



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

*“Desarrollo de sensores nanoestructurados
basados en nanopartículas para el análisis de
fenoles de interés en alimentación”*

Autor:

Duque Hernández, Patricia

Tutor:

Rodríguez Méndez, María Luz
Departamento Química Física y
Química Inorgánica

Valladolid, Julio 2016.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la profesora D^a. María Luz Rodríguez Méndez la oportunidad que me ha dado de formar parte de su equipo de investigación, los valiosos conocimientos aportados en estos meses, la orientación durante la realización del proyecto y el excelente trato con el que me ha concedido la posibilidad de aprender.

A la profesora D^a. Cristina García Cabezón, por ayudarme a llevar a la práctica los conocimientos y objetivos fijados en este proyecto, durante todas las horas de trabajo empleadas en el laboratorio.

También, a mis compañeras de laboratorio, por ofrecerme en el día a día su ayuda y apoyo durante la realización de este proyecto.

Además, expresar el agradecimiento a los siguientes proyectos de investigación por su financiación:

- ✓ “Prototipo de lengua electrónica basada en sensores nanoestructurados para el análisis de vinos y mostos. Correlaciones con otras técnicas”, financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Referencia: AGL2015-67482-R

- ✓ “Desarrollo de sensores y biosensores nanoestructurados para la detección de antioxidantes de interés en alimentación”, financiado por la Junta de Castilla y León.

Referencia: VA-032U13

Por último, agradecer a mi madre todo el esfuerzo y sacrificio realizado durante estos años, dándome con ello la oportunidad de estudiar y de elegir mi futuro. A mi hermano, por alegrar cada momento haciendo más ameno el camino que tantas veces se complicó. A Carlos, por su apoyo incondicional y por estar a mi lado cada día.



["Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación"]

RESUMEN

En este Trabajo Fin de Grado se describe la fabricación de electrodos de pasta de carbono modificados con tres tipos de nanopartículas de óxidos metálicos (TiO_2 , NiO y CeO_2). Cada electrodo ha sido ensayado en cuatro antioxidantes distintos, compuestos fenólicos presentes en alimentos y bebidas, con objeto de determinar el efecto electrocatalítico de las nanopartículas empleadas y otras ventajas que ofrecen en su uso frente a los electrodos de pasta de carbono sin modificar.

Se ha determinado el límite de detección de cada electrodo en los distintos antioxidantes y se ha creado una red de sensores (lengua electrónica) que acoplada a un análisis estadístico multivariable (Análisis de Componentes Principales, PCA) es capaz de discriminar y clasificar los distintos tipos de antioxidantes analizados en función del número de grupos hidroxilo presentes en su estructura, haciendo evidente su utilidad en distintas aplicaciones relacionadas con la industria agroalimentaria.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas de óxidos metálicos, Sensor, Actividad electrocatalítica, Lengua electrónica, Compuestos fenólicos.



["Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación"]

ABSTRACT

In this Degree's Final Project, the manufacture of carbon paste electrodes modified with three types of metal oxide nanoparticles (TiO_2 , NiO , CeO_2) is described. Each electrode has been tested in four different antioxidants, phenolic compounds present in foods and beverages, with the aim to determine the electrocatalytic effect of nanoparticles used and other advantages offered in use compared with carbon paste electrodes unmodified.

The detection limit of each electrode in some antioxidants has been determined, and a network of sensors (electronic tongue) has been created. This network coupled a multivariate statistical analysis (Principal Component Analysis, PCA) which is able to discriminate and classify the different types of antioxidants analyzed in terms of number of hydroxyl groups present in its structure; this fact shows the usefulness in different applications related to the food industry.

KEYWORDS: Metal oxide nanoparticles, Sensor, Electrocatalytic activity, Electronic tongue, Phenolic compounds.



["Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación"]

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 5 |
| CONTENIDO | 7 |
| ABREVIATURAS | 11 |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1. Justificación | 13 |
| 1.2. Objetivos | 15 |
| CAPÍTULO II: ESTADO DEL ARTE, FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS | 17 |
| 2.1. Nanociencia y Nanotecnología | 17 |
| 2.1.1. Breve descripción histórica | 19 |
| 2.1.2. Propiedades de lo nano..... | 21 |
| 2.1.3. Aplicaciones de la Nanotecnología | 23 |
| 2.2. Nanopartículas y nanomateriales. | 25 |
| 2.2.1. Técnicas de fabricación de nanopartículas y nanomateriales..... | 27 |
| 2.2.2. Clasificación de nomateriales | 30 |
| 2.3. Nanopartículas de óxidos metálicos en electroanálisis..... | 32 |
| 2.3.1. Óxido de titanio (IV), TiO ₂ | 34 |
| 2.3.2. Óxido de cerio (IV), CeO ₂ | 36 |
| 2.3.3. Óxido de níquel (II), NiO | 37 |
| 2.4. Métodos químicos e instrumentales..... | 39 |
| 2.4.1. Breve panorama histórico | 39 |
| 2.4.2. Instrumentos analíticos | 41 |
| 2.4.3. Características de los métodos instrumentales | 42 |
| 2.4.4. Variables analíticas a considerar en la aplicación de un método instrumental | 42 |
| 2.4.4.1. Precisión..... | 42 |
| 2.4.4.2. Exactitud..... | 42 |
| 2.4.4.3. Límite de detección y sensibilidad | 43 |
| 2.4.4.4. Selectividad..... | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.4.5. Rapidez..... | 45 |
| 2.4.4.6. Coste..... | 45 |
| 2.5. Métodos electroanalíticos..... | 46 |
| 2.5.1. Desarrollo de un método electroanalítico | 47 |
| 2.5.2. Clasificación de los métodos electroanalíticos | 51 |
| 2.5.3. Voltamperometría..... | 53 |
| 2.5.5.1. Voltamperometría de barrido lineal..... | 53 |
| 2.5.5.2. Voltamperometría cíclica..... | 54 |
| 2.5.5.3. Voltamperometría hidrodinámica | 57 |
| 2.5.5.4. Voltametría diferencial de pulsos | 57 |
| 2.5.5.5. Voltametría de redisolución | 58 |
| 2.6. Sensores | 59 |
| 2.7. Antioxidantes | 63 |
| 2.8. Lenguas electrónicas | 66 |
| 2.8.1. Concepto y evolución histórica..... | 66 |
| 2.8.2. Justificación del uso de lenguas electrónicas | 68 |
| 2.8.3. Características y ventajas de las lenguas electrónicas | 69 |
| 2.8.4. Aplicaciones de las lenguas electrónicas | 70 |
| 2.8.5. Lengua electrónica voltamétrica..... | 71 |
| 2.9. Análisis de componentes principales (PCA)..... | 72 |
| CAPÍTULO III: DESARROLLO EXPERIMENTAL..... | 75 |
| 3.1. Electrodo de trabajo. Procedimiento de fabricación de los electrodos de pasta de carbono (EPC) | 75 |
| 3.1.1. Materiales utilizados..... | 75 |
| 3.1.2. Compuestos empleados..... | 76 |
| 3.1.3. Preparación de la pasta..... | 78 |
| 3.1.4. Preparación de los electrodos..... | 81 |
| 3.1.5. Llenado de los electrodos con la pasta | 84 |
| 3.2. Electrodo de referencia..... | 87 |
| 3.3. Contraelectrodo o electrodo auxiliar | 88 |
| 3.4. Montaje de la celda electrolítica | 90 |
| 3.5. Software | 93 |

| | |
|--|------------|
| 3.6. Reactivos y disoluciones..... | 97 |
| 3.6.1. Buffer fosfato (Solución tampón/amortiguadora)..... | 99 |
| 3.6.2. Cloruro de potasio (KCl)..... | 100 |
| 3.6.3. Catecol..... | 100 |
| 3.6.4. Ácido cafeico..... | 101 |
| 3.6.5. Ácido vanílico..... | 102 |
| 3.6.6. Ácido pirogálico o Pirogalol..... | 102 |
| 3.7. Ensayos electroquímicos realizados..... | 103 |
| 3.7.1. Respuesta ante electrolitos básicos: Buffer fosfato..... | 104 |
| 3.7.2. Respuesta ante antioxidantes..... | 104 |
| 3.7.3. Cálculo de límites de detección..... | 105 |
| 3.7.4. Lengua electrónica y tratamiento de datos mediante PCA..... | 110 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 113 |
| 4.1. Respuesta ante electrolitos básicos: Buffer fosfato..... | 113 |
| 4.2. Detección de antioxidantes con sensores..... | 119 |
| 4.2.1. Ácido vanílico..... | 120 |
| 4.2.2. Ácido cafeico..... | 124 |
| 4.2.3. Catecol..... | 126 |
| 4.2.4. Pirogalol..... | 129 |
| 4.3. Límites de detección..... | 131 |
| 4.3.1. Ácido vanílico..... | 132 |
| 4.3.2. Ácido cafeico..... | 134 |
| 4.3.3. Catecol..... | 137 |
| 4.3.4. Pirogalol..... | 140 |
| 4.4. Lengua electrónica..... | 144 |
| 4.4.1. PCA aplicada al ciclo de reducción..... | 144 |
| 4.4.2. PCA oxidación..... | 146 |
| 4.4.3. PCA voltamograma completo..... | 148 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES..... | 151 |
| ANEXO I..... | 153 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 159 |



[“Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación”]

ABREVIATURAS

NPs: nanopartículas

NM: nanomaterial

NP-OM: nanopartículas de óxidos metálicos

NP-TiO₂: nanopartículas de óxido de titanio (IV)

NP-CeO₂: nanopartículas de óxido de cerio (IV)

NP-NiO: nanopartículas de óxido de níquel (II)

EPC: electrodo de pasta de carbono

CE: contraelectrodo

RE: electrodo de referencia

WE: electrodo de trabajo

LD: límite de detección

Redox: reacciones de oxidación-reducción

PCA: Análisis de componentes principales



[“Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación”]

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

La industria alimentaria es la industria encargada de la elaboración, transformación, preparación, conservación y envasado de los alimentos de consumo humano y animal. En España la industria agroalimentaria desempeña un papel clave en el conjunto de los sectores económicos, ocupando un primer lugar en la rama industrial. Está continuamente innovándose, reinventándose y adaptándose a las nuevas tecnologías y exigencias de los consumidores [1].

El grupo de investigación, UvaSens, en el que he colaborado para la realización del presente Trabajo de Fin de Grado, pertenece a la Escuela de Ingenieros Industriales de la Uva. Este equipo se centra en el desarrollo de sensores que permitan detectar componentes en el ámbito de la alimentación, siendo el principal campo de aplicación el análisis de mostos y vinos. Uno de los objetivos principales es mejorar los sensores actuales en aspectos como, sensibilidad, límite de detección, rapidez del análisis y coste, con objeto de satisfacer las necesidades de una industria en continua evolución.

Los fenoles son compuestos presentes en alimentos y bebidas, tales como manzanas, aceite de oliva, vinagre, sidra y vino. La importancia en la detección de estos compuestos reside en que son compuestos antioxidantes que contribuyen a la calidad del producto, influyendo en sus características organolépticas, y en la conservación del mismo: retrasan el deterioro del aspecto de los alimentos debido a su oxidación, como por ejemplo, la decoloración en la carne o productos cárnicos o la aparición de manchas marrones en frutas y vegetales [2]. Además, presentan propiedades anti-trombóticas, anti-bacterianas, anti-alérgicas y anti-inflamatorias que, junto con su empleo en la prevención del cáncer y de enfermedades cardiovasculares, hacen de los fenoles sustancias de altísimo interés en esta industria [3].

En los últimos años, se ha desarrollado un nuevo método basado en el uso de sensores de pasta de carbono modificados con nanopartículas, que faciliten la detección de estas sustancias de interés. En base a esta idea, en este proyecto se han desarrollado una serie de sensores modificados con nanopartículas de óxidos metálicos para estudiar las ventajas, tales como sensibilidad y especificidad, que estos ofrecen respecto a los sensores tradicionales. Dichas ventajas observadas, se atribuyen a las propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas y al aumento del área de la superficie del electrodo disponible para el intercambio de electrones que estas proporcionan [4].

La legislación en la industria alimentaria es cada vez más estricta en cuanto a la calidad de los productos, lo cual ha motivado a los científicos a crear una nueva técnica para analizar líquidos de composición compleja, conocida como lengua electrónica. La calidad de los productos está relacionada con sus características organolépticas, las cuales se determinan mediante un panel de expertos catadores. La capacidad sensitiva de estos, se limita con el tiempo y las condiciones ambientales pueden afectar a la objetividad del experto y, por tanto, a la reproducibilidad de las medidas. Por estas razones, resulta evidente la necesidad de desarrollar sistemas automatizados de análisis que permitan medir el sabor y, además, controlar la calidad de los alimentos. Las lenguas electrónicas funcionan en este sentido, pueden clasificar distintos sabores, detectar productos que alteren la calidad del alimento, impurezas y sustancias tóxicas, siempre con una elevada objetividad y respuesta constante con el tiempo [5].

Trabajando en esta línea, se han realizado los ensayos pertinentes en analitos de origen fenólico y tratado los datos mediante Análisis de Componentes Principales (PCA), para crear una lengua electrónica que nos permita distinguir entre los distintos componentes fenólicos (en base a la cantidad de grupos fenol presentes en la estructura) concurrentes en una muestra compleja.

1.2. Objetivos

El objetivo fundamental del proyecto es desarrollar distintos tipos de electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de varios óxidos metálicos (TiO_2 , NiO y CeO_2) y determinar las diferencias respecto de los electrodos sin modificar al aplicarlos en la detección de antioxidantes. Se pretende analizar el efecto electrocatalítico de las distintas nanopartículas, así como y su influencia en el límite de detección. Podemos dividir este objetivo global en tres partes:

- ✓ Se estudiará el efecto electrocatalítico de las distintas nanopartículas de óxidos metálicos empleadas en la oxidación y reducción del agua.
- ✓ Se comparará la intensidad de la señal obtenida en la reducción y oxidación de cada analito, en base a una intensidad de referencia, que se considera que es la de los electrodos de pasta de carbono sin modificar. Con esto se pretende cuantificar el incremento en la señal que ofrecen distintos electrodos modificados.
- ✓ Se calculará el límite de detección de cada electrodo en cada analito para conocer que electrodo es el que más sensibilidad ofrece.

El segundo objetivo es desarrollar una lengua electrónica que permita discriminar los compuestos fenólicos (catecol, pirogalol, ácido vanílico y ácido cafeico) cuando estos se encuentren en una muestra de composición desconocida. Para ello, se realizan los ensayos electroanalíticos correspondientes, empleando la técnica de voltametría cíclica, y se tratan los datos mediante análisis multivariante, en concreto, se aplica la técnica Análisis de Componentes principales (PCA) a la curva de oxidación, reducción y al voltamograma completo.

El motivo de realizar la PCA en los tres casos citados anteriormente, es comprobar cuál de ellos contiene más información y por tanto, será más conveniente emplear en trabajos futuros.



[“Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación”]

CAPÍTULO II: ESTADO DEL ARTE,

FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES

BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Nanociencia y Nanotecnología.

La Nanociencia y la Nanotecnología pueden considerarse como la ciencia y la tecnología que se ocupan del estudio y manipulación de estructuras a nivel nano. En dicho nivel, las cosas se miden en nanómetros o una mil millonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).

La ciencia comprende teoría y experimentación, mientras que la tecnología conlleva desarrollo, aplicaciones e implicaciones comerciales. Sin embargo, ambas disciplinas están totalmente unidas y relacionadas (Imagen 2.1).

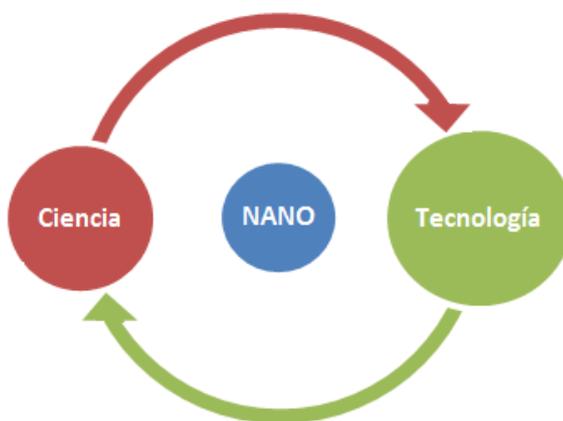


Imagen 2.1: Interacción entre Nanociencia y Nanotecnología

La Nanociencia y la Nanotecnología tienen múltiples significados en función de los distintos matices aportados por cada autor. En primer lugar, definiremos la nanoescala del modo siguiente:

“La nanoescala, basada en el nanómetro (nm) o la mil millonésima parte del metro, existe específicamente entre 1 y 100 nm”.

Con la definición anterior, podemos establecer el significado de los dos términos que nos ocupan:

“La Nanociencia es el estudio de los materiales que pertenecen a la nano escala. Estos materiales presentan extraordinarias propiedades, funciones y fenómenos debido a sus pequeñas dimensiones”.

“La Nanotecnología, basada en la manipulación, control e integración de átomos y moléculas en materiales, estructuras, componentes, aparatos, y sistemas en la nano escala, es la aplicación de la Nanociencia, especialmente con fines industriales y comerciales”.

La plataforma académica comúnmente conocida como Ciencia de Materiales, es la más cercana a parecerse a la Nanociencia. Aunque ambas son interdisciplinarias por su propia naturaleza, la Nanociencia trasciende los límites de la Ciencia de Materiales por añadir la biología y la bioquímica dentro de sus disciplinas (Imagen 2.2). Por ser una ciencia interdisciplinar, para consolidar conocimientos en ella es necesario construir capacidades en las distintas áreas que la potencian.

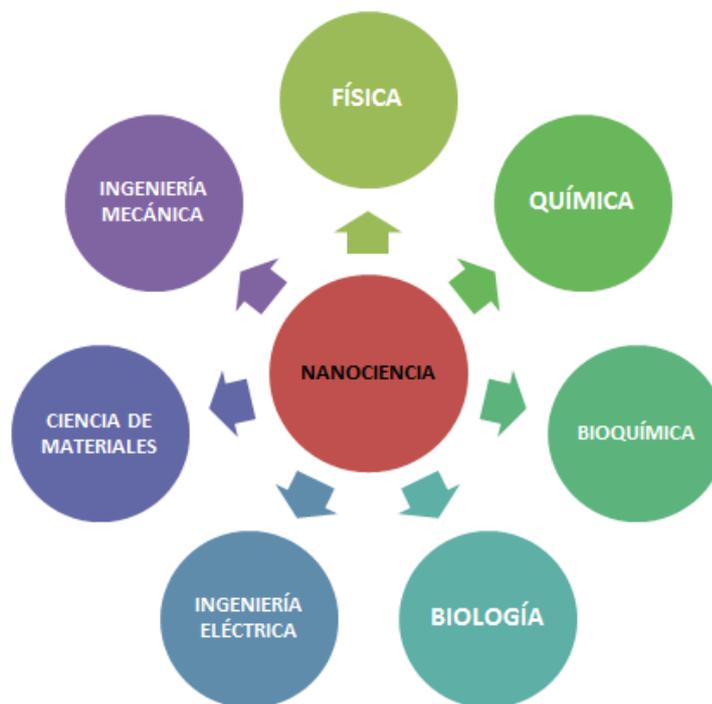


Imagen 2.2: Disciplinas comprendidas por la Nanociencia

Distintos sectores industriales como el aeroespacial, biotecnológico, energético, transporte, sanitario, telecomunicaciones e información, dependen de materiales y dispositivos, los cuales están formados por átomos y moléculas, por ello, pueden ser mejorados mediante el uso de nanomateriales.

La Nanotecnología es una tecnología base con un potencial impacto en el resto de las industrias, mientras que la Nanociencia permite una integración horizontal interdisciplinaria de todas las ciencias y disciplinas de ingeniería [6-7].

2.1.1. Breve descripción histórica

Del concepto de átomo encontramos evidencias desde el año 600 a.C. en India, pero fue John Dalton y su “ley de las proporciones múltiples” quien en 1805 afirmó que los elementos estaban constituidos por átomos.

La Nanociencia era una parte de nuestra herencia mucho antes del que el concepto nano entrase a escena, y los coloides metálicos (componentes de catalizadores, cristales coloreados, tintes o materiales fotográficos finamente divididos) son el mejor ejemplo de ello. Desde la antigüedad se ha trabajado con objetos pequeños o átomos, la novedad reside en el poder de control en la manipulación de los mismos.

El físico norteamericano Richard Feynman, en 1959, describió un proceso mediante el cual afirmaba que podríamos desarrollar la habilidad para manipular átomos y moléculas individuales, señalando que surgirían problemas asociados con el escalamiento de las fuerzas físicas: la gravedad se haría menos significativa, mientras que las fuerzas de tensión superficial o fuerzas de Van der Waals, adquirirían gran importancia.

En el año 1974, el ingeniero japonés Norio Taniguchi, definió el término Nanotecnología por primera vez.

El surgimiento de la Nanotecnología en la década de 1980 fue causado por la convergencia de varias invenciones experimentales como el microscopio de efecto túnel (1983; G. Binnig y H. Rohrer investigadores de

los laboratorios de IBM en Zurich), el descubrimiento del fullereno (1985; R. Smalley, R. Curi y H. Kroto) y los avances en ciencias interfaciales y de coloides. En 1989, G. Binnig desarrolló el microscopio de fuerzas atómicas.

Eric Drexler escribió en 1986 su libro *“Engines of creation: The coming era of nanotechnology”*, donde recogió su visión particular sobre la Nanotecnología, conocida como Nanotecnología Molecular. Un año después, Donald Cram, Charles Petersen y Jean-Marie Lehn, ganaron el premio Nobel por su trabajo en química supra-molecular, asentando las bases para el auto-ensamblaje molecular. En 1991, Iijima descubre los nanotubos de carbono, los cuales son hasta cien veces más resistentes que el acero, pero más ligeros y flexibles [8-9].

A partir del siglo XX, se han desarrollado nuevas técnicas, como la litografía o la abrasión electrónica, iónica o fotónica, con las que se han conseguido construir objetos de tamaños nanométricos, tales como un transistor de silicio de 60 nanómetros de ancho, un motor nano-mecánico, un circuito lógico o raquetas de tenis reforzadas usando nano-tubos de carbón.

La nanotecnología ha tomado gran relevancia en el mundo actual y se encuentra en pleno desarrollo, constituyendo un sector de investigación e innovación altamente competitivo. Los desarrollos generados en este campo tecnológico afectan a muchos sectores y mercados de la vida económica, empresarial y científica, por lo que tiene la capacidad de cambiar la forma en la que vivimos.

Encontramos aplicaciones en sectores tales como química y materiales avanzados, defensa, aeroespacial, tecnologías de la información y comunicación, producción y distribución de energía, transporte, construcción, agricultura, medicina, medio ambiente o farmacéutico.

El uso de la nanotecnología en estos sectores permite el desarrollo de nuevos productos y la mejora de los ya existentes, siendo muchos los expertos que ya la consideran como la próxima Revolución Industrial.

Los avances generados en la nanotecnología son liderados por las grandes empresas y los países desarrollados, los cuales disponen de equipos, investigadores, infraestructuras, presupuesto y tecnología para explotar las múltiples alternativas que dicho campo ofrece. Los países líderes por producción científica en Nanotecnología son Estados Unidos, Japón, Alemania, China, Inglaterra, Francia, Corea del Sur, Taiwan, Italia y España. Tales países concentran el 90 % de las publicaciones científicas sobre nanofabricación.

Por ser un campo en evolución, a partir del año 2001 presenta dinámicas crecientes en publicaciones científicas, patentes, en la investigación de nuevos métodos de fabricación nanotecnológica (fabricación molecular, se espera que se consolide en el 2020) y en la mejora de los ya existentes (Bottom-Up y Top-Down). En un análisis regional se observa que la región más representativa en publicaciones científicas es Europa con un total del 41%, disponiendo de 241 centros de investigación y laboratorios de Nanotecnología.

España cuenta con tres empresas, entre las más importantes del mundo, destinadas al desarrollo de productos, especialmente en nanotubos de carbono, fabricación y empleo de biomateriales, nanopartículas y nanomateriales [4].

