PC. Obtenido de PIPETA O DOSIFICADORA DE LÍQUIDO AUTOMÁTICA CASERA.: http://www.picpc.es/pipeta_dosif_autom_casera.html

Pérez, J. d., Rincón, S., & Fuentes, F. (2014). Development and testing of an electrode for determination of potassium chloride and potassium bromide. *Tecnología en marcha*, 80-87.

Ramírez, R., Hernández, K., Ibañez, L., & San Juan, M. (2018). SIGAM SOPÓ (CUNDINAMARCA). Obtenido de emaze: <https://www.emaze.com/@ALRCTZRT>

Rivas, J., Baltasar, M., & Moreno, V. (2016). DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PEROXIDASA EN EXTRACTOS CRUDOS DE DIFERENTES VEGETALES. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 1.

Ruíz, Á., & Garcés, L. (2007). Tratamiento de aguas residuales. *Producción+limpia*, 1-24.

Ruíz, J. (2006). Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria. Universidad Autónoma de Barcelona, 1-244.

Sánchez, C., Rosales, M., & Bustamante, A. (2015). Modelo de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica en una base probiótica y simbiótica. *Revista Tecnológica ESPOL*, 53-68.

Shareaholic. (24 de 02 de 2014). Aguas Industriales. Obtenido de Depuradora de Aguas Residuales industria láctea – Aspectos Medioambientales que todo responsable de calidad debe controlar: <http://aguasindustriales.es/depuradora-de-aguas-residuales-industria-lactea-aspectos-medioambientales-que-todo-responsable-de-calidad-debe-controlar/>

SOCIAL, M. D. (2006). DECRETO NUMERO 616 DE 2006. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 1-32.

Society, A. C. (2005). *Química: un proyecto de la American Chemical Society*. Barcelona: Reverte.

Solís, P. (2011). Universidad de Oviedo. Obtenido de Modificación superficial de materiales de: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/34323/1/TESIS-Pablo%20Solis.pdf>

SOSA, M., & GALVIS, P. (2010). CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOX) (EC 1.1.3.4.) LIBRE E INMOVILIZADA EN DOS SOPORTES (ALGINATO DE SODIO Y AGAROSA) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO. UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA “UNAD”, 1-117.

Stoica, L., Ludwig, R., Haltrich, D., & Gorton, L. (2005). Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase. *Analytical Chemistry*, 393-398.

Suárez, L. (2010). Minería Chilena. Obtenido de ¿Sustituirá el grafeno al cobre?: <https://www.mch.cl/reportajes/sustituira-el-grafeno-al-cobre/#>

TIEMPO. (19 de 05 de 2016). CONTAMINACION ACOSA A TOCANCIPA Y SOPO. EL TIEMPO.

Unichimtek. (2020). Sellamientos. Obtenido de Unichimtek: <http://es.unichimtek.com/products/seals/>

Xu, Z., Chen, X., Qu, X., Jia, J., & Dong, S. (2004). Single-wall carbon nanotube-based voltammetric sensor and biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 579-584.