2.1.2. Propiedades de lo nano

Dos fenómenos importantes aparecen cuando se reduce el tamaño de la materia hasta la escala nanométrica:

- ✓ **Alta relación superficie/volumen o mayor área superficial relativa**

Cuando reducimos el tamaño de la materia nos encontramos con que la cantidad de átomos que contiene la nanopartícula sobre su superficie es mayor al localizado en el interior del núcleo. Este efecto, junto con el aumento del área superficial, incrementa la reactividad química de la superficie de las nanopartículas. Sin embargo, este aumento del número de átomos en la

superficie incrementa la energía libre superficial (fuerzas de atracción de Van der Waals) y las nanopartículas tienden a atraerse entre sí y a aglomerarse reduciéndose su reactividad química. Cuando se trabaja con nanopartículas es importante controlar este efecto, para lo cual se estabilizan las nanopartículas mediante funcionalización o bioconjugación. Reduciendo su energía libre superficial, se consigue que las nanopartículas se acoplen estructuralmente entre sí siguiendo una ruta química predeterminada que genere la estructura atómica deseada la cual, a su vez, determinará las propiedades de la nanopartícula.

El gran área superficial de las nanopartículas tiene una gran importancia y es aprovechada en muchas aplicaciones tales como la catálisis. En concreto, la catálisis heterogénea tiene un enorme impacto sobre la economía mundial ya que más del 90 % de las industrias químicas utilizan catalizadores. Los materiales inorgánicos constituyen un tipo de catalizador muy utilizado en la industria, siendo los nanomateriales los que ofrecen más selectividad y reactividad que los materiales de mayor tamaño.

Un catalizador reduce la energía de activación de la reacción sin ser consumido, ya que aporta su energía libre procedente de la superficie. Como se ha apuntado anteriormente, la gran cantidad de átomos presentes en la superficie de las nanopartículas incrementa su energía libre superficial. Cuánta mayor sea la cantidad de energía libre superficial, más energía se invertirá en disminuir la energía de activación y mayor será el efecto catalítico. Esto hace que las nanopartículas sean excelentes catalizadores. Además, para favorecer una actividad catalítica se requiere un área superficial elevada, especialmente si el objetivo es una alta velocidad de producción industrial. Esto constituye nuevamente una propiedad intrínseca de las nanopartículas, que incrementa aún más su poder catalítico.

La estructura de la partícula y su morfología (el tamaño y la forma), así como su composición química y el estado de oxidación, son otros factores importantes que afectan a la actividad catalítica de las nanopartículas [11].

✓ Confinamiento cuántico de electrones y huecos del material.

Las nanopartículas y los materiales nanoestructurados tienen, al menos, una dimensión de un tamaño menor de 100 nm, por lo que los electrones están restringidos a moverse en una región del espacio muy pequeña, se dice que están confinados.

Al reducirse el espacio para el movimiento de los electrones, se modifica la estructura electrónica (los electrones confinados pasan a ocupar diferentes niveles de energía) y se produce una cuantización de los niveles de energía. Comienza a observarse lo que se denomina “confinamiento cuántico” el cual puede producirse en una, en dos o en tres dimensiones.

Como consecuencia del confinamiento electrónico los nanomateriales manifiestan propiedades ópticas, eléctricas, electrónicas, electromagnéticas y magnéticas, distintas a las partículas más grandes, surgiendo nuevas aplicaciones de gran interés [12].

2.1.3. Aplicaciones de la Nanotecnología

Pese a tratarse de una disciplina reciente y en fase de investigación y desarrollo, muchas de las aplicaciones de la Nanotecnología ya se encuentran disponibles en el mercado, en sectores tan diversos como las telecomunicaciones, la electrónica, la medicina, las energías renovables, la construcción, la alimentación, la industria textil, la agricultura, la cosmética, el deporte, entre otros, y ya reportan grandes ganancias tanto a la empresa pública como a la privada [13]. Algunas de estas aplicaciones de las que ya podemos disfrutar son las siguientes:

- Cosméticos y cremas fotoprotectoras que incluyen nanopartículas de óxido de titanio.
- Materiales textiles en cuya confección se emplean nanopartículas hidrófobas (Imagen 2.3) y bactericidas.



Imagen 2.3: Tejido con NP hidrófobas

- Pasta de dientes con nanopartículas que mejoran la absorción del flúor al esmalte.
- Sistemas de ventilación con filtros antibacterianos fabricados con nanopartículas de plata.
- Nanopartículas hidrófobas empleadas en la fabricación de vidrios y cristales.
- Combustibles con catalizadores a base de nanopartículas de óxido de cerio.
- Material sanitario con nanopartículas antibacterianas.
- Biomarcadores ópticos basados en nanopartículas de silicio.
- Procesadores más potentes y de menor tamaño.
- Pigmentos en pinturas que aumentarán su resistencia.
- Otros: piezas dentales, envases para alimentos, neumáticos, material deportivo, etc.

Algunas de las aplicaciones que están en desarrollo, se citan a continuación:

- Dispositivos médicos: nanotransportadores de fármacos a lugares específicos del cuerpo que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer u otras enfermedades, biosensores moleculares con la capacidad de detectar alguna sustancia de interés como la glucosa, sondas de imagen, etc.
- Industria alimentaria y de cosméticos: el uso de nanomateriales permitirá mejorar drásticamente la producción, el embalaje, la vida útil y la biodisponibilidad.

Se conseguirán mejoras en plaguicidas, herbicidas y fertilizantes, y se mejorarán las características de los suelos de cultivo.

La creación de nanosensores permitirá la medición y detección de niveles de agua u otras sustancias como nitrógeno, agroquímicos, etc.

Las nanopartículas de óxido de zinc (Imagen 2.4) muestran actividad antimicrobiana y se estudia su utilización como sensores para la alimentación para garantizar la calidad y la seguridad.

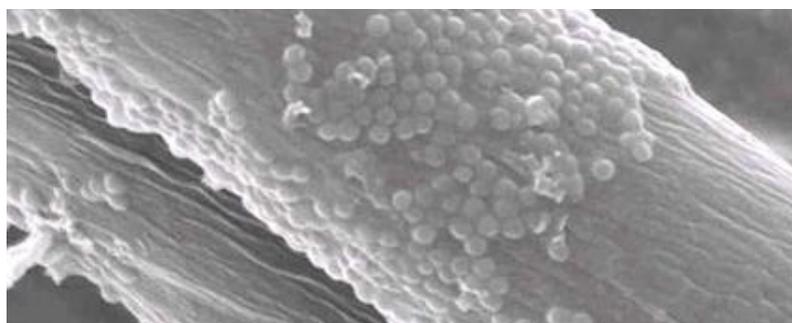


Imagen 2.4: Nanopartículas de óxido de zinc

- En el sector energético se pretende mejorar los sistemas de producción y almacenamiento de energías renovables, además de tecnologías que ayuden a reducir el consumo energético a través del desarrollo de nuevos aislantes térmicos más eficientes basados en nanomateriales.

2.2. Nanopartículas y nanomateriales.

Los términos nanopartícula (NP) y nanomaterial (NM) pueden ser definidos de múltiples formas, podemos encontrar gran cantidad de artículos en bases de datos científicas, como Scopus o Web of Science (WOS), realizando esta búsqueda [14-18]. Se citan a continuación algunas de estas definiciones:

Tabla 2.1: Definiciones de nanopartícula y nanomaterial

| NANOPARTÍCULA | NANOMATERIAL |
|---|--|
| Partícula diseñada y/o fabricada por seres humanos en la nanoescala, con estructura y composición fisicoquímica específicas para explotar las propiedades y funciones asociadas con sus dimensiones [15]. | Cualquier material que se crea deliberadamente de tal manera que se compone de partes funcionales discretas (internamente o en la superficie), muchas de las cuales tendrán una o más dimensiones del orden de 100 nm o menos [16]. |
| Una entidad discreta que tiene sus tres dimensiones del orden de 100 nm o menos [16]. | Material que tiene una o más dimensiones externas en la nanoescala o que está nano-estructurado [17]. |
| Partícula con al menos una dimensión menor que 100 nm incluyendo nanopartículas empleadas en ingeniería, partículas ultrafinas del ambiente (UFP), y nanopartículas biológicas [15]. | Material natural o fabricado que contiene partículas sueltas o formando un agregado/aglomerado y, dentro de la distribución del número de tamaños en el 50% o más de las partículas, una o más dimensiones externas se encuentran en el rango de tamaño 1-100 nm [18]. |

Como se observa en la Tabla 2.1, podemos apreciar matices en las distintas definiciones cuando se hace referencia al tamaño, dimensiones espaciales consideradas, composición, proporción, superficie, características novedosas y artificialidad. Encontrar tantas definiciones se justifica en función del campo en el que las nanopartículas y los nanomateriales son usados, ajustándose los matices de la definición en función de las características más relevantes y fines más representativos de cada aplicación. Estableciendo una definición que no excluya ninguna de las anteriores, definimos:

“Nanopartícula: una entidad que se mide de forma relevante en nanómetros en todas sus dimensiones”.

“Nanomaterial: entidad que se mide de forma relevante en nanómetros en, al menos, una de sus dimensiones o un entidad que contiene dichas entidades”.

2.2.1. Técnicas de fabricación de nanopartículas y nanomateriales

Las nanopartículas pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas como “top-down” (nanofabricación de arriba hacia abajo), que se inicia con una cantidad mayor de material y elimina porciones para crear el material a nanoescala, y “bottom-up” (nanofabricación de abajo hacia arriba), en el que los átomos o moléculas individuales se ensamblan para crear nanopartículas (Imagen 2.5).

Un nuevo área de investigación incluye el desarrollo de técnicas de autoensamblaje de abajo hacia arriba (fabricación molecular) que permitirían a las nanopartículas aglomerarse cuando los materiales necesarios se ponen en contacto entre sí.

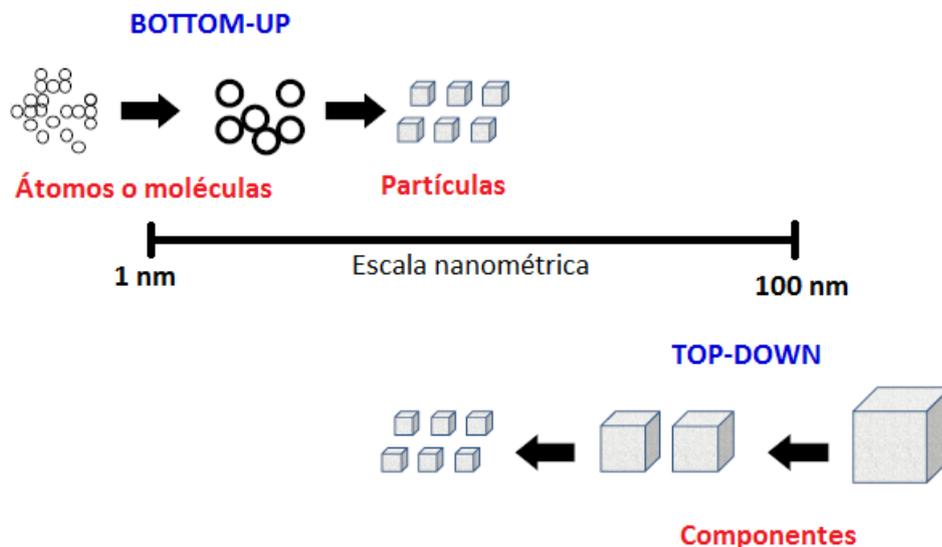


Imagen 2.5: Esquema de los métodos actuales de fabricación de NPs: Top Down y Botton Up

La intención de estos tres métodos es fabricar componentes, herramientas y dispositivos a escalas cada vez más pequeñas empleando técnicas como las recogidas en las tablas siguientes (Tabla 2.2 y Tabla 2.3):

Tabla 2.2: Métodos de fabricación Top Down

| MÉTODOS DE FABRICACIÓN TOP-DOWN | |
|---|---|
| QUÍMICOS | |
| <u>Fresado químico o grabado industrial</u> | <p>Este proceso consiste en emplear baños de productos químicos ácidos o básicos, regulando la temperatura para quitar material y crear un objeto con la forma deseada.</p> <p>Los materiales metálicos con poros nanométricos internos son producidos por este método.</p> |
| <u>Pulido mecánico-químico (CMP)</u> | <p>Es el proceso empleado para alisar superficies con la combinación de productos químicos y fuerzas mecánicas.</p> <p>Los espejos con rugosidad superficial nanométrica son producidos con este método.</p> |
| LITOGRÁFICOS | |
| <u>Técnicas LIGA</u> | <p>Conjunto de técnicas desarrolladas en Alemania en 1980 que emplean rayos X y ultravioleta para fabricar estructuras de tamaño nanométrico.</p> <p>Se usa durante la fabricación de circuitos integrados de semiconductores.</p> |
| <u>Fotolitografía</u> | <p>La luz se utiliza para transferir los patrones sobre sustratos sensibles fotorresistentes.</p> <p>La longitud de onda de la luz empleada es 300 nm. Se usa para la fabricación de circuitos integrados</p> |

Tabla 2.3: Métodos de fabricación Bottom Up

| MÉTODOS DE FABRICACIÓN BOTTOM UP | |
|---|--|
| FASE GAS | |
| <u>Deposición química de vapor (CVD)</u> | <p>Uno o más precursores volátiles reaccionan en la superficie del sustrato para producir el depósito deseado.</p> <p>Se emplea en el campo de los semiconductores para crear películas o recubrimientos muy delgados sobre superficies y en la fabricación de nanotubos de carbono.</p> |
| FASE LÍQUIDA | |
| <u>Reducción de sales metálicas</u> | <p>Estos comienzan con la reducción de la sal metálica a los compuestos metálicos correspondientes mediante diferentes técnicas (radiación, agentes reductores, termólisis o electro-reducción). A continuación, estos átomos actúan como centros de nucleación dando lugar a la aglomeración de nanopartículas y al crecimiento de estos conjuntos.</p> |
| <u>Nucleación y proceso sol gel</u> | <p>Consisten en reacciones químicas irreversibles en disoluciones homogéneas cuyo resultado son materiales nanoestructurados de alta pureza y estructura uniforme creados a baja temperatura o nanopartículas coloidales.</p> |
| BIOLÓGICO | |
| <p>La biosíntesis es una técnica novedosa que implica el empleo de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) o extractos de plantas, que tienden a oxidarse cediendo sus electrones con objeto de reducir el metal a valencia cero.</p> <p>A pesar de ser una técnica totalmente ecológica, la síntesis biológica presenta desventajas importantes frente a los otros métodos ya que necesitan largos tiempos de reacción y tienen baja productividad</p> <p>Usos: Síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de membrana (lípidos y fosfolípidos), estructuras biológicas inorgánicas (nácar), etc.</p> | |

El método Bottom-Up y Top-down coexisten en la actualidad, siendo el primero de ellos el más empleado utilizado. Los expertos estiman que hacia el año 2020 llegarán al mercado las primeras aplicaciones fabricadas mediante métodos moleculares [6].

2.2.2. Clasificación de nomateriales

Los diversos procedimientos de síntesis (Tabla 2.2-2.3) permiten generar de manera controlada una gran cantidad de morfologías individuales. Atendiendo al número de dimensiones del material que pertenecen a la nanoescala, podemos clasificar los materiales en cuatro grupos:

- **Dimensión 0 (D0):** Todas las dimensiones ($d=x, y, z$) están en la nanoescala (Imagen 2.6).

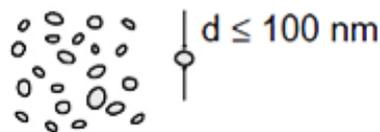


Imagen 2.6: Estructura de los materiales de Dimensión 0

Se encuentran en esta categoría las nanopartículas de distintos materiales, como los óxidos metálicos empleados en este proyecto, y otras nanopartículas como fullerenos, dendrímeros y tetrápodos (Imagen 2.7).

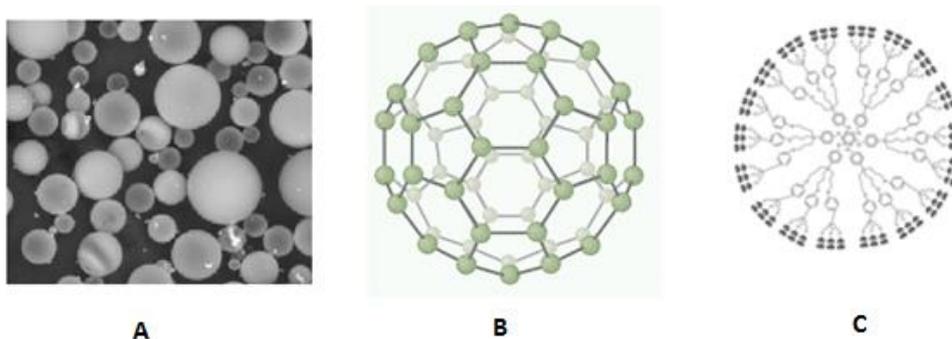


Imagen 2.7: Ejemplos de materiales pertenecientes a la D0:

A) Nanopartículas, B) Fullerenos, C) Dendrímero

- **Dimensión 1 (D1):** Dos dimensiones en la nanoescala ($d=x, y$) y una en la macroescala, L (Imagen 2.8).

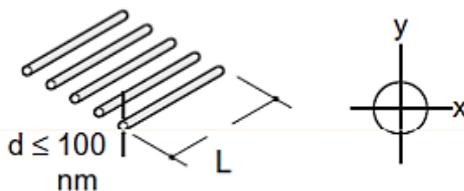


Imagen 2.8: Estructura de los materiales de Dimensión 1

En esta categoría se encuentran los nanotubos y los nanohilos (Imagen 2.9).

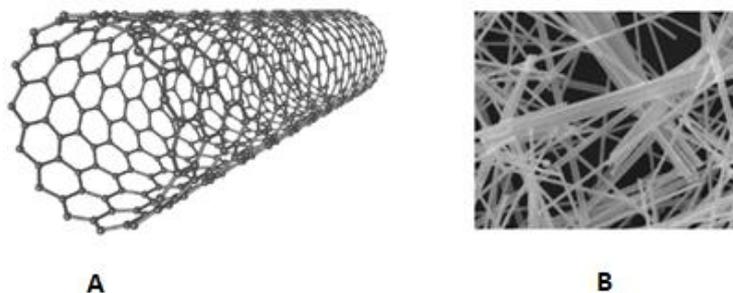


Imagen 2.9: Ejemplos de materiales pertenecientes a la D1:

A) Nanotubo de carbono; B) Nanohilos de platino

- **Dimensión 2:** Una dimensiones en la nanoescala (t) y dos en la macroescala, L_x , L_y (Imagen 2.10).

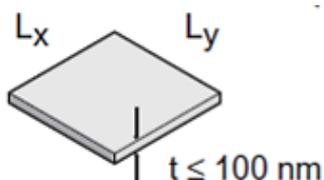


Imagen 2.10: Estructura de los materiales de Dimensión 2

Esta parte de la clasificación está constituida por grafeno (Imagen 2.11), redes bidimensionales de nanopartículas, superficies y películas.

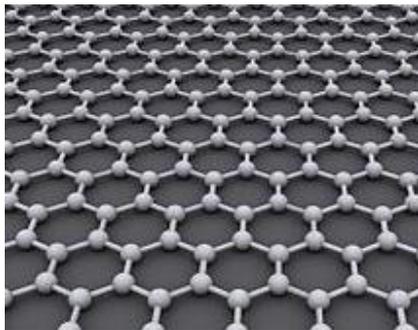
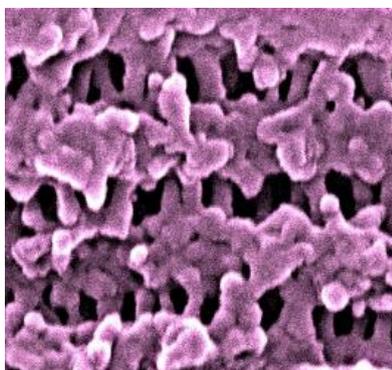


Imagen 2.11: Ejemplo de material perteneciente a la D 2: Grafeno

- **Dimensión 3:** No hay dimensiones en la nanoescala. Se trata de sólidos nanoporosos (Imagen 2.12), superredes y composites.



*Imagen 2.12: Ejemplo de material perteneciente a la Dimensión 3:
Material nanoporoso*

2.3. Nanopartículas de óxidos metálicos en electroanálisis.

Las nanopartículas pueden tener distinto origen (Ver tabla 2.1), incluyendo nanopartículas orgánicas e inorgánicas y nanopartículas biológicas. A su vez pueden tener diversos tamaños y formas, desde redondeadas, cúbicas o estrelladas.

En la realización de este proyecto, se han empleado NPs de óxidos metálicos (nanopartículas inorgánicas redondeadas) para fabricar los electrodos de trabajo que emplearemos en mediciones electroanalíticas (Ver sección 2.5). Se han usado este tipo de NPs debido a que presentan mayor área superficial y tienen propiedades fisicoquímicas distintas a las del material en su forma macroscópica, que proporcionan ventajas en las

mediciones electroanalíticas, al aumentarse la conductividad y la reactividad química.

Las nanopartículas de óxidos metálicos son útiles en electroanálisis ya que facilitan la transferencia de electrones entre el electrodo y el analito, por lo que tienen buena actividad catalítica, a causa de la alta proporción de átomos en la superficie con valencias libres, en comparación con el número total de átomos, lo que confiere además reversibilidad electroquímica de los analitos. Otras propiedades de las nanopartículas de óxidos metálicos que las hacen atractivas para el electroanálisis son la alta proporción de su área respecto del volumen ocupado, la estabilidad química y la biocompatibilidad (Ver sección 2.1.2).

Por lo tanto, las nanopartículas de óxidos metálicos son capaces de incrementar la sensibilidad y especificidad en la detección de moléculas, aumentando el área de la superficie del electrodo disponible para el intercambio de electrones o facilitando la inmovilización de enzimas.

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxidos metálicos magnéticos se pueden utilizar para la separación de analitos, mientras que las propiedades semiconductoras también se pueden utilizar para la detección electroquímica de los analitos seleccionados.

Las nanopartículas de óxidos metálicos que más se han utilizado en electroanálisis son: óxido de níquel, óxido de hierro magnético, óxido de zinc, óxido de titanio, óxido de estaño, óxido de cobalto, óxido de manganeso, óxido de cadmio y óxido de cerio. El uso de óxidos metálicos mixtos es cada vez más frecuente debido a la limitación en los métodos para aumentar la actividad de un óxido que contiene un único metal.

Un componente importante de muchos ensayos electroanalíticos que implican nanopartículas de óxidos de metal son las enzimas. Estas son necesarias para detección de analitos de forma específica y sensible cuando están presentes determinados compuestos de interferencia. La inmovilización de enzimas sobre el electrodo es esencial porque la mayoría de las proteínas

en solución no pueden intercambiar electrones directamente con el electrodo. Esto es consecuencia de la enorme cadena de polipéptidos complejos que rodean sus centros redox, los cuales suelen estar incrustados en el núcleo de la enzima, lo que impide su transferencia de electrones con el electrodo. La inmovilización de enzimas sobre la superficie del electrodo sirve como un enfoque viable para aumentar dicha transferencia de electrones. Sin embargo, la inmovilización directa de las enzimas sobre la superficie de los electrodos no modificados a veces provoca la desnaturalización de la proteína si las estructuras de estas no son compatibles con la superficie del electrodo. Por lo tanto, las nanopartículas de óxidos metálicos proporcionan un medio ambiente biocompatible para que las enzimas funcionen en el electrodo, mejoran la sensibilidad del electrodo (facilitando la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo) y catalizan la reducción o la oxidación del sustrato de la enzima [4].

A continuación, nos centramos en las nanopartículas de óxidos metálicos empleadas en este proyecto, dando una descripción más detallada de su estructura, método de fabricación y aplicaciones principales.

2.3.1. Óxido de titanio (IV), TiO_2

En los últimos años, los óxidos de metales de transición han sido estudiados ampliamente. Entre ellos, se encuentra el dióxido de titanio (TiO_2), por ser un material semiconductor muy importante y el componente principal de pinturas, pigmentos, cosméticos y productos alimenticios. Sus aplicaciones incluyen la esterilización o desinfección, sensores de gas, dispositivos electrónicos, recubrimientos antirreflectantes para células fotovoltaicas, la oxidación catalítica de monóxido de carbono y fotodegradación de los contaminantes orgánicos en el agua y el aire [19].

Las nanopartículas de TiO_2 se han sintetizado por muchas técnicas (Tabla 2.2-2.3), tales como método de sol- gel, deposición del vapor químico, aerosol, método electroquímico y tratamiento hidrotérmico. De estos métodos, el método de sol- gel es uno de los más ampliamente utilizados

debido a que el proceso de obtención presenta varias ventajas: alta homogeneidad, se realiza a baja temperatura, es estable y versátil.

El dióxido de titanio existe en tres fases cristalinas: anatasa, rutilo y brookita (Imagen 2.13) [20].

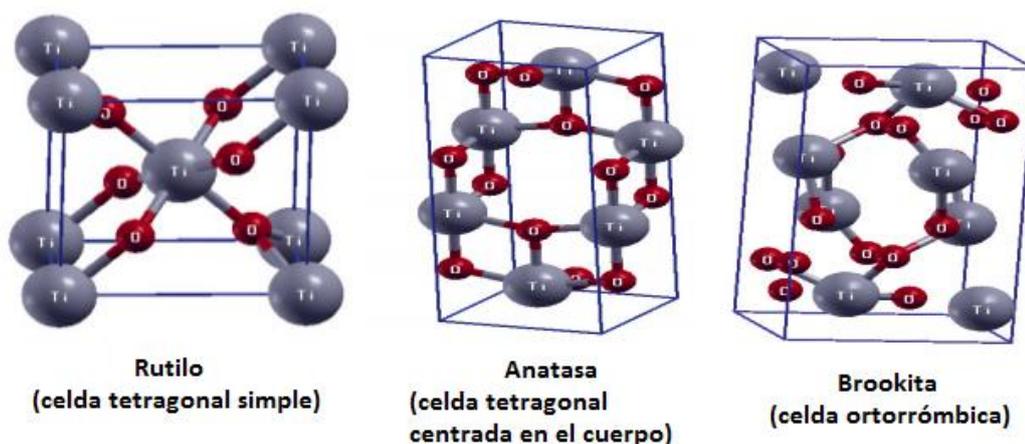


Imagen 2.13: Fases cristalinas del TiO₂

- Anatasa: presenta una estructura cristalina tetragonal y una banda prohibida de 3.21 eV (Imagen 2.14).
- Rutilo: en comparación con las otras formas de óxido de titanio es estable y tiene gran dureza. Presenta una estructura cristalina tetragonal centrada en el cuerpo y una banda prohibida de 3,0 eV (Imagen 2.14).

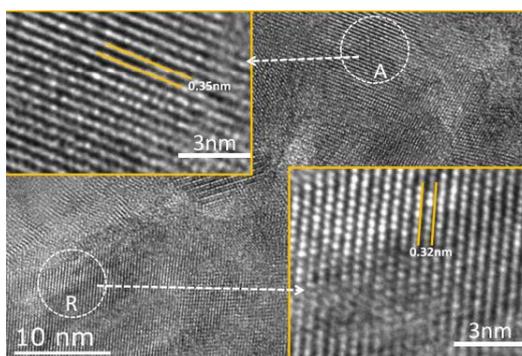


Imagen 2.14: Franjas reticulares de cristales de TiO₂: anatasa (A) y rutilo (R)

- Brookita: presenta una estructura cristalina ortorrómbica, una banda prohibida de 3.13 eV y se transforma espontáneamente a rutilo en torno a 750 ° C. Esta fase no es considerada semiconductor.

En el presente proyecto se emplea la fase anatasa, ya que es la fase comercial predominante del óxido de titanio (II) y ha sido ampliamente investigada.

El TiO_2 es un excelente catalizador debido a su estabilidad química, resistencia a la corrosión, no toxicidad, fuerte poder oxidante y excelentes propiedades electrocatalíticas.

2.3.2. Óxido de cerio (IV), CeO_2

Entre la familia de las tierras raras, el óxido de cerio (IV) es uno de los materiales más abundantes pertenecientes a este grupo. Ha sido estudiado extensamente en muchos campos, como la catálisis, células de combustible/solares, sensores, y usos biológicos, debido a su estructura única, propiedades atómicas y la química superficial.

El cerio tiene dos estados de oxidación estables, +4 y +3, y la relativa facilidad de conmutación entre estos dos estados, es el factor esencial para su actividad catalítica. Este cambio rápido de estado de oxidación está relacionado con su capacidad de almacenar y liberar el oxígeno. La movilidad de iones de oxígeno es otro aspecto esencial en la catálisis y en la actividad electroquímica. La difusión de los iones de oxígeno está estrechamente unida a la presencia de defectos estructurales en dichos materiales [21].

El CeO_2 tiene una estructura cristalina de tipo fluorita, en la que los cationes Ce^{4+} forman una red cúbica centrada en las caras y los aniones O^{2-} ocupan los agujeros tetraédricos (Imagen 2.15). Esta estructura es estable en el intervalo de temperaturas comprendido entre la temperatura ambiente y el punto de fusión [22].

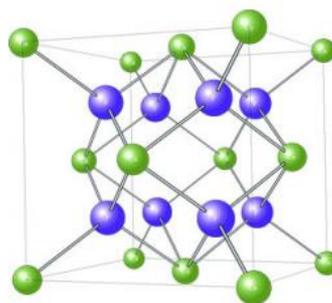


Imagen 2.15: Diagrama de la estructura cristalina tipo fluorita. Las esferas verdes representan los cationes Ce^{+4} y las azules los aniones O^{2-} .

Si se disminuye el tamaño de las partículas de CeO_2 , las propiedades físicas y químicas son distintas respecto de las de mayor tamaño. Una propiedad afectada y que, además es muy importante en la catálisis, es el aumento en la movilidad de iones de oxígeno. Esto se debe a la relajación del entramado de la celda, asociada con los cambios composicionales y distorsiones locales de la estructura tipo fluorita del CeO_2 para formar el Ce_2O_3 .

El desarrollo de gran cantidad de métodos sintéticos para la preparación de nanopartículas de CeO_2 ha dado acceso a una gran variedad de geometrías incluyendo materiales con cero, una y dos dimensiones en la nanoescala. En este proyecto emplearemos nanopartículas (dimensión cero) cuya técnica de obtención más común es la co-precipitación, la cual permite explotar la solubilidad sumamente baja del cerio, además es una técnica simple y rápida. Se realiza en soluciones alcalinas con NaOH, urea o amoníaco como agentes que precipitan. Para evitar la precipitación rápida de cristales demasiado pequeños se requiere la presencia de surfactantes como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) o polivinilpirrolidona (PVP), permitiendo el mejor control de las dimensiones de partículas [21].

2.3.3. Óxido de níquel (II), NiO

El óxido de níquel es un material semiconductor, de la familia de los metales de transición y la preparación de nanopartículas de dicho metal ha sido extensamente estudiada debido a la gran variedad de usos, análogos a los indicados en la descripción del óxido de titanio [19].

Presenta excelentes propiedades electroquímicas que hacen que sea un óxido apto para su empleo en aplicaciones catalíticas.

El tamaño, la forma, y la morfología de nanopartículas NiO son aspectos importantes dependiendo del uso tecnológico del material. Hasta el momento, se han empleado distintas técnicas, como el sol-gel, la descomposición termal, la evaporación, etc. Sin embargo, las técnicas de descomposición termal son consideradas como las más prometedoras porque permiten controlar las condiciones de proceso, el tamaño de partícula, la morfología del cristal de partícula y la pureza. Además, requieren un periodo de tiempo corto para su aplicación, bajo coste y altas prestaciones [18, 24].

Presenta una estructura cristalina tipo sal gema, NaCl (Imagen 2.16), la cual es cúbica centrada en las caras para los cloruros, que son más voluminosos, y en la que los cationes ocupan los huecos octaédricos formados (Imagen 2.17) [25].

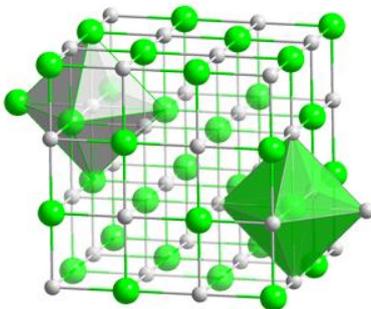


Imagen 2.16: Diagrama de la estructura cristalina del NaCl. Se observan los octaedros que rodean a cada tipo de ion con iones de signo contrario.

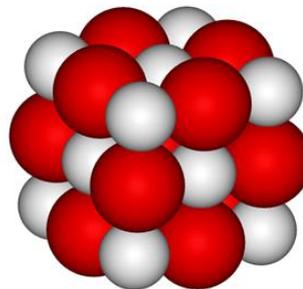


Imagen 2.17: Estructura química del óxido de níquel (II), NiO. En rojo se observa el oxígeno y en blanco el níquel, que tiene un radio iónico menor.

2.4. Métodos químicos e instrumentales.

La Química Analítica puede definirse como la ciencia y el arte de determinar la composición de materiales en base a los elementos o compuestos que los integran. Los métodos que utiliza la Química Analítica para la caracterización de la materia suelen clasificarse en químicos e instrumentales.

- MÉTODOS QUÍMICOS: Análisis cualitativo y cuantitativo
- MÉTODOS INSTRUMENTALES: Ópticos, Electroquímicos y Otros

Los métodos químicos están basados en interacciones materia-materia, esto es, en reacciones químicas y requerían una gran destreza experimental. La revolución tecnológica e industrial ha impulsado el desarrollo de nuevos métodos, de forma que actualmente todas las propiedades de la materia pueden utilizarse para el establecimiento de un método de análisis, surgiendo así una gran cantidad de métodos instrumentales, basados en interacciones materia-energía, que emplean distintos aparatos y no es esencial el concurso de una reacción química [26-27].

El tipo de método empleado en este proyecto se encuentra dentro de esta última categoría (método instrumental), concretamente se emplea un método electroquímico el cual se desarrollará teóricamente más adelante (Sección 2.5).

2.4.1. Breve panorama histórico

El desarrollo y las mejoras alcanzadas en Química Analítica han estado ligados a la introducción de nuevos instrumentos de medida.

La balanza analítica fue el primer instrumento empleado que permitió realizar análisis cuantitativos, conocidos como análisis gravimétricos. Poco después se descubrió que el empleo de materiales de vidrio correctamente calibrados hacía posible el ahorro de tiempo a través de medidas volumétricas.

En las últimas décadas del siglo XIX, la invención del espectroscopio abrió nuevos caminos en el ámbito analítico, que permitieron establecer procedimientos desconocidos hasta el momento, pero que resultaron muy productivos.

Gradualmente se introdujeron algunos métodos colorimétricos y nefelométricos, y se descubrió que las medidas eléctricas se podían emplear para detectar los puntos finales en las titulaciones.

El rápido desarrollo de la electrónica experimentado en el siglo actual, impulsó la aplicación de las técnicas instrumentales al análisis. En 1903, Kuster y Gruters, sentaron las bases de las valoraciones conductimétricas y posteriormente se desarrollaron las valoraciones potenciométricas.

En 1922, el Premio Nobel de Química, Jaroslav Heyrovský, había descubierto la polarografía lo que constituyó un importante avance para el análisis en el ámbito de trazas. La necesidad de analizar componentes a trazas (concentraciones inferiores a 0,01%) en una gran variedad de muestras, así como, de efectuar numerosos análisis de productos industriales en tiempo muy corto, provocó el desarrollo espectacular de los métodos instrumentales a partir de los años 30. Los avances conseguidos se notaron únicamente en los países más industrializados, como Estados Unidos, Alemania, Inglaterra, etc. La tecnología que allí ya se empleaba, aún tardaría algún tiempo en llegar a España y hacerse asequible a los laboratorios universitarios e industriales.

En la década de los treinta se construyeron los primeros electrodos de vidrio sensibles a los iones H^+ , lo cual permitía la determinación rápida y continua del pH, con la consiguiente aplicación a las volumetrías ácido-base.

Los métodos instrumentales sufrieron un nuevo impulso durante la primera mitad de la década de los cuarenta, a consecuencia de la Segunda Guerra Mundial, que condicionó la evolución de las Ciencias y en particular de la Química. Por ejemplo, el proyecto Manhattan, relacionado con la construcción de la primera bomba atómica, desarrolló considerablemente

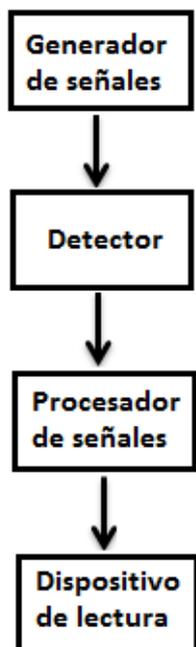
nuevos métodos instrumentales, el análisis de trazas, el microanálisis y las separaciones por intercambio iónico.

Durante los años ochenta, se produjo la irrupción de la informática lo cual ha modificado profundamente las técnicas analíticas instrumentales, tanto en forma de microordenadores para controlar los instrumentos, como en la manipulación de la abundante información obtenida en las medidas experimentales.

Una vez obtenidos los resultados analíticos, se pueden procesar los datos, realizando operaciones tales como la generación de derivadas en espectros o transformadas de Fourier. Además, se pueden evaluar los resultados estadísticos y comparar los resultados analíticos con datos almacenados en la memoria del equipo [26-27].

2.4.2. Instrumentos analíticos

Un instrumento analítico típico consta de los siguientes componentes (Imagen 2.18):



- Generador de señales: produce una señal directamente relacionable con la presencia (y también, frecuentemente con la concentración) del analito.
- Detector o transductor de entrada: dispositivo que convierte un tipo de señal en otro.
- Procesador de señales: modifica la señal procedente del detector adaptándola al dispositivo de lectura. En muchas ocasiones se produce simplemente una amplificación, si bien, a menudo las señales se filtran para disminuir el ruido.
- Dispositivo de lectura: transforma la señal procesada en otra señal inteligible para el observador (Display, voltamograma, escala graduada).

Imagen 2.18: Componentes de un instrumento analítico

2.4.3. Características de los métodos instrumentales

Los métodos químicos tienen carácter absoluto, en cambio, los instrumentales tienen carácter relativo. Estos últimos se basan en la medida de una propiedad (P) normalmente física, que es función de la concentración (C), de tal forma que $P=KC$. Sin embargo, la constante de proporcionalidad no es única al depender de las condiciones experimentales. Es evidente que si se conocen todos los parámetros que intervienen en la constante K, los métodos instrumentales adquieren carácter absoluto, sin embargo en la práctica la dificultad en la medición de las variables implicadas hace que la concentración de la muestra se determine preferentemente por comparación con muestras patrón.

Los tres métodos de comparación con patrones empleados más frecuentemente son los que utilizan curvas de calibrado obtenidas mediante series de patrones, el método de las adiciones estándar y el método del patrón interno [26-27].

2.4.4. Variables analíticas a considerar en la aplicación de un método instrumental

2.4.4.1. Precisión

La precisión de un conjunto de mediciones está íntimamente relacionada con la presencia de errores indeterminados (o aleatorios) y se considera como una medida de la reproducibilidad de los resultados. Para describir la precisión se utiliza la desviación estándar. En relación con este parámetro, los métodos químicos suelen ser más precisos en términos absolutos que los métodos instrumentales.

2.4.4.2. Exactitud

La exactitud mide el error sistemático o determinado de un método analítico. Se puede determinar por comparación con un método patrón. Los métodos químicos son más exactos para altas concentraciones, aumentando el error de estos métodos a medida que la concentración disminuye, condiciones en las que los métodos instrumentales son más exactos.

2.4.4.3. Límite de detección y sensibilidad

El límite de detección de un analito por un método instrumental puede definirse como aquella concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal del blanco o señal de fondo. El término significativamente debe aclararse en términos estadísticos.

Si se realizan infinitas determinaciones sobre una muestra en blanco, los resultados se distribuirán en forma de campana de Gauss (Imagen 2.19). Tomando un nivel de probabilidad del 95% se puede definir un límite, L , por encima del cual se encuentren únicamente el 5% de los resultados (parte sombreada de la Imagen 2.19 Curva A). Podría considerarse que éste es el límite de detección, por cuánto que un resultado situado por encima de L tiene únicamente un 5% de probabilidades de pertenecer al blanco. Sin embargo, una muestra con una señal media, M , tendrá una distribución normal representada por la Curva B (Imagen 2.19), por lo que, en realidad, la probabilidad de concluir que esta muestra no difiere del blanco es del 50%.

Por ello, resulta más adecuado considerar el valor medio, M , de una distribución gaussiana (Imagen 2.19 Curva C) tal que el 5% de sus valores se encuentren situados por debajo de L .

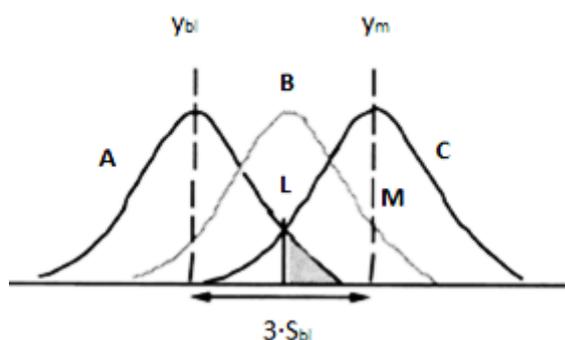


Imagen 2.19: Límite de detección

Esto sucede cuando la distancia entre y_{bl} e y_m es aproximadamente 3 veces la desviación estándar del blanco, de forma que la mínima señal analítica distinguible, y_m , se calcularía mediante la Ecuación 1:

$$y_m = y_{bl} + 3 \cdot s_{bl} \quad \text{Ecuación 1}$$

Cuando se utiliza una recta de regresión convencional para la calibración se obtiene la Ecuación 2:

$$y = m \cdot C + y_{bl} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde y es la señal medida, m la pendiente y C la concentración (Imagen 2.20).

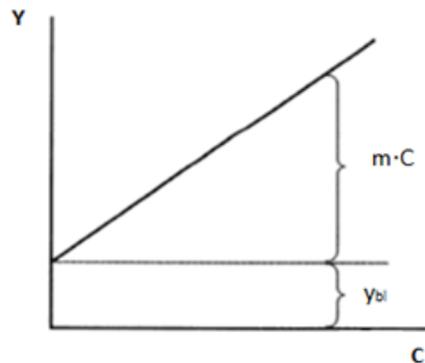


Imagen 2.20: Representación de la Ecuación 2

En el límite de detección, $y_m = m \cdot C_m + y_{bl}$ (Ecuación 3), con lo que la concentración límite (cantidad mínima de sustancia apreciable o determinable por unidad de volumen), C_m , resulta de combinar la Ecuación 1 y 3:

$$C_m = \frac{y_m - y_{bl}}{m} = \frac{3 \cdot s_{bl}}{m}$$

$$\text{Ecuación 4}$$

Esta será la fórmula empleada para el cálculo de los límites de detección que se presenta en la sección 3.7.3.

La sensibilidad de una técnica se define como la pendiente del calibrado, y si éste es lineal, puede medirse en cualquier punto de él. Los métodos instrumentales son más sensibles que los métodos químicos. Esto implica que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito

mucho más pequeñas que los métodos clásicos, lo cual los hace particularmente útiles para el análisis de trazas.

Un factor que degrada la exactitud y la precisión de un análisis, y contribuye a hacer menos favorable el límite de detección, es el ruido. Este factor está presente en mayor o menor grado en todas las señales analíticas instrumentales. El origen del ruido puede ser muy diverso, si bien suele distinguirse entre ruido químico y ruido instrumental. El primero procede de multitud de variables incontroladas relacionadas directamente con la química del sistema: posición del equilibrio químico, variaciones indetectadas de la temperatura, presión, etc. Por su parte, el ruido instrumental es relacionado con los distintos componentes del instrumento utilizado: generador de señales, detector, etc [26].

2.4.4.4. Selectividad

La selectividad hace referencia al grado de interferencia de unas especies sobre la identificación de otras. El caso más favorable de selectividad es aquel en el que ninguna otra sustancia interfiere y la reacción o el método son completamente característicos de la sustancia que se determina. Se dice entonces que el método es específico. La selectividad de los métodos instrumentales es muy diversa, existiendo algunos muy selectivos, en especial, algunos métodos ópticos.

2.4.4.5. Rapidez

Respecto a este parámetro, los métodos instrumentales son más rápidos para determinaciones en serie o de rutina. Además suelen ser fácilmente automatizables, ya que muchos dan respuestas rápidas y continuas, haciendo posible su adaptación a análisis de control, lo cual permite, tras una interpretación, pasar a la acción en poco tiempo.

2.4.4.6. Coste

En cuanto a la economía, podría parecer, en principio, que los métodos químicos son más económicos que los instrumentales, y, si bien, esto es cierto en cuanto al material, no lo es tanto en relación con el tiempo necesario para llevarlos a la práctica ni en relación con el personal, pues, en

contra de lo que pueda parecer a primera vista, se precisa mayor tiempo de aprendizaje para utilizar un método clásico, que para aprender a manejar un instrumento. Esto hace que los métodos instrumentales puedan ser rentables para trabajos en serie [26-27].

2.5. Métodos electroanalíticos.

Los métodos electroquímicos de análisis, o métodos electroanalíticos, constituyen un grupo importante dentro de los métodos analíticos instrumentales descritos en la sección 2.4 y se basan en las propiedades electroquímicas de las soluciones. Presentan una serie de ventajas:

- Mayor especificidad para un determinado estado de oxidación.
- Alta sensibilidad y eficacia.
- Las medidas electroquímicas pueden llevarse a cabo con pequeños volúmenes de muestra con relativa facilidad.
- Muchos métodos electroanalíticos proporcionan información sobre la actividad de una especie, en lugar de hacerlo sobre la concentración, lo cual puede ser interesante en muchas ocasiones.
- La instrumentación electroquímica, presenta una relativa simplicidad y bajo coste, que permite una fácil disponibilidad de estos instrumentos en el mercado.

El tipo de método empleado en este proyecto es un método electroquímico con transferencia electrónica neta (Tabla 2.5) concretamente, la voltametría cíclica, el cual se desarrollará teóricamente más adelante (Sección 2.5.5.2).

Los métodos electroanalíticos se basan en reacciones electroquímicas. Por ello, en el subapartado siguiente se considerarán algunas cuestiones relacionadas con estos procesos [26].

2.5.1. Desarrollo de un método electroanalítico

Una reacción electroquímica es una reacción redox en la que el intercambio de electrones tiene lugar en el electrodo y están asociadas al fenómeno de la electrolisis. Para desarrollar un método electroanalítico es necesario lo siguiente:

- ✓ **Celda electroquímica:** Recibe este nombre el recipiente de vidrio en el que colocaremos la disolución que contiene los analitos de interés.
- ✓ **Fuente de corriente continua (externa).**
- ✓ **Aparatos de medida:** multivoltímetros, microamperímetros, etc.
- ✓ **Electrodos:** Los electrodos pueden estar en el mismo recipiente (Imagen 2.21-A) o con los compartimentos anódicos y catódicos separados (Imagen 2.21-B). En este último caso es imprescindible que las dos disoluciones estén en contacto mediante una pared porosa que impide la mezcla y que permite el paso de cargas (puente salino).
 - El ánodo es el electrodo en el que se lleva a cabo la oxidación, con transferencia de electrones de la especie reducida al electrodo.
 - El cátodo es el electrodo en el que se efectúan las reducciones, los electrones se transfieren del electrodo a la especie oxidada.

Cuando se cierra el circuito, los electrones circulan por el circuito externo desde el ánodo hasta el cátodo, mientras que en el seno de la disolución el paso de la corriente corresponde al movimiento de las cargas transportadas por los iones (migración iónica) [27-29].

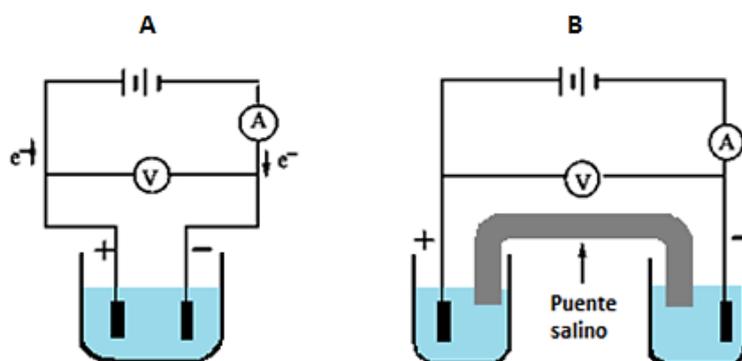


Imagen 2.21: Montaje celda electrolítica para un circuito eléctrico simple: A) Electrodo en un mismo recipiente; B) Electrodo en distintos recipientes unidos por un puente salino

✓ Circuito eléctrico

El circuito eléctrico más simple para obtener una curva intensidad-potencial consta de los componentes representados en la Imagen 2.22.

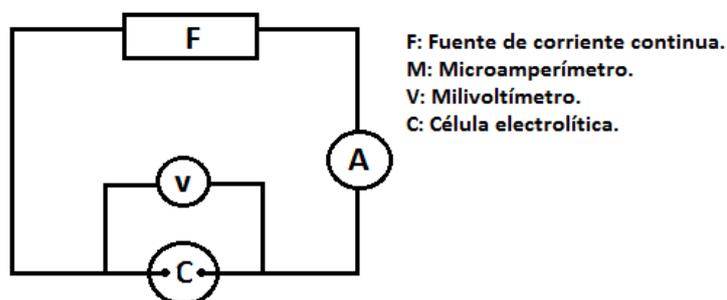


Imagen 2.22: Circuito eléctrico simple empleado en el montaje con dos electrodos

Cuando a través de la celda pasa una corriente de intensidad i , la diferencia de potencial entre los dos electrodos es $V = E_A - E_C + iR$, siendo R la resistencia de la célula. Si i y R son pequeños, la caída óhmica, iR , se suele despreciar, pero, en ocasiones adquiere valores considerables.

Para corregir la caída óhmica suele utilizarse un montaje con tres electrodos (Imagen 2.23-A) en un circuito eléctrico más complejo (Imagen 2.23-B).

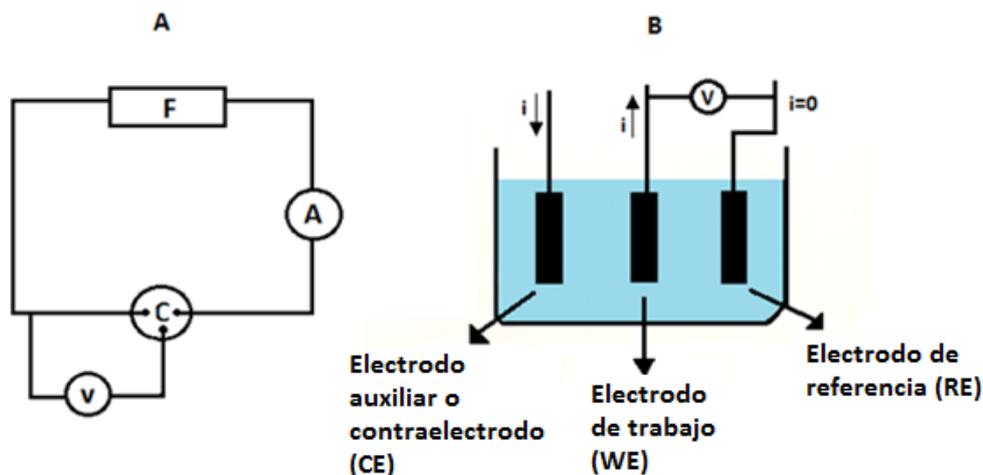


Imagen 2.23: A) Circuito eléctrico complejo para corregir la caída óhmica; B) Montaje de tres electrodos

La diferencia de potencial entre el electrodo indicador y el de referencia se mide con un milivoltímetro electrónico de gran impedancia de entrada ($10^{12}\Omega$), por lo que por ese circuito apenas circula corriente, con lo que la caída óhmica del propio electrolito puede hacerse despreciable si se acerca el electrodo de referencia al electrodo indicador.

Un **electrodo de referencia (RE)** es aquel que adquiere un valor de potencial constante cualquiera que sea la composición de la disolución (tienen alta resistencia interna). El electrodo de referencia empleado para la realización de la parte experimental de este proyecto ha sido el electrodo de plata/cloruro de plata (Sección 3.2).

Un **electrodo de trabajo (WE)**, es aquel cuyo valor de potencial alcanzado proporciona información sobre la concentración o la naturaleza de las sustancias susceptibles de intercambiar electrones. Debido a que la mayor parte de los métodos electroquímicos, se basan en la medida de la corriente que fluye a través de un electrodo después de una perturbación del potencial, el electrodo de trabajo se considera la parte más importante del experimento.

Los electrodos de pasta de carbono y de película de mercurio son el comienzo de una nueva era en electroanálisis y pueden considerarse como precursores de los electrodos modificados. Utilizando un electrodo modificado se intenta ejercer un mayor control sobre sus características e influir en la reactividad superficial. La variedad de especies modificadoras utilizadas es muy amplia, variando desde depósitos metálicos o capas de óxidos metálicos, hasta el uso de materiales orgánicos, enzimas o polímeros [2, 40, 45, 46].

El electrodo indicador (o electrodo de trabajo) empleado en el laboratorio son distintos electrodos de pasta de carbono (EPC) sin modificar y otros modificados con nanopartículas de óxidos metálicos (NP-OM).

Los EPC fueron introducidos por Adams a finales de los años 50 y están constituidos por una fase conductora (polvo de grafito) dispersa, uniforme y aleatoriamente, en una sustancia aislante (líquido aglutinante) [30].

El método más comúnmente utilizado para preparar electrodos de pasta de carbono modificados es la mezcla directa del modificador con la pasta, sugerido en 1981 por Ravichandran y Baldwin. En este caso, debe prestarse especial atención en asegurar la homogeneidad de la mezcla, puesto que para obtener resultados reproducibles y comparables, la concentración del componente activo en la superficie del electrodo debe ser similar en todos los experimentos. Por consiguiente, se debe lograr una mezcla exhaustiva de las dos fases sólidas con el fin de conseguir que siempre se exponga la misma cantidad de modificador a la disolución de la muestra [31]. Además, los modificadores utilizados en mezcla directa deben reunir las siguientes condiciones:

1. Ser insolubles en la disolución problema o al menos, adsorberse fuertemente sobre los componentes de la pasta, de manera que se evite su disolución en la superficie del electrodo durante la medida.

2. No deben sufrir transformaciones electroquímicas dentro del margen de potencial de la respuesta voltamperométrica de las especies analizadas, excepto en las aplicaciones catalíticas.

Este electrodo constituye una parte importante de la investigación y en la Sección 3.1 se desarrolla en profundidad su modo de fabricación y empleo [32].

El **electrodo auxiliar o contraelectrodo** debe tener una resistencia baja para que no introduzca un error excesivo, además, la interfase entre el metal y la solución debe tener un área mucho mayor que la del electrodo de trabajo, de modo que la densidad de corriente y los efectos de polarización resultantes sean menores. Este electrodo puede ser un alambre sencillo de platino o plata o una fuente de mercurio. En este proyecto se emplea una placa de platino como electrodo auxiliar (Sección 3.3).

La celda con tres electrodos es la más aconsejable para voltametría que, como ya se ha indicado con anterioridad, es el método analítico empleado en este proyecto y el montaje de este tipo de celda se detalla en la Sección 3.4.

2.5.2. Clasificación de los métodos electroanalíticos

Las aplicaciones electroquímicas al análisis tienen su fundamento en la evolución de la intensidad, potencial, tiempo y resistencia a medida que transcurren las reacciones; representada dicha evolución por las curvas intensidad-potencial.

En los distintos métodos se utilizan las curvas completas, partes de las curvas, o simplemente puntos, siendo la intensidad la variable cuantitativa y el potencial la cualitativa [29].

El desarrollo tecnológico experimentado en los últimos tiempos ha permitido que el número de propiedades electroquímicas utilizadas en análisis haya crecido notablemente, lo cual se traduce en un número muy elevado de métodos electroquímicos, los cuales se clasifican en las Tablas 2.4-2.5.

El método empleado para la realización de los análisis en este proyecto es la voltimetría, por lo que le desarrollaremos con mayor profundidad en el subapartado siguiente (Sección 2.5.3).

Tabla 2.4: Clasificación de métodos electroquímicos sin transferencia electrónica neta

| | |
|-----------|---|
| I. | Métodos sin transferencia electrónica neta (transporte de carga por migración y polarización dieléctrica). |
| | Se basan en medidas de conductividades de disoluciones de electrolitos usando corriente alterna. |
| | Conductimetría |
| | Valoraciones conductimétricas |
| | Oscilometría (condiciones de alta frecuencia) |

Tabla 2.5: Clasificación de métodos electroquímicos con transferencia electrónica neta

| II. | Métodos con transferencia electrónica neta. |
|---------------------------------|---|
| Variable | Métodos |
| <u>Potencial</u> | Potenciometría directa Valoraciones potenciométricas Valoraciones cronopotenciométricas |
| <u>Intensidad</u> | Amperometría Valoraciones amperométricas Cronoamperometría |
| <u>Intensidad y potencial</u> | Voltamperometría (Voltimetría) Polarografía Voltamperometría de redisolución |
| <u>Cantidad de electricidad</u> | Culombimetría Valoraciones culombimétricas Electrogravimetría |

2.5.3. Voltamperometría

La voltamperometría incluye todo un conjunto de técnicas electroanalíticas en las que los resultados se obtienen a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado al electrodo indicador. Como la corriente que circula a través del electrodo de trabajo es considerable, es necesaria la adición de un tercer electrodo a la celda, el electrodo auxiliar (Imagen 2.23). Una fuente de voltaje variable (potenciostato) se conecta en serie con un microamperímetro y con los electrodos que conducen la corriente (electrodo de trabajo y auxiliar). El potencial real en el electrodo de trabajo se mide en relación al electrodo de referencia con un voltímetro adecuado (generalmente de tipo electrónico).

El electrodo de trabajo en voltametría responde a cualquier especie electroactiva que se encuentre presente en la solución. El tipo de electrodo a emplear depende principalmente del rango de potenciales que se desee medir. El principal inconveniente de la voltamperometría reside en la dificultad para reproducir las condiciones superficiales del electrodo de trabajo.

Los distintos tipos de voltametría se diferencian en base a cómo varía el potencial aplicado en función del tiempo y, las más importantes empleadas en múltiples referencias, pueden clasificarse del modo siguiente [33, 34]:

2.5.5.1. Voltamperometría de barrido lineal

El potencial del electrodo de trabajo se hace aumentar o disminuir (a velocidades entre 2 y 5 mV/segundo) midiéndose la intensidad de la corriente para los distintos potenciales aplicados, operando sobre una disolución en reposo (Imagen 2.24-A). La curva intensidad-potencial obtenida se denomina voltamperograma.

Los parámetros más importantes son el potencial de pico (E_p) y la intensidad del pico (I_p), de los que no sólo se obtiene información típicamente analítica sino que también puede utilizarse para estudiar la reversibilidad del proceso y determinar constantes de interés químico-físico (Imagen 2.24-B).

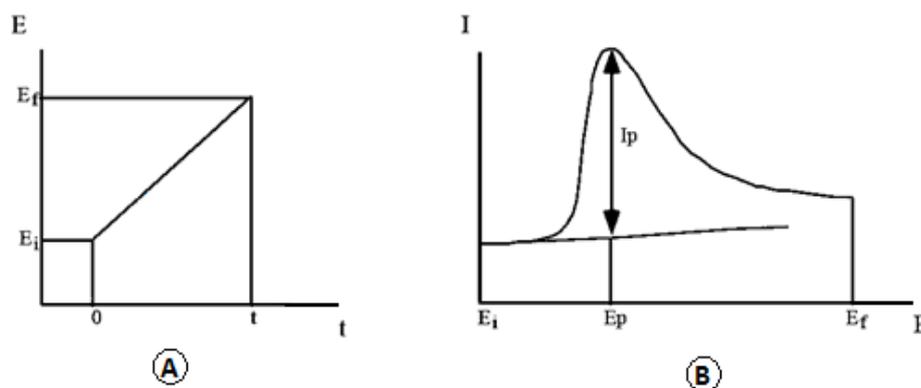


Imagen 2.24: Voltamperometría de barrido lineal: A) Variación del potencial aplicado en función del tiempo; B) Curva intensidad-potencial

2.5.5.2. Voltamperometría cíclica

Consiste en aplicar al electrodo indicador un potencial triangular. Se lleva a cabo un barrido de potencial desde un valor inicial (E_i) hasta un valor denominado potencial de cambio o de inversión (E_c) en el que se invierte la dirección del barrido. El margen de potenciales elegido debe ser aquel en el que tenga lugar la oxidación o la reducción del analito controlada por la difusión (Imagen 2.25-A).

Se opera sobre una disolución en reposo obteniéndose el voltamperograma correspondiente (Imagen 2.25-B).

Los parámetros importantes son los potenciales del pico anódico (E_{pa}) y catódico (E_{pc}) y las correspondientes intensidades de ambos picos (I_{pa} e I_{pc}).

Esta técnica es la más eficaz para llevar a cabo estudios sobre mecanismos de reacciones electrónicas y es la empleada en este proyecto.

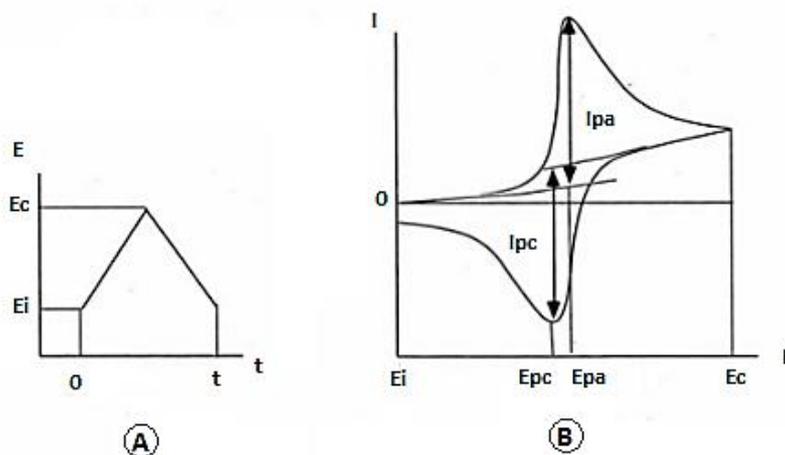


Imagen 2.25: Voltamperometría cíclica: A) Variación del potencial aplicado en función del tiempo; B) Curva intensidad-potencial

El máximo en intensidad (I_{pa}) ocurre al potencial en el que se produce la oxidación del analito (E_{pa}), por lo que es considerado el pico de oxidación. Del mismo modo, el mínimo en intensidad (I_{pc}) tiene lugar al potencial en el que se produce la reducción (E_{pc}) y se le conoce como pico de reducción. Si se trata de un voltamograma de una disolución compleja habrá tantos picos de oxidación y reducción como especies se oxiden y reduzcan.

En función del voltamograma obtenido podemos apreciar tres tipos de reacciones diferentes: reversible, cuasireversible e irreversible.

- **Proceso reversible**

La velocidad de la transferencia de electrones es más grande que la velocidad del transporte de masa, y el equilibrio de Nernst siempre se mantiene en la superficie del electrodo (Imagen 2.26). Se cumple:

$$\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = \frac{59}{n} \text{ mV} \quad \text{Ecuación 5}$$

n es el número de picos

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1 \quad \text{Ecuación 6}$$

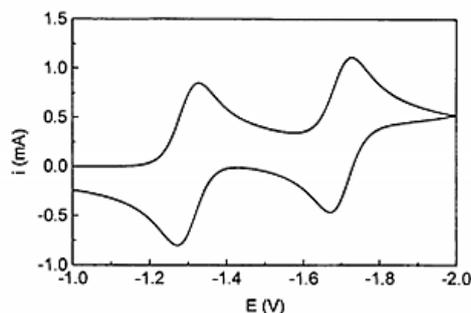


Imagen 2.26: Proceso cuasireversible

El potencial de aparición de los picos de oxidación y reducción, así como las intensidades de dichos picos, son independientes de la velocidad de barrido.

- **Proceso cuasireversible**

La morfología del voltamograma se aproxima a un sistema irreversible al aumentar la velocidad de barrido (Imagen 2.27).

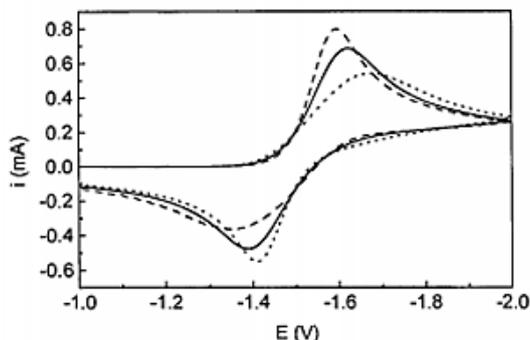


Imagen 2.27: Proceso reversible

- **Proceso irreversible**

Cuando la velocidad de transferencia de electrones es incapaz de mantener este equilibrio en el electrodo, la forma del voltamograma cíclico sufre algunos cambios. A bajas velocidades de barrido, la transferencia de electrones predomina sobre la transferencia de masa y el voltamograma registrado es como el de un proceso reversible. Sin embargo mientras la velocidad de barrido aumenta, la velocidad del transporte de masa

incrementa y llega a ser comparable con la de transferencia de electrones, el efecto a notar en los voltamogramas es la separación de los picos anódicos y catódicos y estaríamos ante un proceso irreversible (Imagen 2.28). Se cumple:

$$\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = \frac{-47.7}{\alpha n} \text{ mV} \quad \text{Ecuación 7}$$

αn es el número de electrones transferidos en el paso determinante de la reacción.

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} \neq 1 \quad \text{Ecuación 8}$$

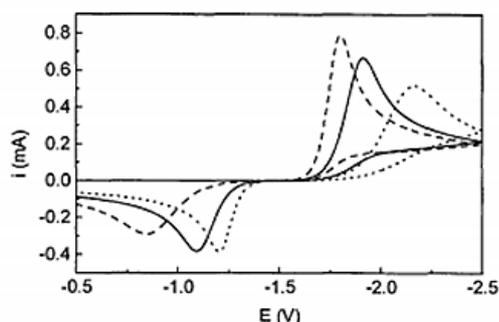


Imagen 2.28: Proceso irreversible

2.5.5.3. Voltamperometría hidrodinámica

Es una modalidad de la técnica voltamperométrica en la cual la disolución o el electrodo de trabajo se mantienen en movimiento, mediante agitación vigorosa de la disolución o rotación del electrodo.

Las técnicas hidrodinámicas presentan, en principio, una mayor sensibilidad que las técnicas estáticas, debido al incremento en la transferencia de masa de sustancia electroactiva al electrodo.

2.5.5.4. Voltametría diferencial de pulsos

La forma de la onda en la señal de excitación, consiste en una serie de pulsos en forma de escalera donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mV (ancho de pulso = ΔE_s).

La amplitud de pulso ΔE_p , se mantiene constante con respecto al potencial de base (Imagen 2.29).

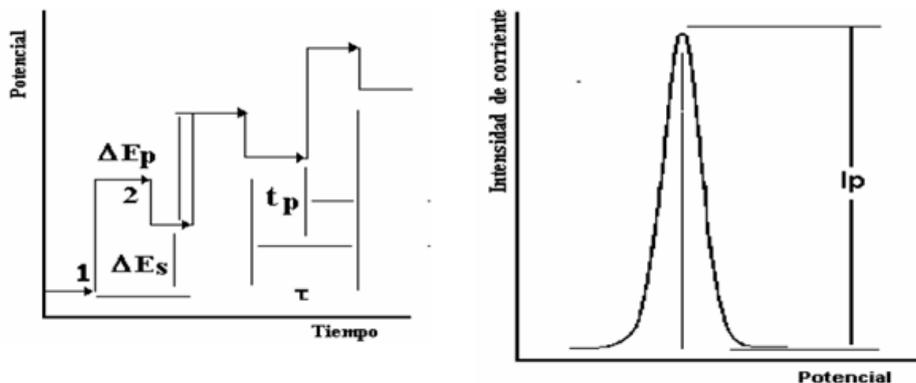


Imagen 2.29: Voltamperometría diferencial de pulsos: A) Variación del potencial aplicado en función del tiempo; B) Curva intensidad-potencial

2.5.5.5. Voltametría de redisolución

Se basa en la aplicación de un potencial constante lo suficientemente negativo como para depositar un metal sobre el electrodo (etapa de acumulación o electrodeposición). A continuación, tiene lugar una etapa de determinación por aplicación de un barrido de potenciales en sentido positivo en el que se registra la altura del pico de redisolución anódica correspondiente a la oxidación del depósito metálico previamente formado.

Presenta una serie de ventajas tales como, elevada sensibilidad y posibilidad de determinaciones múltiples.

2.6. Sensores

La utilización de sensores para resolver los problemas analíticos que la sociedad demanda hoy en día, está experimentando un crecimiento continuo, constituyendo una de las tendencias más relevantes en el ámbito de la Química Analítica moderna. Los sensores tienen muchos campos de aplicación como son la medicina, la robótica y todo tipo de industria. Por ello, este tipo de instrumentación es de gran importancia en el mundo de la ciencia y la tecnología y, en concreto, dentro del sector industrial en el cual se centra este proyecto, el sector agroalimentario [48].

Las ventajas que ofrece la tecnología de sensores respecto del resto de técnicas analíticas son claras y se citan a continuación:

- ✓ Permiten controlar el parámetro analítico de forma continua y en tiempo real. Se realizan por tanto, análisis in situ donde los resultados son visualizados simultáneamente en una plataforma informática.
- ✓ Se trata de una tecnología barata y fiable, que permite realizar análisis de forma rápida.
- ✓ Los sensores son dispositivos portátiles y de fácil manejo.

Podemos definir el concepto *sensor* como un dispositivo capaz de transformar magnitudes físicas o químicas, denominadas variables de instrumentación, en magnitudes eléctricas [49-50].

Dichas variables de instrumentación pueden ser la temperatura, intensidad lumínica, presión, humedad o pH, entre otras. Al hablar de magnitudes eléctricas, podemos referirnos a una resistencia eléctrica, una capacidad eléctrica, una tensión eléctrica o una corriente eléctrica.

Los sensores están formados principalmente por tres componentes (Imagen 2.30):

- ✓ Un **receptor o elemento de reconocimiento** que interacciona selectivamente con un analito de la muestra creando una señal primaria que es reconocida por el transductor. Pueden ser de tres tipos:

1. Químico: Son aquellos que responden selectivamente ante variaciones de un analito generando una respuesta química, como por ejemplo detectan cambios de concentración, pH, composición, etc.
 2. Físico: No hay reacciones químicas involucradas en la detección, este tipo de receptores detectan cambios en parámetros físicos como son la temperatura, la presión, el flujo de masa, etc.
 3. Biológico: En este caso los sensores químicos pasarán a denominarse biosensores, ocurre cuando el material receptor tiene una procedencia biológica, tratándose de enzimas, ADN o células, entre otros.
- ✓ El **transductor**, sobre el que se encuentra conectado el receptor, convierte la señal primaria en una señal secundaria fácilmente procesable. Los transductores empleados se clasifican en distintos tipos, citados a continuación:
1. Ópticos: Transforman la señal óptica resultante de la interacción entre el analito y el receptor, en una señal eléctrica. Se basan en distintas propiedades ópticas como la absorbancia, la reflectancia, luminiscencia o índice de refracción.
 2. Electroquímicos: Transforman la señal electroquímica producida debido a la interacción entre el analito y el receptor, en una señal eléctrica. Las interacciones pueden ser espontáneas o debidas a la aplicación de una corriente eléctrica.
 3. Gravimétricos: Al interaccionar el analito y el receptor se produce una variación de masa sobre la superficie del receptor la cual el transductor convierte en una señal eléctrica de salida.

4. Magnéticos: Se basan en el cambio de las propiedades magnéticas de los gases.
 5. Resistivos: La interacción entre el analito y el receptor da lugar a un cambio en la conductividad que se transforma en una señal eléctrica.
 6. Térmicos: Transforman el cambio de temperatura que tiene lugar en la superficie del receptor, producido por la interacción entre el analito y el receptor, en una señal eléctrica.
- ✓ El **amplificador de señal** se encarga de amplificar, acondicionar, procesar y presentar la señal en formato de dato.

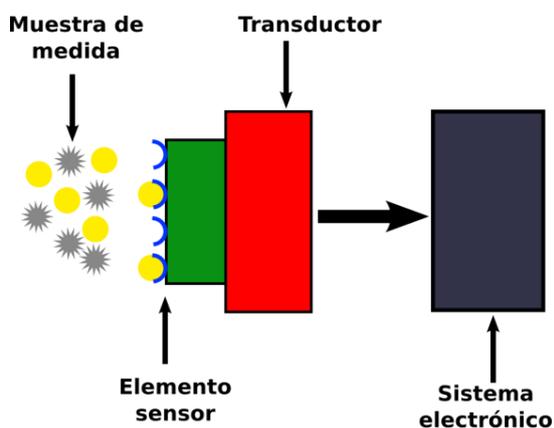


Imagen 2.30: Componentes de un sensor

En este proyecto se trabaja con sensores químicos y transductores electroquímicos ya que, en los últimos años, han sido uno de los principales objetivos de la investigación y publicación científica. Este hecho está justificado por las ventajas que presentan respecto a otro tipo de sensores, siendo estos más sencillos de fabricar, más económicos, más robustos en los análisis y con un menor tiempo de respuesta. Además presentan un amplio rango de linealidad en la respuesta analítica, la cantidad de muestra requerida para realizar el análisis es pequeña, los límites de detección son bajos y el equipo que modela la señal eléctrica, el potencióstato, es un equipo económico cuyo mantenimiento y manejo es sencillo.

Los **transductores electroquímicos** pueden ser divididos a su vez en varios tipos, como se presenta a continuación, según la técnica electroquímica empleada para obtener la información de la muestra (Ver Sección 2.5.2) [51].

1. Transductores conductimétricos: se basan en la variación de la conductividad, o de alguna propiedad asociada a esta, producida por el analito, ya sea en la solución medida o en la membrana selectiva.
2. Transductores potenciométricos: consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia.
3. Transductores amperométricos: se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo respecto a un electrodo de referencia, haciendo uso de una celda electroquímica de tres electrodos (Imagen 2.21).

Una variedad de transductores amperométricos son los **voltamétricos**, empleados en los métodos electroanalíticos conocidos como voltametrías (Ver Sección 2.5.3). La información del analito se obtiene al aplicar un potencial variable respecto al tiempo y registrando las intensidades de corriente eléctrica obtenidas al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado una determinada especie electroactiva, siendo dichas corrientes proporcionales a la concentración existente del analito. En función del potencial aplicado se obtienen las distintas voltametrías descritas anteriormente (Sección 2.5.5.1-2.5.5.5). Las ventajas que ofrecen este tipo de transductores van desde alta selectividad y sensibilidad, hasta gran versatilidad para analizar muestras multicomponentes.

Debido a las capacidades descritas de este tipo de transductor electroquímico y, al gran conocimiento sobre el que poseen los miembros del grupo de investigación en el que he realizado mi proyecto, estos han sido los sensores utilizados en la parte experimental del presente trabajo.

Existen distintas técnicas para la fabricación de sensores electroquímicos, los sensores aquí empleados se fabrican mediante la técnica de electrodos de pasta de carbono (Ver Sección 3.1). Estos electrodos son los que se emplean como electrodos de trabajo en el desarrollo del método electroquímico empleado (Ver Sección 2.5.1).

2.7. Antioxidantes

Los antioxidantes son un grupo amplio de sustancias biológicas activas los cuales se han generalizado en los alimentos. La dieta mediterránea se caracteriza por la ingesta de alimentos y bebidas ricos en antioxidantes, tales como manzanas, aceite de oliva y vino. Esta dieta tiene numerosos efectos beneficiosos en la salud, debido a que los antioxidantes contribuyen a la calidad del producto, influyendo en sus características organolépticas, y en la conservación del mismo [2].

La presencia de antioxidantes en alimentos retarda el enranciamiento oxidativo causado por el oxígeno atmosférico, protegiendo así a los aceites, las grasas y los componentes solubles en dichas grasas (vitaminas A, D, E, K) y otros ingredientes nutritivos.

El enranciamiento oxidativo consiste en la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con formación de peróxidos o hidroperóxidos, que posteriormente se polimerizan y descomponen dando origen a la formación de aldehídos, cetonas y ácidos de menor peso molecular. Las grasas que han experimentado oxidación son de sabor y olor desagradable y parecen ser ligeramente tóxicas para algunos individuos.

Además, los antioxidantes retrasan el deterioro del aspecto de los alimentos debido a su oxidación, como por ejemplo la decoloración en la carne o productos cárnicos o la aparición de manchas marrones en frutas y vegetales. Los antioxidantes se clasifican generalmente en dos grupos: natural y sintético.

Dado que los antioxidantes naturales son compuestos inestables y con frecuencia son relativamente caros, los fabricantes de alimentos a menudo

prefieren utilizar antioxidantes fenólicos estables sintéticos (ZEPA), tales como el butilhidroxianisol común (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroquinona butilado (TBHQ) [35].

El término “antioxidante” se aplica generalmente a aquellos compuestos que interrumpen las reacciones en cadena de los radicales libres implicados en la oxidación de los lípidos.

Los fenoles han atraído un especial interés debido a su actividad antioxidante necesaria para el correcto funcionamiento de las células y sus beneficios para la salud [31, 36]. Aparte de la ya citada actividad antioxidante, entre los beneficios para la salud que presentan los compuestos fenólicos, destacan sus propiedades anti-trombóticas, anti-bacterianas, anti-alérgicas y anti-inflamatorias. Desde 1980, varios estudios han mostrado que la disminución del riesgo de enfermedades crónicas, también se está relacionado con una dieta que contiene frutas y vegetales ricos en compuestos fenólicos [3]. Están representados por centenares de compuestos de diversa estructura química, pero que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos que llevan asociados uno o varios grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos se clasifican en dos tipos: compuestos no flavonoides y flavonoides. Los alimentos con mayor cantidad de compuestos fenólicos se indican a continuación:

- ✓ Fruta: dentro de este tipo destacan la baya, manzanas, melocotones, albaricoques, ciruelas, peras, uvas y cerezas. En las semillas y pieles, es donde se encuentran la mayor proporción de fenoles.
- ✓ Verdura: dentro de este grupo de alimentos destaca la cebolla amarilla, las alcachofas, las patatas, el ruibarbo, col roja, col rizada, puerros, tomates cherry, apio y brócoli.
- ✓ Granos: destacan el trigo sarraceno, centeno, avena, cebada, maíz, trigo y arroz, en orden descendente de contenido fenólico.

Los alimentos comunes que contienen estos granos incluyen panes, cereales, pastas y cereales.

- ✓ Legumbres: distintas variedades de guisantes y lechugas.
- ✓ Especias.
- ✓ Bebidas: sidra, café, leche de soya, leche regular, cacao, vino tinto, té negro y verde, y naranja y pomelo.

Varios métodos analíticos se han propuesto con el fin de cuantificar compuestos fenólicos en alimentos, bebidas y fluidos biológicos. Estas técnicas incluyen cromatografía, electroforesis y técnicas ópticas. Los compuestos fenólicos poseen un buen comportamiento electroquímico y esta actividad redox puede ser utilizada para caracterizar el contenido fenólico de una muestra empleando métodos electroquímicos. Por ello, las técnicas electroquímicas tienen mayor consideración, debido a su mayor sensibilidad, efecto insignificante de la turbidez de la muestra y la portabilidad inherente. En particular, las técnicas de voltametría se han empleado con éxito en la detección de compuestos fenólicos en agua en soluciones de agua y medios complejos acuosos tales como tés, vinos, cervezas, etc. [37-38].

Los compuestos antioxidantes que se analizan en este proyecto son fenólicos: ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogalol. Se han seleccionado debido a su presencia e importancia en la mayoría de vinos y mostos [42, 47].

Hasta el momento, muchas de las técnicas usadas en la detección de antioxidantes han sido desarrolladas para el análisis de muestras a nivel de laboratorio y requieren de técnicas pretratamiento complejas y lentas. Por ello, la introducción de nuevas técnicas prometedoras, como es el uso de EPC y EPC modificados con nanopartículas desarrollada en este proyecto, presenta una alternativa muy llamativa para la detección de estos compuestos.

2.8. Lenguas electrónicas

2.8.1. Concepto y evolución histórica

En los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica para analizar líquidos de composición compleja, conocida como lengua electrónica. Consiste en un conjunto de sensores químicos no específicos acoplados a una técnica de reconocimiento de patrones, de tal manera que cada uno de los sensores que la constituyen aporte una respuesta y así, obtener más información (cualitativa y cuantitativa) acerca de una solución multicomponente. Se trata por tanto de un sistema analítico ideado para la obtención de información global de la muestra estudiada, siendo los sensores que la componen los que definen la capacidad analítica de la misma [5].

En 1989, Toko y colaboradores crearon la primera lengua electrónica para el análisis de bebidas tales como cerveza, sake, café, té o leche, entre otras [52].

Posteriormente a la invención de esta primera lengua electrónica y, hasta la fecha, se han publicado numerosos trabajos sobre esta tecnología, principalmente aplicada al análisis de alimentos y bebidas.

A partir de la década de 1990 el diseño y presentación de estas nuevas herramientas de análisis se hizo muy popular, permitiendo la realización de análisis cualitativos de muestras, que incluían la discriminación y detección de especies químicas y la identificación de aromas o sabores. Se aplicaron de forma general al análisis de alimentos y bebidas, y en particular, al análisis de antioxidantes, cervezas y vinos [39].

Los sensores más empleados en las lenguas electrónicas son de naturaleza electroquímica, especialmente potenciométricos y amperométricos [2]. En los potenciométricos se mide el potencial de membrana creado por la difusión de iones a través de una membrana selectiva [53] y en los amperométricos se pueden emplear gran variedad de materiales, entre ellos destacan las membranas dopadas con ftalocianinas [54].

También se han desarrollado sensores voltamétricos que permiten una mayor versatilidad y sensibilidad que los anteriores

En los años 2003-2004 se desarrolló la primera lengua electrónica voltamétrica basada en electrodos modificados químicamente, en el Laboratorio de Química Inorgánica y Química Física de la Universidad de Valladolid dirigido por la Profesora María Luz Rodríguez Méndez [40]. Esta lengua electrónica estaba basada en sensores preparados con pasta de grafito donde las ftalocianinas se mezclaron con polvo de grafito y aceite mineral (Nujol) y se aplicaron en el análisis de vinos. En los años siguientes, Rodríguez Méndez y colaboradores publicaron numerosos trabajos basados en lenguas electrónicas voltamétricas con electrodos modificados con ftalocianinas en el análisis de vinos y uvas [55, 56].

Además se han desarrollado sistemas híbridos, principalmente combinando sensores voltamétricos y potenciométricos [57, 58].

Durante los últimos 10 años, se han utilizado diferentes materiales electroactivos como polímeros conductores, ftalocianinas o nanopartículas de óxidos metálicos, para aumentar la sensibilidad de los sensores que constituyen las lenguas electrónicas gracias a sus propiedades electrocatalíticas. También destaca en estos años la aparición de las conocidas lenguas bioelectrónicas, las cuales emplean biosensores electroquímicos que resultan especialmente interesantes en el análisis de fenoles y azúcares gracias a su alta sensibilidad y selectividad [59].

Los sensores empleados en este proyecto, están basados en los electrodos de pasta de carbono, y son de tipo voltamétricos (Ver Sección 2.6). Este tipo de sensores tienen la ventaja de presentar alta sensibilidad y versatilidad [40].

Los EPC están modificados con distintas nanopartículas de óxidos metálicos, cada una de las cuales presenta diferentes propiedades de unión a cada tipo de polifenol, formando complejos de transferencia en la superficie de los sensores individuales y obteniéndose distintas señales que son

cuantificadas y registradas. El uso de múltiples sensores de óxido metálico permite la validación cruzada de los resultados y aumenta la precisión de análisis [41-42].

En este proyecto, tras el tratamiento de los datos (Sección 2.8), se crea un patrón de reconocimiento de acuerdo con el número de grupos hidroxilos presentes en la estructura, que nos permite detectar si en la muestra a analizar disponemos de monofenoles, difenoles o trifenoles.

2.8.2. Justificación del uso de lenguas electrónicas

La razón del empleo de las lenguas electrónicas es su analogía con el sistema gustativo humano. La similitud entre la lengua biológica y la lengua electrónica se manifiesta en cada una de sus etapas.

La lengua es el principal órgano gustativo del cuerpo humano cuya superficie está recubierta por pequeñas papilas gustativas cada una de las cuales es capaz de detectar un determinado estímulo al entrar en contacto con los alimentos: ácido, salado y dulce. En los sistemas de lengua electrónica la función del alimento lo realizan muestras de carácter líquido, que al entrar en contacto con los sensores actúan de forma similar a la relación de los alimentos con las papilas gustativas.

Los sensores que constituyen la lengua electrónica no suelen ser todos iguales, sino que poseen diferentes tipos de sensibilidad, de la misma forma que hay diferentes papilas para diferentes gustos. Estos sensores realizan medidas que adquieren forma de señal eléctrica, la cual se envía a un ordenador y se compara con patrones de medidas para establecer las correspondientes analogías con sustancias conocidas. Del mismo modo, los nervios sensitivos del gusto transmiten la señal nerviosa al cerebro donde las neuronas procesan la información y asocian el nuevo producto a un sabor conocido.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando los sensores entran en contacto con un determinado compuesto presente en una muestra, dan lugar a una señal eléctrica. La suma de estas señales para todos los

compuestos de una muestra y para cada sensor, da lugar a una huella que es característica de cada sustancia. Por tanto, se requieren un conjunto de sensores cada uno con una sensibilidad y especificidad distinta. La suma de todas las huellas permite establecer un patrón de reconocimiento [39].

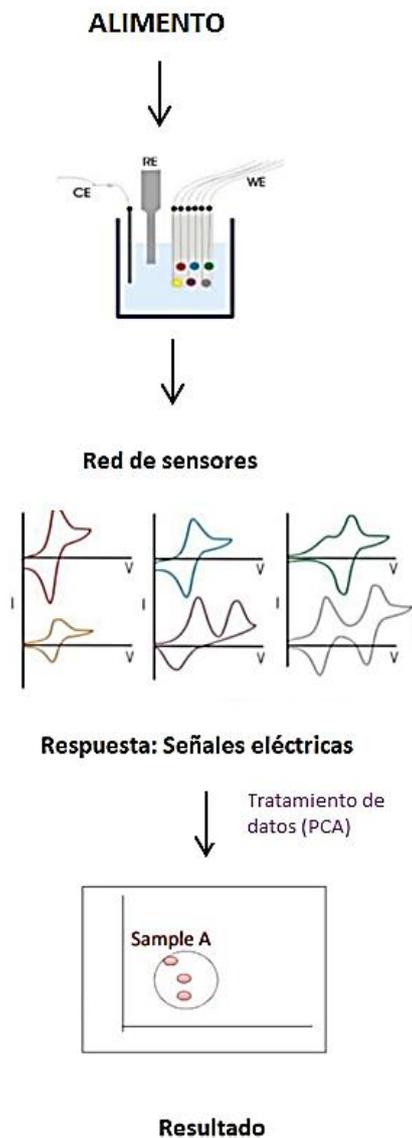


Imagen 2.31: Esquema del funcionamiento de las lenguas electrónicas

2.8.3. Características y ventajas de las lenguas electrónicas

La combinación de sensores químicos no específicos con sensibilidad parcial se traduce en una sensibilidad cruzada. La respuesta de la red de sensores que componen la lengua electrónica frente a una muestra a analizar

es una colección de señales, una huella dactilar, que se puede relacionar con ciertas características o cualidades de la muestra utilizando el software apropiado, con lo que permite llevar a cabo análisis cualitativos de sustancias para las cuales no se conoce un sensor selectivo.

Las lenguas electrónicas son muy utilizadas para conseguir respuestas cualitativas sobre las muestras de estudio y solamente en algunos casos para predecir concentraciones de especies individuales (análisis cuantitativos).

Se pueden emplear de forma continua en el control de calidad de procesos en línea en las industrias, tratándose de análisis *in situ*, que permitan la rápida toma de acciones en caso de que se detecten problemas en la calidad del producto, minimizándose los daños y las pérdidas económicas.

Las lenguas electrónicas presentan selectividad global, lo que se traduce en la descomposición de una sustancia química en cualidades del sabor y su cuantificación, en vez de discriminar cada sustancia química de forma individual.

Otras de las importantes ventajas en el empleo de lenguas electrónicas es que constituyen un método simple y robusto, los gastos de diseño o adquisición son bajos, no requieren personal altamente cualificado para su empleo, la muestra no se contamina ni se destruye y no se generan residuos[47]

2.8.4. Aplicaciones de las lenguas electrónicas

Las lenguas electrónicas tienen varias aplicaciones en distintas áreas industriales, destacando en la industria farmacéutica, cosmética y en la industria de alimentación.

En la industria alimentaria se ha empleado esta novedosa tecnología en los controles de calidad durante la producción para comprobar que el sabor de un producto se ajusta al sabor estandarizado, sustituyendo los paneles de degustación formados por catadores expertos, cuyas capacidades

se ven deterioradas con el paso del tiempo y alteradas por las condiciones ambientales, lo cual reduce la objetividad del análisis.

También se emplean en la etapa de almacenamiento de alimentos, en el control de los procesos de envejecimiento de productos como vino y quesos, en el análisis del envejecimiento del sabor en las bebidas alcohólicas y no alcohólicas o en la cuantificación del amargor de bebidas (café o cerveza) o compuestos disueltos [60-62].

En la industria farmacéutica se ha empleado para cuantificar la eficiencia en el enmascaramiento del sabor de comprimidos, jarabes, polvos, cápsulas o pastillas, así como para analizar la estabilidad de las medicinas en términos del sabor [63].

Además, también se han aplicado las lenguas electrónicas en el campo de la medicina, en diagnósticos no invasivos (orina, sudor, saliva, etc.) o en el análisis clínico; en el campo de la seguridad, en la detección de armas químicas y biológicas y en la detección de drogas y explosivos; en el campo de la vigilancia ambiental, en el monitoreo de la contaminación industrial y de agricultura, en la identificación de sustancias tóxicas o en la detección de fugas peligrosas y, en la industria química, en la pureza de productos o en el seguimiento de procesos [64-66].

2.8.5. Lengua electrónica voltamétrica

Los posibles sensores utilizados para el desarrollo de una lengua electrónica están recogidos en la Sección 2.6, destaca el uso de sensores de tipo óptico, electroquímico o magnético debido a su especificidad, alta sensibilidad, bajo tiempo de respuesta y facilidad de operación. En este proyecto se ha desarrollado una lengua electrónica empleando sensores electroquímicos, en concreto, sensores voltamétricos los cuales son considerados una variedad de los amperométricos.

En los sensores voltamétricos, se aplica un voltaje de polarización mientras se mide la corriente. Los voltamogramas muestran picos asociados a la oxidación y reducción de las moléculas presentes en la solución y su

intensidad es proporcional a la concentración. Este sistema es muy versátil porque se pueden utilizar diferentes materiales en los electrodos y se pueden aplicar diferentes técnicas de estudio (voltametría cíclica, voltametría de pulso o voltametría de onda cuadrada) [2, 67, 68].

2.9. Análisis de componentes principales (PCA)

Partiendo de una red de sensores (lengua electrónica) en la que todos los sensores responden a diversos analitos, se genera una enorme y compleja cantidad de datos. Cuanto mayor es la cantidad de datos, mayor es el número de coeficientes de correlación y más difícil la visualización de los mismos. Otro problema que se presenta, es la fuerte correlación que muchas veces existe entre las variables: si tomamos demasiadas variables, lo normal es que estén relacionadas o que midan lo mismo bajo distintos puntos de vista, siendo entonces necesario reducir el número de variables.

La quimiometría se encarga de la extracción de la información a partir de un procesamiento adecuado, en nuestro caso aplicaremos un análisis estadístico multivariante. Se distinguen cuatro etapas en el proceso de aplicación de este método:

1. El **pre-procesamiento de datos**, lleva a cabo un tratamiento previo para obtener una información de los datos suprimiendo información redundante, no significativa y así extraer la información útil. Algunos ejemplos de los procedimientos utilizados para reducir el número de variables son los polinomios de *Legendre*, la transformada de *Fourier*, o los *Kernels*.

Se emplea el método *Kernel*, el cual consiste en una función que divide cada ciclo de los voltamogramas en diez secciones llamadas *kernels* y toma un valor característico de cada tramo (Figura 2.32).

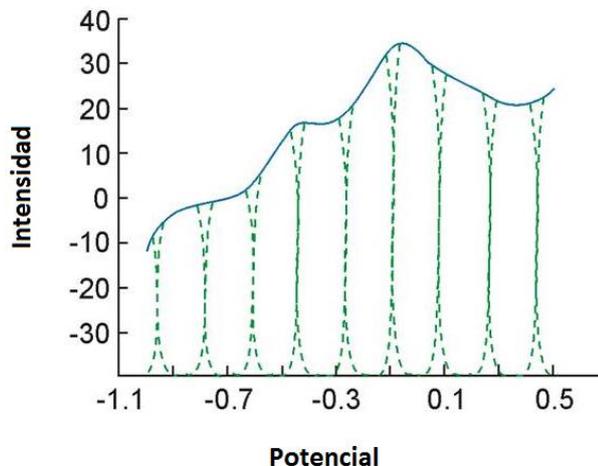


Figura 2.32: Método Kernel

2. Dependiendo del tipo de aplicación, están disponibles diferentes métodos para el **procesamiento de datos**. Existen métodos no supervisados los cuales discriminan muestras entre sí y métodos supervisados los cuales permiten clasificar muestras.

Si el objetivo es el análisis cualitativo se usan métodos no supervisados, el más empleado es *PCA* (Principal Component Analysis) aunque existen otros como, *PARAFAC* (Parallel Factor Analysis).

Cuando el propósito es cuantitativo, hay varias herramientas que dan información numérica como resultado final, destacan el *PCR* (Principal Component Regression), *PLSR* (Partial Least Squares Regression) o *ANN* (Artificial Neural Networks).

En este proyecto, se aplica el método *PCA*, cuyo objetivo es reducir la cantidad de variables originales (p) a un nuevo conjunto de variables (m).

Para estudiar las relaciones que se presentan entre p variables correlacionadas se puede transformar el conjunto original de variables, en otro conjunto de nuevas variables, llamado conjunto de componentes principales (m), que no estén correlacionadas entre sí y, por tanto, no exista redundancia en la información. Las nuevas variables son

combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la varianza total que recogen de la muestra, es decir, la primera componente principal PC1 recoge la mayor parte de la varianza que hay en el conjunto de datos, la segunda PC2 la siguiente mayor parte de la varianza y así sucesivamente, de tal manera que cuando exista una correlación significativa, sucederá que el número de componentes principales útiles será mucho menor que el número de variables originales, reduciendo así en gran medida la cantidad de datos a manejar.

PCA es un método lineal no supervisado de reconocimiento de patrones muy potente que reduce la dimensionalidad de los datos multivariantes y ayuda a visualizar las diferentes categorías de los perfiles multivariantes con altas similitudes y diferencias entre los conglomerados de las muestras. En esencia, PCA lleva a cabo un cambio de direcciones de los ejes en el espacio de datos para obtener como el primer eje aquel con una varianza máxima [37].

3. Después, se puede aplicar un **reconocimiento de patrones** para predecir la pertenencia a cualquiera de las clases. Para ello, se pueden utilizar herramientas como *SIMCA* (Soft Independent Modeling of Class Analogy), *LDA* (Linear discriminant analysis) o *SVM* (support vector machines).

La aplicación del análisis de componentes principales en este proyecto, ha permitido crear un patrón tridimensional que discrimina los fenoles analizados en función del número de grupos -OH que contengan [43].

CAPÍTULO III: DESARROLLO EXPERIMENTAL

En esta sección expondré el método experimental empleado para desarrollar este trabajo.

En primer lugar, se explicará detalladamente el procedimiento de fabricación de los electrodos de trabajo empleados, los cuales son electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de óxidos metálicos. Se expondrán brevemente las principales características del electrodo de referencia y del contraelectrodo utilizados y se indicará el montaje de la celda electrolítica.

A continuación, se cita el software empleado y los parámetros analíticos que son necesarios fijar para llevar a cabo los ensayos realizados en este proyecto (voltametría cíclica y en circuito abierto).

Por último, se expone una breve descripción de los reactivos y disoluciones empleados en los distintos análisis, así como las concentraciones y cantidades a emplear para su preparación.

3.1. Electrodo de trabajo. Procedimiento de fabricación de los electrodos de pasta de carbono (EPC)

Para la fabricación de EPC se sigue el procedimiento empleado por el grupo de investigación de sensores de la Universidad de Valladolid. Con él se han fabricado los dos tipos de electrodos de trabajo empleados en este proyecto: electrodos de pasta de carbono y electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de óxidos metálicos.

3.1.1. Materiales utilizados

- Cuchara-espátula
- Vidrios de reloj
- Balanza analítica de precisión
- Pipeta Pasteur
- Cable de cobre (ROMS Compliant) 1.2 mm de diámetro
- Tijeras pelacables

- Cúter
- Pinzas metálicas
- Clips
- Mechero
- Papel de plata
- Papel secante
- Jeringuillas desechables PVC 1 ml (BD Plastipak)

3.1.2. Compuestos empleados

Para elaborar la pasta de carbono con la que rellenaremos los electrodos usaremos grafito como componente mayoritario, en concreto, Grafito Ultra “F” purity (MERSEN USA). El producto usado en el laboratorio se observa en la Imagen 3.1



Imagen 3.1: Grafito Ultracarbon F purity

Las nanopartículas de óxidos metálicos empleadas son las siguientes:

- Óxido de titanio (IV), TiO_2 : las nanopartículas empleadas en el laboratorio son comerciales (ALDRICH) de 21 nm y con una pureza mayor al 99,5%.

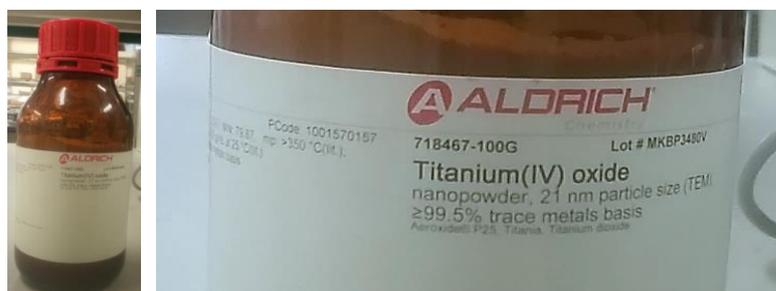


Imagen 3.2: Nanopartículas de TiO_2

- Óxido de cerio (IV), CeO_2 : las nanopartículas comerciales (ALDRICH) empleadas en el laboratorio tienen un diámetro máximo de 25 nm.

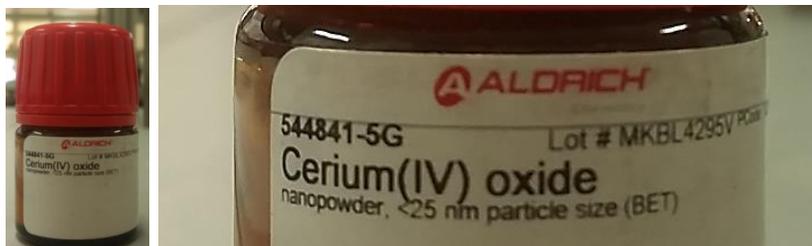


Imagen 3.3: Nanopartículas de CeO_2

- Óxido de níquel (II), NiO : las nanopartículas empleadas en el laboratorio son comerciales (ALDRICH) de diámetro máximo menor a 50 nm y con una pureza mayor al 99,8%.

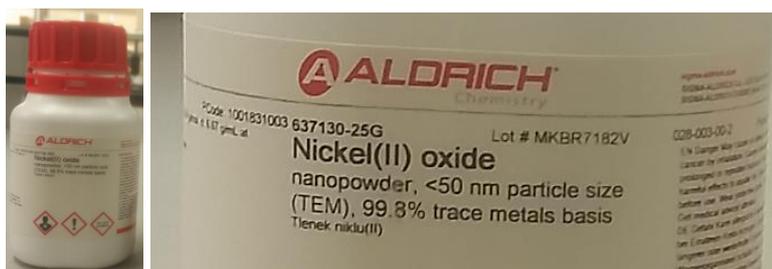


Imagen 3.4: Nanopartículas de NiO_2

Además será necesaria la adición de un agente conglomerante, en este caso, se empleará un aceite orgánico conocido como aceite de parafina o Nujol (BDH).

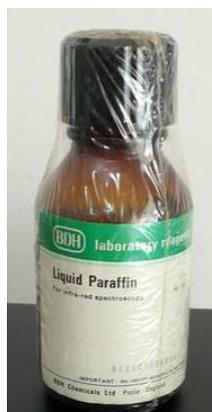


Imagen 3.5: Agente conglomerante: Nujol

3.1.3. Preparación de la pasta

Elaboraremos dos tipos de electrodos, unos en lo que la pasta sólo contenga grafito y otros en lo que la pasta contenga una parte de grafito y otra de nanopartículas de óxidos metálicos (NP-OM), en concreto, grafito-NP-TiO₂, grafito-NP-Ce₂O, grafito-NP-NiO. Tendremos por tanto cuatro electrodos distintos cuyas diferencias analizaremos después en base a los resultados obtenidos.

En cada tanda de pasta que preparemos tendremos la cantidad suficiente para llenar 4 electrodos, siendo la cantidad de pasta total a preparar 0,3-0,4 g. Las cantidades de cada componente a pesar serán las siguientes:

- ✓ Grafito: 0,17 g
- ✓ NP-OM: 0,03 g
- ✓ Nujol: 0,15 g

Si la pasta que queremos preparar es para la elaboración de los electrodos sin NP-OM, emplearemos 0,2 g de grafito. En el resto de los casos la cantidad de nanopartículas del óxido correspondiente será 0,03 g y la de grafito 0,17 g.

La cantidad de Nujol es un valor orientativo, deberá añadirse más o menos aceite en función de la consistencia de la pasta. Si la pasta ha de tener un peso total de 0,3-0,4 g, de los cuales 0,2 serán grafito o grafito-NP-OM, la cantidad de Nujol variará entre 0,1 y 0,2 g. Si añadimos mucho aceite la pasta será muy líquida y su introducción en la jeringuilla resultará muy complicada. Por el contrario, si añadimos poco aceite no conseguiremos dar la suficiente cohesión al conjunto de nanopartículas. El aspecto final de la pasta ha de ser continuo, oscuro y brillante.

Pesaremos los componentes de la pasta empleando una balanza analítica, Modela Radwag XA110 (Radwag Instruments, S.L, Polonia) como la recogida en la Imagen 3.6.



Imagen 3.6: Balanza analítica de precisión

Procedimiento de pesado:

1. Colocamos un vidrio de reloj en la balanza y taramos.
2. Con la espátula añadimos 0,17 g de grafito (0,2 g si vamos a elaborar electrodos sin NP-OM).
3. Añadimos las NP-OM correspondientes al electrodo que queremos fabricar hasta que la medida en la balanza sea 0,2 g.
4. Con una pipeta Pasteur nueva (para garantizar que esté completamente limpia) tomamos el Nujol y lo añadimos gota a gota sobre los extremos del vidrio de reloj hasta que la balanza marque el peso aproximado de 0,35 g. Se añade sobre los extremos para que si nos pasamos en peso podamos limpiar la gota con papel secante de laboratorio.

Procedimiento de homogenización

1. Con una espátula de acero se acerca el Nujol hacia el centro del vidrio de reloj donde están las partículas sólidas.
2. Se extiende la pasta sobre el centro del vidrio de reloj creando una capa fina con ayuda de la espátula colocada de forma plana.

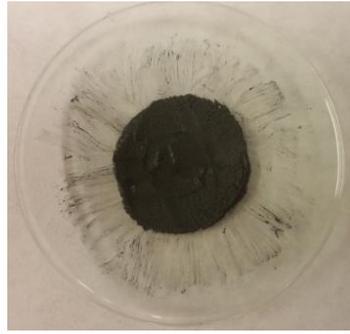


Imagen 3.7: Disposición de la pasta en capa fina

3. Se separan pequeñas porciones de la pasta y arrastrándolas con la espátula se llevan hasta los extremos opuestos del vidrio. Cambiando las porciones de lugar, conseguimos mayor homogenización.

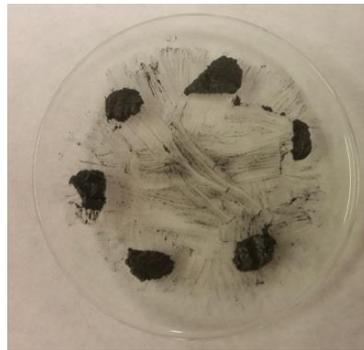


Imagen 3.8: Particiones de la pasta para la homogenización

4. Juntamos nuevamente toda la pasta en el centro del vidrio de reloj, arrastrando las porciones desde los extremos donde están situadas de forma radial hacia el centro.

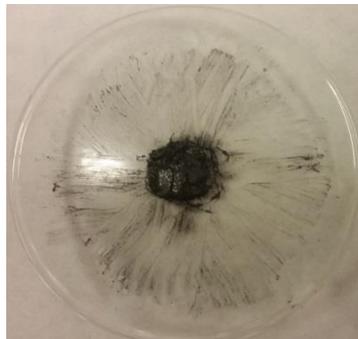


Imagen 3.9: Aglutinamiento de la pasta en el centro del vidrio de reloj

5. Repetimos los pasos 2, 3 y 4 sucesivamente durante 45 minutos. El resultado final será una pasta fina, homogénea y brillante.
6. La pasta se deja reposar durante 4-5 horas protegida de la luz (se coloca bajo un folio).

3.1.4. Preparación de los electrodos

La cantidad de pasta preparada anteriormente es suficiente para fabricar 4 electrodos. Tomaremos 4 jeringuillas de PVC de 1 ml, marca BD Plastipak (USA) y las separamos en sus partes:

- Aguja: la cual desecharemos ya que no es necesario su uso en la preparación de los electrodos.
- Émbolo: presenta cuatro ranuras longitudinales. Uno de sus extremos es una superficie plana para aplicar la fuerza y el otro es una pequeña esfera de plástico donde se encaja la caperuza negra de goma.
- Caperuza negra de goma.
- Cilindro externo: uno de sus extremos es más estrecho que el resto del cilindro y es la parte que posteriormente llenaremos con la pasta.



Imagen 3.10: Partes de la jeringuilla de PVC

Procedimiento de preparación de los electrodos

1. Tomaremos 20 cm de cable, marca ROMS Compliant (Tipo 2: BS4808 Part 2 Class 2), de cobre de 1.2 mm de diámetro exterior y pelaremos 1 cm en uno de los extremos y 2 cm en el otro. El extremo de 2 cm será la conexión con el potenciómetro mediante una pinza de cocodrilo y el extremo más corto será el que esté en contacto con la pasta de grafito y nanopartículas.



Imagen 3.11: Cable de Cu/Sn de 1.2 mm



Imagen 3.12: Esquema con las dimensiones del cable necesarias

Prepararemos otros 3 cables, para obtener 4 en total, como el indicado anteriormente.

2. A continuación deberemos tomar las 4 caperuzas negras de las jeringuillas las cuales solo tienen un agujero (el de unión al émbolo). Debemos hacer que el agujero sea pasante, esto es, perforar todo el ancho de la goma para que el cable pueda pasar a través de la goma.



Imagen 3.13: Caperuzas negras antes de ser perforadas

Para realizar el agujero tomaremos un clip desenrollado y lo sujetaremos con unas pinzas metálicas mientras lo quemamos con la llama del mechero. Con la otra mano cogemos unas pinzas con las cuales sujetamos la goma en la posición opuesta a la que está el agujero. Cuando el clip esté rojo lo acercamos en posición completamente vertical a la superficie de la caperuza de goma y ejerciendo una ligera presión conseguiremos perforar la goma hasta el otro extremo.

3. Debemos limpiar el interior de la caperuza de goma tras perforarla para eliminar todo el residuo de goma quemada. Para ello cogemos un clip limpio y le desenrollamos. Insertamos el clip en el orificio una y otra vez, limpiándolo con papel de laboratorio en cada paso, hasta que al extraerlo salga limpio, sin ningún resto de goma.
4. Cogemos el émbolo de una de las jeringuillas y cortamos con el cúter la parte final del émbolo en forma triangular siguiendo una de las 4 ranuras como muestra el corte 1 de la Imagen 3.14. Además debemos hacer un corte plano en la parte de la bolita del extremo final del émbolo en la misma dirección que el corte anterior siendo este el corte 2.

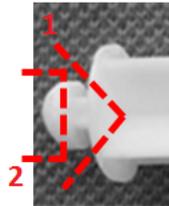


Imagen 3.14: Cortes sobre el émbolo

De esta manera obtenemos un conducto continuado a lo largo de todo el émbolo donde posteriormente colocaremos el cable.

5. Colocamos el cable sobre el conducto del émbolo creado en el paso anterior y enganchemos sobre la bolita del émbolo la caperuza negra perforada.



Imagen 3.15: Unión del émbolo, cable y caperuza negra

El conjunto anterior se introduce sobre el cilindro externo de la jeringa. El final del cable debe quedar a 2 mm del borde estrecho de la jeringuilla y debe estar recto, para ajustar la posición nos ayudaremos de un clip

completamente limpio para evitar introducir impurezas en el sistema. El otro extremo del cable se enrolla sobre sobre la parte superior del émbolo.



Imagen 3.16: Estado final de los electrodos antes de proceder a llenarlos con la pasta

3.1.5. Llenado de los electrodos con la pasta

Transcurrido el tiempo necesario para que repose la pasta (4-5 h), volvemos a mezclarla como se indica en los pasos 2, 3 y 4, del apartado proceso de homogenización (Sección 3.1.3) y procedemos a llenar los electrodos.

Procedimiento de llenado de los electrodos

1. Extendemos la pasta sobre el centro del vidrio de reloj con la espátula colocada en forma plana, creando una capa continua y fina (Ver imagen 3.7).
2. Colocamos la jeringuilla a 45° respecto del vidrio de reloj y la arrastramos desde un extremo hasta el centro, donde cambiamos la inclinación hasta colocarla en vertical. Repetimos el proceso arrastrando la pasta de toda la periferia hacia el centro.
3. Retiramos con la espátula la pasta sobrante, situada sobre el extremo de la jeringuilla, y la depositamos nuevamente en el vidrio de reloj.

4. Repetimos los pasos 1, 2 y 3, dos o tres veces hasta que la punta de la jeringuilla esté opaca y sin ninguna burbuja de aire.
5. Desplazamos la espátula de forma paralela al agujero, sin presionar la pasta hacia el interior y colocamos el electrodo lleno en posición horizontal.
6. Una vez que estén los cuatro electrodos llenos, los tapamos con un folio para protegerlos de la luz y los dejamos reposar en posición horizontal toda la noche.
7. Volvemos a llenar los electrodos como se indicó en los pasos 1, 2 y 3, sin embargo, ahora en el paso 2 cuando lleguemos al centro y coloquemos la jeringuilla en vertical debemos picotear. Repetimos este paso tres o cuatro veces hasta que obtengamos una matriz compacta y de color negro intenso.
8. Por último, desplazamos la espátula de forma paralela al agujero, sin presionar la pasta hacia el interior tratando de crear una superficie lisa en la pasta y retirando la pasta sobrante del borde. Cuando tengamos los cuatro electrodos llenos, procedemos al envoltorio de los mismos.

Procedimiento de envoltorio vertical de los electrodos

1. Tomamos un trozo de papel de laboratorio de aproximadamente 50 cm y lo extendemos horizontalmente sobre la mesa del laboratorio. Colocamos uno de los electrodos sobre el centro del papel, de tal forma que quede equidistante de los extremos superior e inferior. Dando una vuelta al papel, envolvemos el electrodo, teniendo cuidado de que mantenga la posición, para que no salga del papel secante la punta del electrodo que contiene la pasta. Colocamos otro electrodo y hacemos lo mismo. Repetimos este paso hasta envolver todos los electrodos, el resultado serán los cuatro electrodos envueltos y separados entre sí por capas de dicho papel.
2. Cortamos un trozo de papel de aluminio y envolvemos el conjunto anterior.

- Colocamos el envoltorio anterior en vertical ayudándonos de las pinzas del laboratorio.
- Dejamos que reposen durante 24 horas en esta posición.



Imagen 3.17: Reposo de los electrodos en vertical para su secado

- Cuando descolguemos los electrodos debemos etiquetarlos para su correcta identificación. Cortamos 4 trozos de cinta aislante y con un rotulador escribimos el material del que está hecho la pasta (C=Carbono, Ti=grafito-NPTiO₂, Ce=grafito-NPCeO₂, Ni=grafito-NPNiO) seguido del número del electrodo (1, 2, 3, 4).



Imagen 3.18: Estado final de los electrodos

3.2. Electrodo de referencia

El electrodo de referencia empleado para la realización de la parte experimental de este proyecto ha sido un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl).

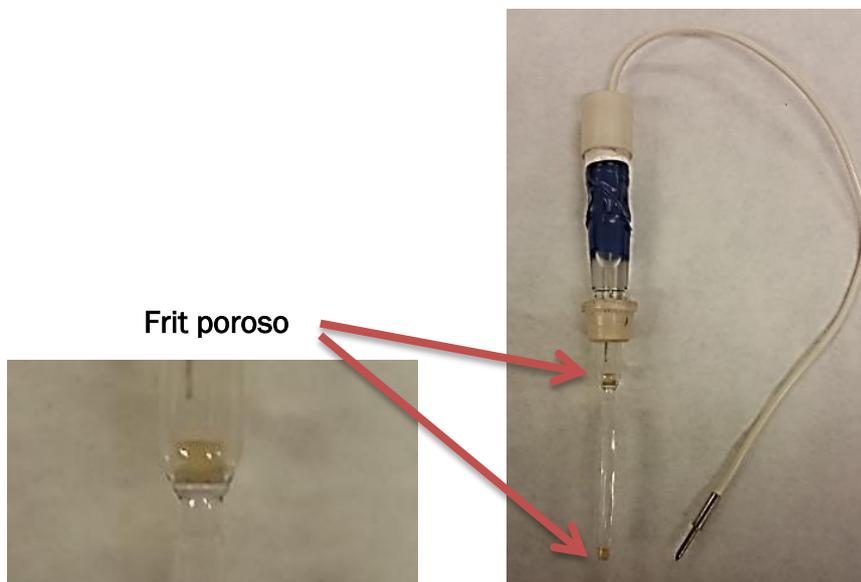


Imagen 3.19: Electrodo de Ag/AgCl

Consta de un hilo de plata metálica en contacto con una disolución comercial de AgCl 3M saturada. El electrodo se introduce en una disolución externa de cloruro potásico 0,1 M que debemos preparar en el laboratorio (Ver sección 3.6.2). Ambas disoluciones están separadas por un puente salino, un frit poroso, que permite el intercambio de iones.

La disolución interna de se ha de cambiar una vez al mes, mientras que la externa ha de cambiarse una vez por semana, ya que al estar en contacto con los diversos analitos sufre más ensuciamiento actuando como protección para conservar en mejor estado el hilo de plata.

Procedimiento de cambio de las disoluciones en el electrodo de referencia

1. Disolución interna, AgCl 3M: está contenida en un fino tubo de plástico que recubre el hilo de plata y cuya parte inferior está sellada con un plástico amarillo. Tomamos la disolución comercial (Imagen 3.20) con una

pipeta Pasteur limpia y llenamos el tubo de plástico. Colocamos el hilo de plata en el interior.

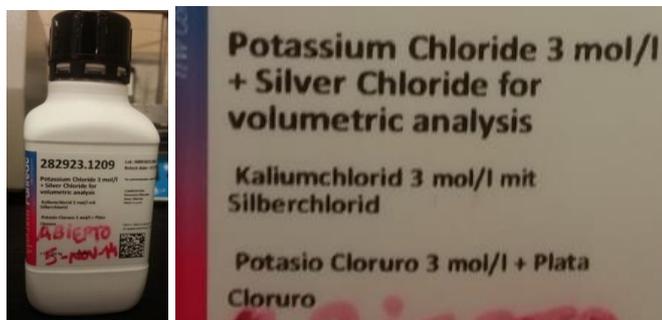


Imagen 3.20: Disolución comercial de AgCl 3M

2. Disolución externa, KCl 0,1 M: recubre exteriormente al tubo de plástico que contiene la disolución interna, indicado en el paso anterior. Usaremos una nueva pipeta Pasteur y empleando la disolución de KCl 0.1 M rellenaremos el cilindro de vidrio externo. Es muy importante que no quede ninguna burbuja de aire durante el llenado del tubo interno y el externo, ya que de modo contrario la transmisión de la señal no va a ser buena.
3. Introducimos el vidrio de plástico que contiene la disolución interna sobre el cilindro de vidrio que contiene la disolución externa y unimos el conjunto con cinta aislante, como puede verse en la Imagen 3.19.
4. Además es necesario que cuando no usemos el electrodo de referencia lo dejemos reposar en una disolución de KCl 0,1 M para que no se contamine ni estropee.

3.3. Contraelectrodo o electrodo auxiliar

En este proyecto se emplea una placa de platino como electrodo auxiliar. Sus dimensiones son 1cm·2cm, pero la parte sumergida en los analitos tendrá un área de 1cm².

La conexión al potencióstato se hace con el instrumento que aparece a la izquierda en la Imagen 3.21, cuyo proceso de fabricación se detalla posteriormente.



Imagen 3.21: Soporte para el electrodo auxiliar y placa de platino

Procedimiento de elaboración del soporte para la placa de platino

1. Tomamos el cilindro externo de una jeringuilla.
2. Cortamos 30 cm de cable Cu/Sn de 1.2 mm de diámetro y pelamos 5 cm un extremo y 2 cm el otro.
3. Hacemos pasar el cable por el interior del cilindro externo de la jeringuilla, el extremo que pasa a través del estrechamiento del cilindro externo de la jeringuilla debe ser el de 5 cm. Cogemos una pinza de cocodrilo y enrollamos dicho extremo del cable sobre la pinza.
4. Recubrimos la unión anterior (cable, pinza de cocodrilo y estrechamiento del cilindro externo de la jeringuilla) con cinta aislante.
5. Colocamos un septum perforado sobre el cilindro externo de la jeringuilla.

Antes de usar este electrodo debemos limpiar la placa de platino para retirar todas las impurezas. Dicho proceso de limpieza se detalla a continuación:

Procedimiento de limpieza de la placa de platino antes de su uso

1. Sujetamos la placa con unas pinzas metálicas y la mojamos en ácido sulfúrico (el extremo de las pinzas no debe mojarse con el ácido para evitar reacciones redox no deseadas).

2. Sin soltar la placa de las pinzas, quemamos la placa con el mechero hasta que esté incandescente.
3. Repetimos los pasos 1 y 2 un par de veces para retirar todas las impurezas y garantizar la limpieza.
4. A continuación lavamos la placa con agua destilada para que se enfríe.
5. Por último, secamos la placa con papel de laboratorio. Es importante no tocar la plaquita con las manos una vez que esté limpia, por lo que sujetando la placa nuevamente con las pinzas metálicas, abrimos la pinza de cocodrilo del soporte elaborado anteriormente y cogemos la placa por el mismo extremo que sujetaban las pinzas metálicas a la placa (este extremo no está limpio ya que no le metimos en ácido sulfúrico ni lo quemamos, por lo que no podemos introducirla en la disolución).

3.4. Montaje de la celda electrolítica

Para realizar las mediciones electroquímicas (voltametría cíclica) debemos montar la celda electrolítica que posteriormente conectaremos al potencióstato. El montaje de la celda electrolítica se expone en el siguiente apartado.

Procedimiento para el montaje de la celda electrolítica

1. Debemos colocar la disolución del analito a medir en una celda de vidrio como la que aparece en la Imagen 3.22.



Imagen 3.22: Celda de 50 ml que contendrá la disolución de interés

2. Cerramos la celda con la tapa que aparece en la Imagen 3.23. El soporte tiene 5 orificios en su parte superior para introducir los electrodos y, tiene también una palanca metálica que permite fijar la celda y la tapa.

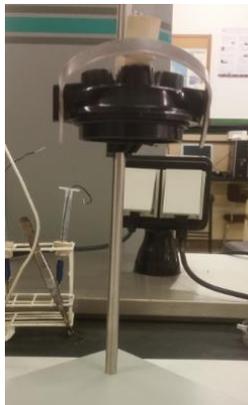


Imagen 3.23: Soporte para la celda electrolítica

3. Introducimos el electrodo de referencia en el agujero del centro del soporte.
4. El electrodo de trabajo que deseemos probar en dicho analito, se coloca en el agujero de la izquierda, con ayuda de un septum para mantenerlo en la posición vertical deseada.
5. El contraelectrodo se coloca a la derecha del electrodo de referencia.

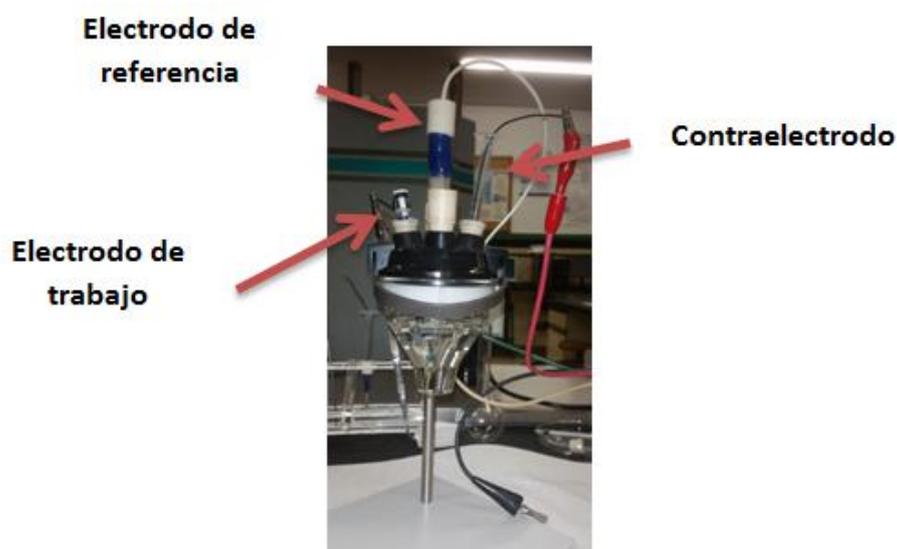


Imagen 3.24: Celda electrolítica

Es importante mantener esta configuración de trabajo en cada medición que se realice, de modo contrario los resultados no serán comparables, porque la configuración influye notablemente en los ciclos de la voltametría cíclica obtenida. Además es necesario que estén rectos y equidistantes, si no los resultados tampoco serán comparables.



Imagen 3.25: Confrontación correcta de los electrodos

6. Los otros dos orificios del soporte deberán taparse con septums no perforados para evitar que entre oxígeno en la celda durante la medición y se produzcan reacciones redox secundarias que afecten a los voltamogramas obtenidos.
7. A continuación se realiza la unión con el potencióstato. El cable blanco se une al electrodo de referencia, el verde al contraelectrodo y el rojo al electrodo de trabajo. El modelo de potencióstato empleado es Potentiostat/Galvanostat Model 263 A, EG&G instruments Princeton Applied (Inglaterra).

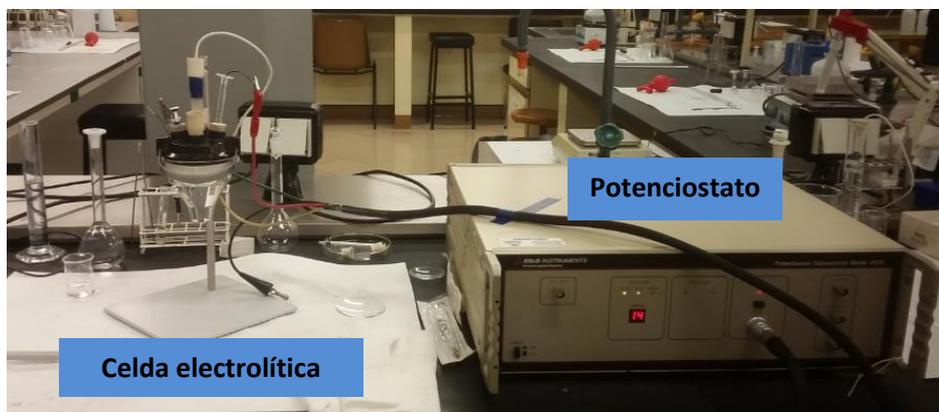


Imagen 3.26: Celda electrolítica unida al potencióstato

3.5. Software

El programa empleado para efectuar la voltametría cíclica fue el CorrWare (SAI-Corrwave Electrochemistry Software-3.3e) y su correspondiente visualizador para obtener gráficas superpuestas de las voltametrías, CView (SAI-CView -3.3e).



Imagen 3.27: Software empleado: CorrWave y CView

En primer lugar, debemos crear una carpeta donde se guardarán todos los ensayos. Pulsamos el botón Experiment → Insert New Experiment, y seleccionamos el tipo de voltametría que vamos a realizar.

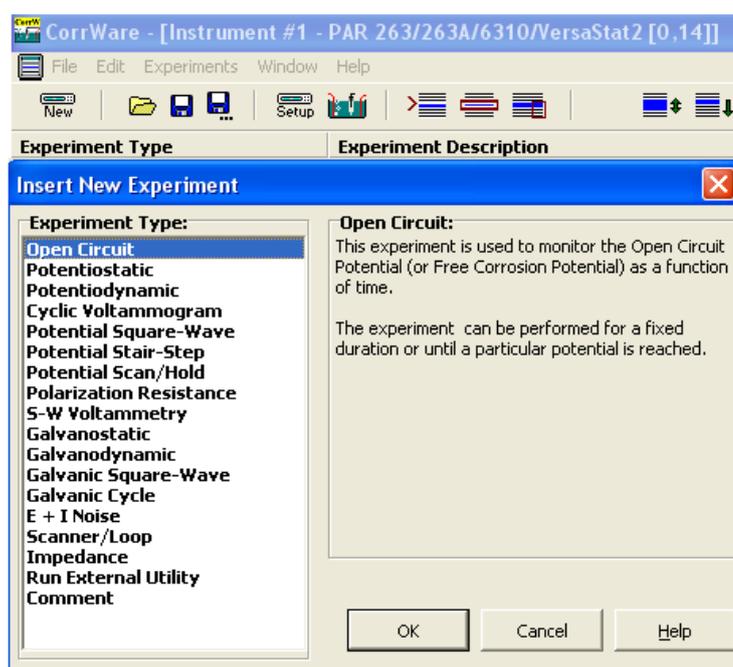


Imagen 3.28: Selección del tipo de voltametría

Para que el potencióstato se establezca, lo primero que vamos a realizar es una voltametría en “Circuito abierto”, por lo que seleccionamos dicha opción, tal y como se muestra en la Imagen 3.28. Aparecerá el experimento creado en la columna “Experiment Type”. Haciendo doble clic

sobre el experimento se abre el cuadro de diálogo mostrado en la Imagen 3.29.

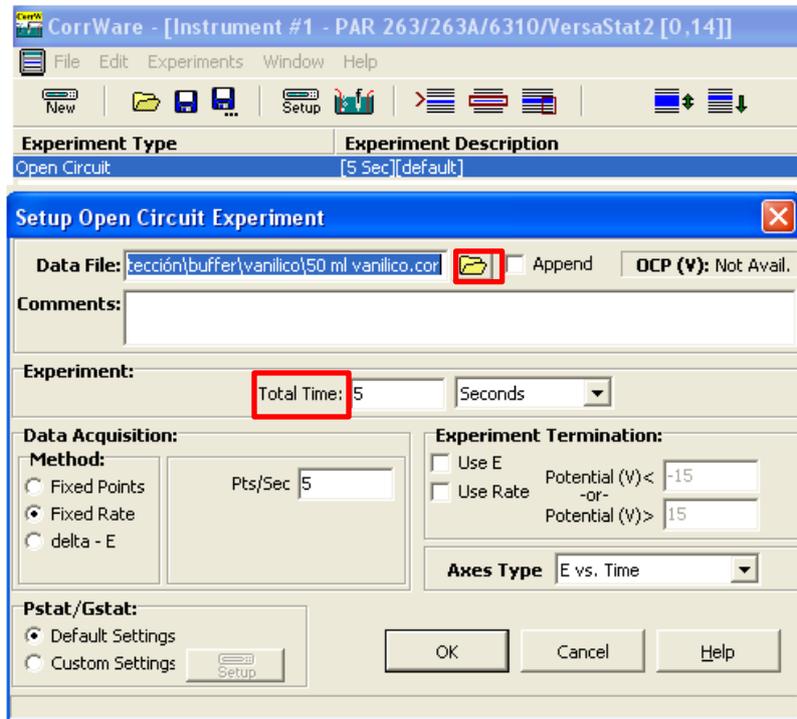


Imagen 3.29: Configuración de la Voltametría en circuito abierto

Pulsamos el botón de la carpeta y se abrirá una ruta de directorios en la cual seleccionaremos la carpeta creada al principio, donde se guardará el ensayo.

El tiempo de estabilización seleccionado para este proyecto es de 5 segundos, ya que tras varios ensayos se puede considerar que es suficiente (ambas selecciones se recuadran en rojo en la Imagen 3.29).

De la misma manera que antes, creamos un nuevo experimento ahora seleccionaremos la opción “Cyclic Voltammogram”, para que aparezca dicho ensayo en la columna “Experiment Type” y poder configurarlo. Al seleccionar dicho ensayo se abre el cuadro de diálogo que aparece en la Imagen 3.30.

Seleccionamos el directorio donde queremos guardar el ensayo y fijamos los parámetros característicos de la voltametría cíclica.

Debemos indicar el potencial inicial, final y el de los extremos. También es necesario indicar la velocidad de barrido y el número de ciclos a realizar.

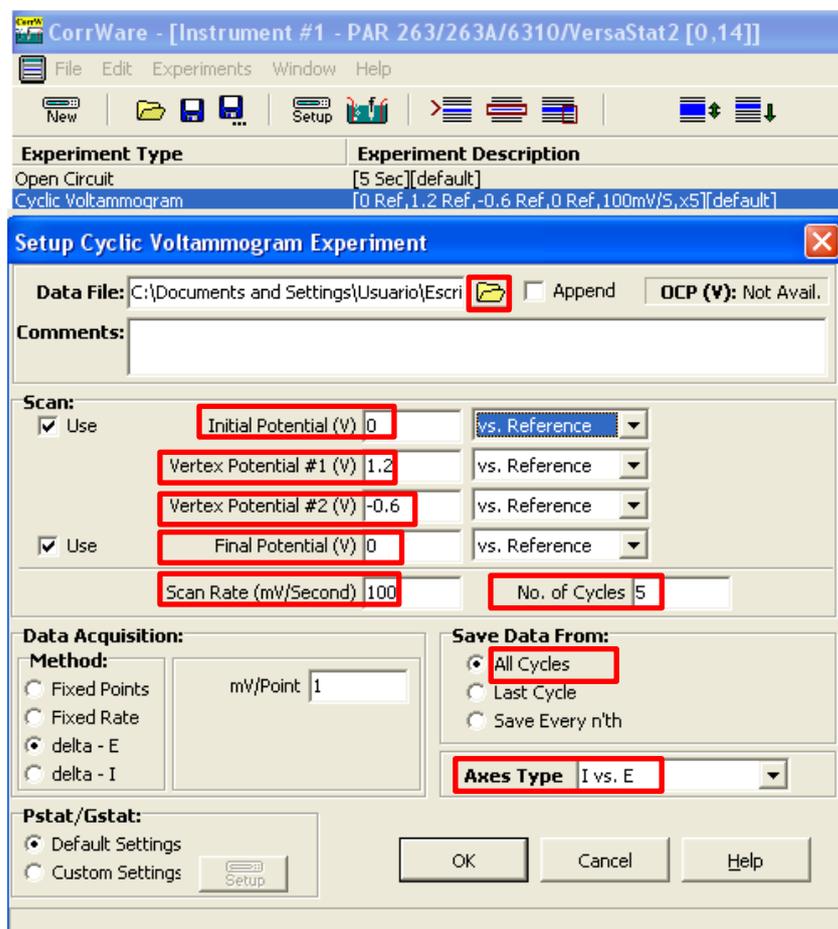


Imagen 3.30: Configuración de la Voltametría cíclica

Seleccionamos la opción de que se guarden todos los ciclos y de que nos represente la intensidad de corriente frente al tiempo. Es necesario comprobar que todas las medidas de potencial se realicen frente al electrodo de referencia, por lo que esta opción es la que debe aparecer a la derecha de las cuatro celdas del potencial. El resto de parámetros aparecen por defecto y no es necesario cambiar su valor. Los valores de los parámetros que aparecen en la Imagen 3.30 (todos los parámetros modificados se recuadran en rojo en la imagen indicada) y, que se recogerán nuevamente a continuación, son con los que se han realizado todos los experimentos y con los que se obtienen las mejores condiciones para el estudio.

Parámetros elegidos para la voltametría cíclica:

- *Tiempo de estabilización (circuito abierto):* 5 segundos
- *Velocidad de barrido:* 100 mV/s
- *Potenciales extremos:* [-0.6, 1.2]
- *Potencial final e inicial:* 0 V
- *Número de ciclos:* 5

Por último, es necesario fijar las condiciones de la celda electrolítica con la que trabajamos. Para ello, pulsamos el botón indicado en verde en la Imagen 3.31 y se abrirá un nuevo cuadro de diálogo.

Como se indicó previamente, el área sumergida del contraelectrodo de platino es de 1 cm² y el electrodo de referencia empleado es el de Ag/AgCl (Saturado KCl), por lo que seleccionamos ambas opciones (señalas en rojo en la Imagen 3.31).

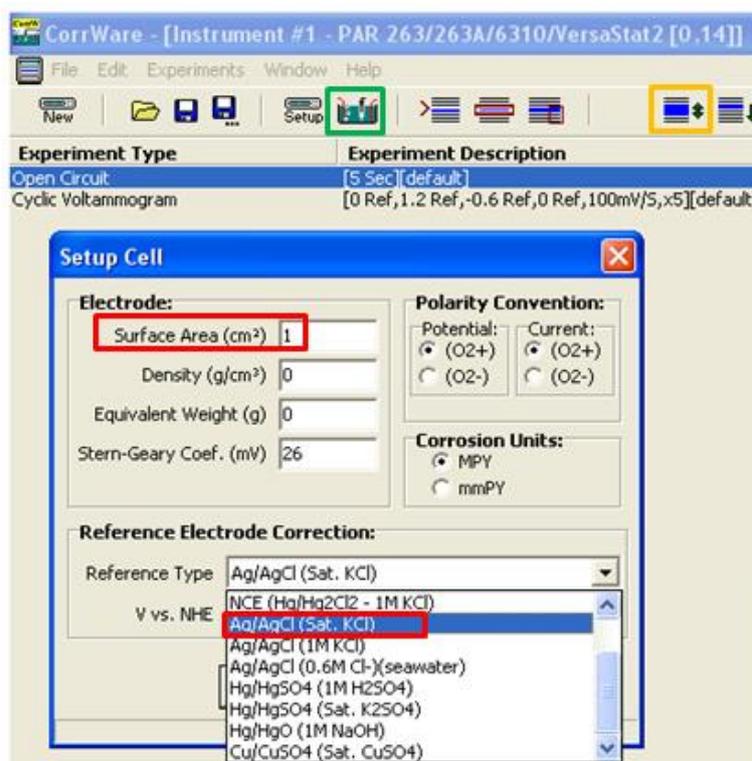


Imagen 3.31: Configuración de la celda electrolítica

Para iniciar ambos ensayos programados, pulsamos el botón naranja que aparece en la Imagen 3.31. Una vez realizados los ensayos, podemos visualizar los voltamogramas obtenidos abriendo el programa “CView”. Pulsamos File→Data Files, buscamos el directorio de los ensayos que queremos abrir y pulsamos el botón que aparece recuadrado en rojo en la Imagen 3.32 para añadirlos al visualizador.

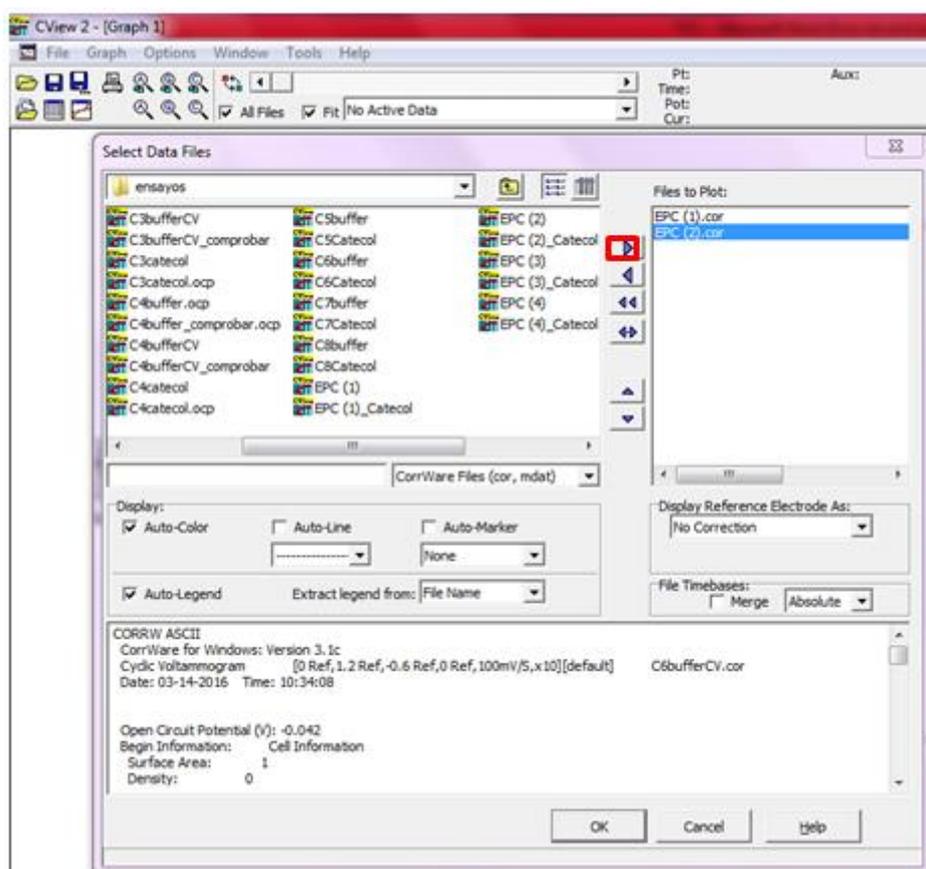


Imagen 3.32: Selección de los ensayos a visualizar

3.6. Reactivos y disoluciones

Los reactivos empleados en este proyecto son comerciales y se emplearán para fabricar las distintas soluciones de analitos que queremos estudiar. El disolvente empleado para fabricar dichas soluciones es el buffer fosfato y por ello, la preparación de este disolvente será el primer aspecto a tratar.

A continuación se explicará la obtención tanto de las disoluciones de ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogalol, como la de cloruro de potasio empleada como disolución externa del electrodo de referencia.

Cabe destacar el empleo de un dispositivo de ultrasonidos para facilitar la disolución de los distintos solutos cuando el disolvente está a baja temperatura o cuando la solubilidad del soluto es muy pequeña. En concreto el dispositivo empleado en esta experimentación es, Baño Ultrasonidos SELECTA Modelo 513 (Selecta Ultrasons, S.A, Barcelona) y podemos ver una imagen del mismo a continuación:



Imagen 3.33: Equipo de ultrasonidos: Selecta Ultrasons, Modelo 513

El agua destilada y desionizada que se emplea para la elaboración de la disolución buffer fosfato y la de KCl procede del equipo MilliQ MILLIPORE, en concreto se ha usado el modelo Progard[®] 2, que se observa en la Imagen 3.34.



Imagen 3.34: Equipo de destilación y deionización de agua: MilliQ MILLIPORE, modelo Progard[®] 2

3.6.1. Buffer fosfato (Solución tampón/amortiguadora)

Un tampón o buffer, es la disolución resultante tras la mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido débil y su base conjugada. Esta disolución reguladora tiene la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes, con lo que amortigua o impide las variaciones del pH.

El tampón fosfato está compuesto por el hidrógeno fosfato (HPO_4^{-2}) y el dihidrógeno fosfato (H_2PO_4^-) y se trata de un sistema eficaz para amortiguar el pH de disoluciones ácidas.

Prepararemos 1 litro de esta disolución cuya molaridad sea 0.01 M y pH resultante 7. Para ello debemos pesar en un vidrio de reloj usando una balanza analítica (Ver Imagen 3.6) las siguientes cantidades de los compuestos que se indican:

- ✓ $\text{NaH}_2\text{PO}_4=0,7318 \text{ g}$
- ✓ $\text{Na}_2\text{HPO}_4=0,5394 \text{ g}$

Los reactivos utilizados en la experimentación, son de pureza analítica, y se han obtenido en los laboratorios SIGMA-ALDRICH.

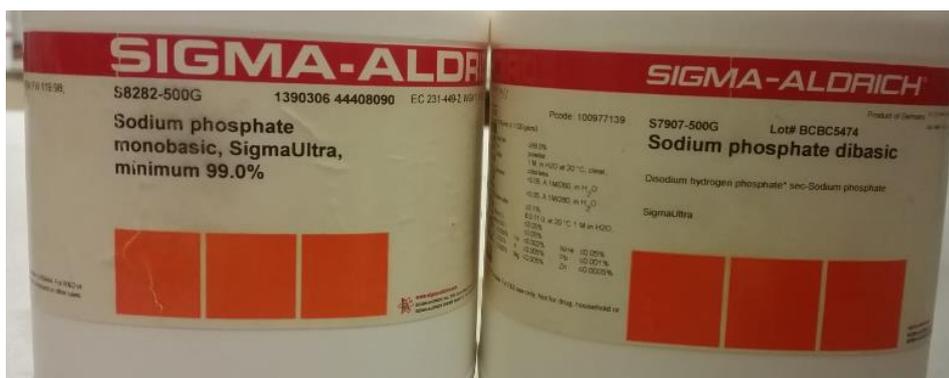


Imagen 3.35: Reactivos empleados para la elaboración de la disolución tampón: NaH_2PO_4 y Na_2PO_4

Hacemos el trasvase de estos compuestos a un vaso de precipitados de 250 ml y limpiamos bien la superficie del vidrio de reloj con agua destilada

para arrastrar las partículas más finas al vaso. Añadimos más agua destilada al vaso (aproximadamente hasta la mitad del mismo) y le cubrimos con un vidrio de reloj limpio para que cuando metamos el vaso al ultrasonido con la agitación ninguna gota penetre en nuestra disolución. Tras 3 minutos en el ultrasonido los compuestos estarán totalmente solubilizados en el agua destilada. Pasamos el contenido del vaso a un matraz aforado de 1 litro. Es necesario, al menos en dos ocasiones más, volver a llenar de agua destilada el vaso, remover ligeramente con la mano y verter el contenido al matraz para garantizar que todos los sólidos pasan al matraz. Por último, enrasamos con agua destilada el matraz y lo tapamos con Parafilm para evitar que se contamine.

Esta disolución podrá usarse durante varias semanas siempre que permanezca en la cámara frigorífica cuando no se use.

3.6.2. Cloruro de potasio (KCl)

Preparamos esta disolución para rellenar el cilindro externo del electrodo de referencia y para conservar el electrodo sin que se seque cuando no le estemos usando. Su concentración será 0.1 M en un volumen de 100 ml, por lo que tomamos 0.7455 g de KCl comercial (laboratorios SIGMA-ALDRICH), cuyo peso molecular es 74.55g/mol, y lo disolvemos en agua destilada. Esta disolución también puede conservarse durante varias semanas siempre que se tape y se guarde en una cámara frigorífica.

3.6.3. Catecol

El catecol, también conocido como 1,2-Bencenodiol, 1,2-dihidróxibenceno o pirocatecol, posee una fórmula estructural $C_6H_6O_2$ y un peso molecular de 110.11 g/mol. El catecol es un antioxidante presente en alimentos y que aporta numerosos beneficios para la salud. También se utiliza como antioxidante en muchas industrias (caucho, química, fotografía, colorantes, grasas y aceites).

El reactivo utilizado en la experimentación ha sido obtenido de en los laboratorios SIGMA-ALDRICH.

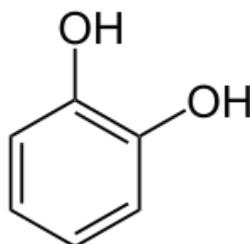


Imagen 3.36: Estructura de la molécula de catecol

La disolución de catecol que vamos a preparar es 10^{-3}M en un matraz de 100 ml, por lo que deberemos pesar 0.0110 g de pirocatecol y disolverlo en buffer fosfato. Esta disolución ha de utilizarse en el momento que se prepara ya que el catecol se oxida con mucha facilidad. Además es necesario envolver el matraz que contenga la disolución en papel de aluminio para protegerlo de la luz.

3.6.4. Ácido cafeico

El ácido cafeico, el cual no está relacionado con la cafeína, también es conocido como, ácido hidroxicinámico o ácido 3,4-dihidroxicinámico, posee una fórmula estructural $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ y un peso molecular de 180.16 g/mol. Este sólido amarillo es un antioxidante que contiene grupos funcionales fenólico y acrílico. Se encuentra en todas las plantas debido a que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, constituyendo uno de los principales fenoles naturales.

El reactivo utilizado en la experimentación ha sido obtenido de en los laboratorios ALDRICH.

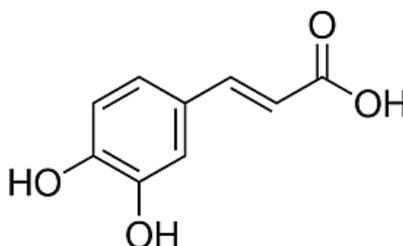


Imagen 3.37: Estructura de la molécula de ácido cafeico

La disolución de ácido cafeico que vamos a emplear es 10^{-3}M y tendrá un volumen de 100 ml, por lo que deberemos pesar 0.0180 g de ácido cafeico y disolverlo en buffer fosfato. Esta disolución ha de utilizarse en el momento que se prepara ya que se oxida con mucha facilidad. Además es necesario que esté durante 20 minutos en el ultrasonido para que se disuelva correctamente ya que la solubilidad es muy baja.

3.6.5. Ácido vanílico

El ácido vanílico, también conocido como ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, se trata de una forma oxidada de vainillina, que se emplea como agente aromatizante. Posee una fórmula estructural $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ y un peso molecular de 168.15 g/mol. Constituye uno de los principales fenoles naturales que se encuentran en los alimentos.

El reactivo utilizado en la experimentación ha sido obtenido de en los laboratorios FLUKA.

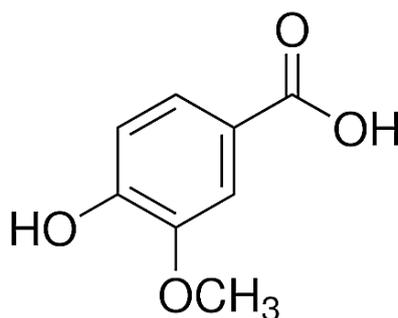


Imagen 3.38: Estructura de la molécula de ácido vanílico y

La disolución de ácido vanílico que vamos a preparar es 10^{-3}M en un matraz de 100 ml, por lo que deberemos pesar 0.0168 g de ácido vanílico y disolverlo en buffer fosfato. Esta disolución ha de utilizarse en el momento que se prepara ya que se oxida con facilidad.

3.6.6. Ácido pirogálico o Pirogalol

El pirogalol es un trifenol también conocido como, 1,2,3-bencenotriol o 1,2,3-trihidroxibenceno, cuya fórmula molecular es $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ y su masa molar 126.11 g/mol.

El reactivo utilizado en la experimentación ha sido obtenido de en los laboratorios SIGMA-ALDRICH.

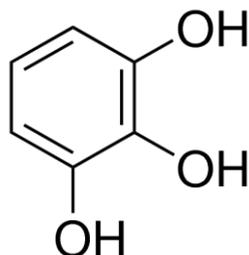


Imagen 3.39: Estructura de la molécula de pirogalol

La disolución de pirogalol que vamos a preparar es 10^{-3}M con un volumen de 100 ml, por lo que deberemos pesar 0.0126 g de ácido pirogálico y disolverlo en buffer fosfato. Esta disolución ha de utilizarse en el momento que se prepara ya que se oxida con facilidad.

3.7. Ensayos electroquímicos realizados

Los valores óptimos seleccionados para la realización de los ensayos y el proceso para su configuración fueron indicados en la Sección 3.5. Todos los ensayos recogidos en este capítulo fueron realizados bajo las mismas condiciones:

- **Tiempo de estabilización (circuito abierto): 5 segundos**
- **Velocidad de barrido: 100 mV/s**
- **Potenciales extremos: [-0.6, 1.2]**
- **Potencial final e inicial: 0 V**
- **Número de ciclos: 5**

En esta sección, se detalla el procedimiento experimental que es necesario llevar a cabo para poder obtener los resultados que satisfagan los objetivos de este proyecto. Los resultados obtenidos, así como la interpretación de los mismos, se recogen en el capítulo siguiente (CAPÍTULO IV).

3.7.1. Respuesta ante electrolitos básicos: Buffer fosfato

Es necesario conocer la señal que proporciona cada electrodo en un electrolito básico o blanco, para poder entender, identificar y comparar las señales que se obtienen al ensayar nuestro electrodo en distintos analitos.

Empleamos como blanco 50 ml de buffer fosfato (Sección 3.6.1), que medimos con una bureta y vertemos a la celda (Imagen 3.22). Realizamos el montaje de la celda electroquímica y las correspondientes uniones entre la celda y el potenciostato (Sección 3.4). Se programan las condiciones de trabajo (Sección 3.7) y se comienzan a realizar las voltametrías cíclicas.

En primer lugar, se miden los cuatro EPC sin modificar. Empleando el programa CView (Imagen 3.32) superponemos los voltamogramas obtenidos para estos cuatro electrodos y ya podemos interpretar y analizar los resultados.

Se hace lo mismo para los electrodos modificados con NP-OM: NP-TiO₂, NP-CeO₂ y NP-CeO.

3.7.2. Respuesta ante antioxidantes

Los experimentos que se recogen en esta sección consisten en mediciones de los distintos electrodos (EPC sin modificar y EPC modificados con NP-OM) sobre las diferentes disoluciones de antioxidantes en concentración 10⁻³ M.

Se prepara una de las disoluciones siguientes: catecol, pirogalol, ácido cafeico y ácido vanílico (Sección 3.6.3-3.6.6). Deben prepararse en el mismo momento en el que se van a realizar las voltametrías si no se oxidarán y los resultados obtenidos no serán válidos. El procedimiento que se detalla a continuación es análogo para cualquiera de las cuatro disoluciones que se van a estudiar.

Se toman 50 ml de la disolución preparada y se vierte en la celda (Imagen 3.22). Se realiza el resto del montaje de la celda electrolítica y sus uniones al potenciostato (Sección 3.4). A continuación se realizan los ensayos según las condiciones fijadas (Sección 3.7) utilizando, en primer lugar, un

electrodo de pasta de carbono sin modificar. Una vez obtenido el voltamograma, se cambia el electrodo y se realizan las voltametrías cíclicas para el resto de EPC modificados con NP-OM. Se emplea un programa de tratamiento de datos llamado OriginPro v8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Con este programa importamos los archivos de interés (voltamogramas cíclicos de cada electrodo) obteniendo tres columnas: potencial, intensidad y tiempo. El número de filas obtenidas, que a su vez corresponde al número total de puntos del voltamograma importado es 18000, por lo que si se han realizado 5 ciclos en cada voltamograma, cada 3600 filas comienza un nuevo ciclo. Sabiendo esto, se toma el último ciclo de cada voltamograma de interés que corresponde a las filas [14400-18000], como ya se explicó en la sección 4.1.1, la reproducibilidad de los ciclos aumenta al aumentar el número de los ciclos, por ello se selecciona el último de los ciclos obtenidos.

Con OriginPro se representa el último ciclo de los distintos electrodos (EPC, EPC-NPTiO₂, EPC-NPCe₂O y EPC-NPNiO) sobre un mismo analito (ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogalol).

De esta forma se obtiene una gráfica para cada antioxidante. Cada gráfica contiene cuatro voltamogramas (de un único ciclo cada uno), obtenidos con los cuatro tipos de electrodos que se están estudiando, pudiéndose comparar fácilmente las intensidades obtenidas y la posición de los picos anódicos y catódicos en función de cada tipo de electrodo.

3.7.3. Cálculo de límites de detección

El objetivo de esta sección es determinar el límite de detección (Teoría: Sección 2.4.4.3.) de cada tipo de electrodo en distintos analitos: ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogalol. Para calcular el límite de detección de un determinado electrodo de trabajo en un analito concreto, debemos comenzar llenando la celda con 50 ml de buffer fosfato (Modo de preparación: Sección 3.6.1). Se realiza el montaje de la celda electrolítica y

sus uniones al potencióstato (Sección 3.4). A continuación se realiza el primer voltamograma con las condiciones de ensayo fijadas en la Sección 3.5.

Cuando finaliza este ensayo, se toman 200 microlitos de la disolución a ensayar (Modo de preparación: Sección 3.6.3-3.6.6) con una micropipeta. Se retira uno de los septum que cubre uno de los dos agujeros vacíos del soporte de la celda electrolítica (Imagen 3.23) y se añade el contenido de la micropipeta a la celda. Es importante que la disolución se añada lo más cerca posible del electrodo de trabajo, para facilitar la transferencia de masas hasta la superficie del electrodo, pero sin tocar este y sin mojar la punta de la micropipeta con la disolución contenida en la celda.

Se tapa nuevamente el agujero con el septum y se realiza un nuevo ensayo de voltametría cíclica según las condiciones fijadas (Sección 3.5). Realizamos por tanto adiciones sucesivas de cantidades crecientes de la disolución del antioxidante de interés, siendo el último voltamograma el obtenido tras vaciar completamente el contenido de la celda y llenarla con 50 ml de la disolución de concentración 10^{-3} M del antioxidante que se está estudiando. En la tabla siguiente (Tabla 3.1) se recogen las adiciones realizadas y la concentración equivalente:

Tabla 3.1: Cantidades empleadas y concentraciones para el cálculo del límite de detección

| Adiciones de la disolución de interés (μ l) | Concentración equivalente (mol/l) |
|---|--------------------------------------|
| 200 | $4,0 \cdot 10^{-6}$ |
| 500 | $1,4 \cdot 10^{-5}$ |
| 300 | $2,0 \cdot 10^{-5}$ |
| 1000 | $4,0 \cdot 10^{-5}$ |
| 1000 | $6,0 \cdot 10^{-5}$ |
| 1500 | $9,0 \cdot 10^{-5}$ |
| 2000 | $1,3 \cdot 10^{-4}$ |
| 1000 | $1,5 \cdot 10^{-4}$ |

Una vez que tengamos todos los voltamogramas, tratamos los datos con OriginPro. Como se indicó en la sección 3.7.2, separamos el último ciclo de todos los voltamogramas y los representamos sobre una misma gráfica.

Tendremos la respuesta de un electrodo en concreto (EPC, EPC-NPTiO₂, EPC-NPCe₂O y EPC-NPNiO) para concentraciones crecientes de un mismo antioxidante (ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogallol).

A partir de este momento, se continua la explicación del cálculo del límite de detección suponiendo que trabajamos con EPC sin modificar y ácido vanílico como analito (*El procedimiento es análogo para cualquier tipo de electrodo ciclado en cualquier tipo de disolución antioxidante*).

El voltamograma que se observa a continuación (Figura 3.40) es el obtenido tras seguir el procedimiento indicado en el presente apartado.

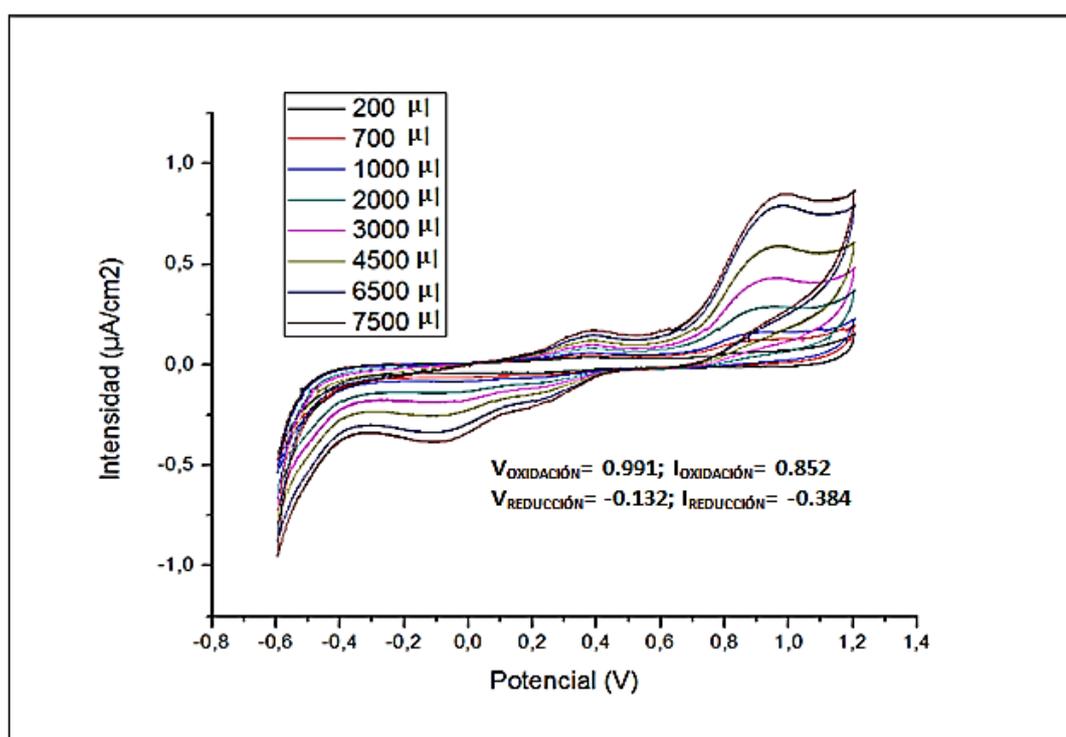


Figura 3.40: LD: Voltamogramas EPC sin modificar en ácido vanílico

Con la gráfica anterior y el archivo de OriginPro empleado para crearla, buscamos el valor de la intensidad máximo (pico oxidación) y mínimo (pico reducción) de cada voltamograma. Los datos mencionados se recogen a continuación, Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Intensidades de los picos anódicos y catódicos para las distintas adiciones

| CONCENTRACIÓN (mol/L) | INTENSIDAD ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | |
|-----------------------|--|-----------|
| | OXIDACIÓN | REDUCCIÓN |
| 4,00E-06 | 0,075 | -0,040 |
| 1,40E-05 | 0,129 | -0,064 |
| 2,00E-05 | 0,167 | -0,083 |
| 4,00E-05 | 0,293 | -0,139 |
| 6,00E-05 | 0,435 | -0,187 |
| 9,00E-05 | 0,596 | -0,254 |
| 1,30E-04 | 0,796 | -0,337 |
| 1,50E-04 | 0,852 | -0,384 |

Tomamos el valor de la señal de la intensidad de corriente en los potenciales de oxidación y reducción, siendo $V_{\text{oxidación}}=0.991$ V y $V_{\text{reducción}}=-0.132$ (Figura 3.40) para los 3 últimos ciclos del buffer fosfato (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Intensidades en los picos anódicos y catódicos de los tres últimos ciclos del blanco (Buffer fosfato)

| Nº CICLO | INTENSIDAD ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | |
|----------|--|-----------|
| | OXIDACIÓN | REDUCCIÓN |
| 3 | 4,741 | -1,941 |
| 4 | 4,865 | -1,935 |
| 5 | 5,040 | -1,875 |

Además, es necesario determinar el valor de la desviación estándar del blanco en la señal (intensidad) oxidación y en la de reducción:

$$S_{bl, \text{oxidación}}=0,151 \text{ y } S_{bl, \text{reducción}}=0,036$$

Representamos la concentración frente a la intensidad de oxidación y frente a la intensidad de reducción (Tabla 3.2), y realizamos un ajuste por mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta que relaciona ambos parámetros.

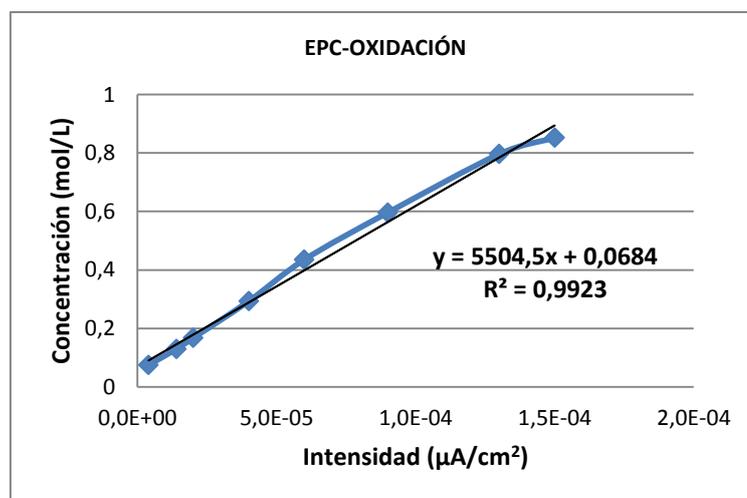


Figura 3.41: LD: Ajuste curva de oxidación

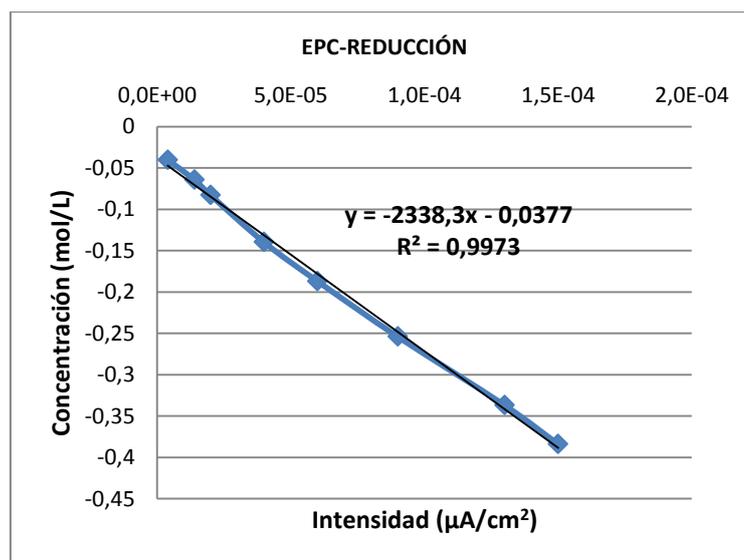


Figura 3.42: LD: Ajuste curva de reducción

En el ANEXO 1, se recogen todas las gráficas del ajuste para la oxidación y para la reducción de cada tipo de electrodo elaborado en cada tipo de fenol estudiado.

La fórmula empleada para calcular el límite de detección, es la Ecuación 4, que se dedujo en el Apartado 2.4.4.3.

$$C_m = \frac{3 \cdot s_{bl}}{m}$$

Ecuación 4

Conocida la desviación estándar del blanco (s_{bl}) y la pendiente (m) dada en las Figuras 4.11 y Figura 4.12, podemos calcular el límite de detección de ácido vanílico empleando EPC sin modificar para la reacción de oxidación y la de reducción, resultado:

Tabla 3.4: LD del ácido vanílico empleando EPC sin modificar

| | LÍMITE DETECCIÓN (mol/L) | |
|------------|--------------------------|------------------|
| | <u>OXIDACIÓN</u> | <u>REDUCCIÓN</u> |
| EPC | 8,21·E-05 | 4,64·E-05 |

Repitiendo el procedimiento anterior con el resto de electrodos y en cada tipo de disolución, obtenemos los límites de detección para cada tipo de electrodo en cada tipo de antioxidante de interés. El valor de los límites de detección y el resto de las figuras análogas a la 3.40, se recogen en la Sección 4.3.

3.7.4. Lengua electrónica y tratamiento de datos mediante PCA.

Se formó una lengua electrónica o red con los sensores preparados en este proyecto: EPC, EPC-NPTiO₂, EPC-NPCe₂O y EPC-NPNiO. Se analizan repetidamente mediante voltimetría cíclica los antioxidantes de interés en este proyecto: ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogalol con cada uno de los distintos tipos de electrodos. El objetivo es que, tras aplicar un análisis

estadístico multivariable (ver Sección 2.9), podamos discriminar entre los distintos antioxidantes.

A continuación se expone el procedimiento para tratar los voltamogramas cíclicos obtenidos con Matlab v2014b (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA).

Los datos registrados durante la voltametría cíclica suponen una gran cantidad de información, las señales registradas son curvas de pares de valores intensidad-potencial, siendo por ello necesario tratar esta información para reducir el número de variables y extraer las más relevante. Se emplea el método *Kernel* que, como ya se explicó, se trata de una función matemática que recorre la curva voltamétrica y divide cada ciclo de los voltamogramas en diez secciones llamadas *kernels* (Figura 2.32) y toma un valor característico de cada tramo permitiéndonos así reducir el gran número de datos o puntos de cada voltamograma. Estos valores son empleados como matriz de entrada del tratamiento estadístico realizado en el programa informático Matlab.

A continuación, se lleva a cabo una normalización de los valores obtenidos mediante la aplicación de un auto-escalado. Se trata de un centrado de datos (sustracción a cada valor de la media de la totalidad de los valores de intensidad de las señales) seguido de una división por la desviación estándar, de forma que todos los valores posean media 0 y varianza 1. Así, todos los valores tienen la misma escala, obviando la diferencia de rangos experimentales.

En este momento realizamos el análisis de componentes principales, Matlab crea una serie de coeficientes y gráficos que nos aportan la siguiente información:

- ✓ **Gráfico de puntuaciones o “scores”**: localización de los objetos o muestras en el espacio regido por las componentes principales.
- ✓ **Varianza explicada por las componentes principales** (PC1, PC2, PC3, etc.)

El análisis se realiza de manera independiente para la curva de oxidación, la curva de reducción y el voltamograma completo.

En función de cuánta varianza explique la suma de la primera componente principal y la segunda, podemos crear un gráfico de scores en dos dimensiones (2D) y observar si los antioxidantes se discriminan entre sí. En otros casos, si esta suma de varianza es pequeña se añade la tercera componente principal, *PC3*, y se obtiene un gráfico en 3D que contiene más varianza aún y por tanto, mayor discriminación. Se pueden añadir tantas componentes como sea necesario, siempre que la suma de las varianzas de las primeras sea baja y se requiera más información.

En este proyecto se recogen las gráficas en 2D y 3D, para establecer las ventajas e inconvenientes de cada tipo de visualización, en el caso de la reducción, de la oxidación y de la curva voltamétrica.

Estas gráficas son tratadas con CorelDRAW v17 (CorelDRAW, Ottawa, CANADA) para mejorar la calidad de las imágenes obtenidas con Matlab y se recogen en la Sección 4.4, donde además se analizarán los resultados obtenidos.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Respuesta ante electrolitos básicos: Buffer fosfato

En primer lugar, es necesario conocer la señal que proporciona cada electrodo en un electrolito básico o blanco, para poder entender, identificar y comparar las señales que se obtienen al ensayar nuestro electrodo en distintos analitos disueltos en estos electrolitos básicos.

Como se ha apuntado anteriormente, es muy importante en los ensayos de voltametría cíclica que vamos a realizar, reproducir y mantener las condiciones en la superficie del electrodo de trabajo en contacto con la disolución a estudiar.

Superficies diferentes entre sí, darán voltamogramas muy distintos para cada electrodo incluso habiéndose fabricado con la misma pasta, con lo que los resultados obtenidos no serán fiables si no garantizamos que los todos los electrodos presentan las mismas características superficiales.

Ciclar los electrodos en buffer fosfato como primer paso, permitirá desechar aquellos cuya superficie sea tan irregular que provoque ruido instrumental y señales electroquímicas erróneas.

En base a esto, se elaboraron una primera tanda con cuatro electrodos de cada tipo: EPC, EPC-TiO₂, EPC-Ce₂O y EPC-NiO, y se ciclaron en buffer fosfato para estudiar las características de su comportamiento que se acaban de citar.

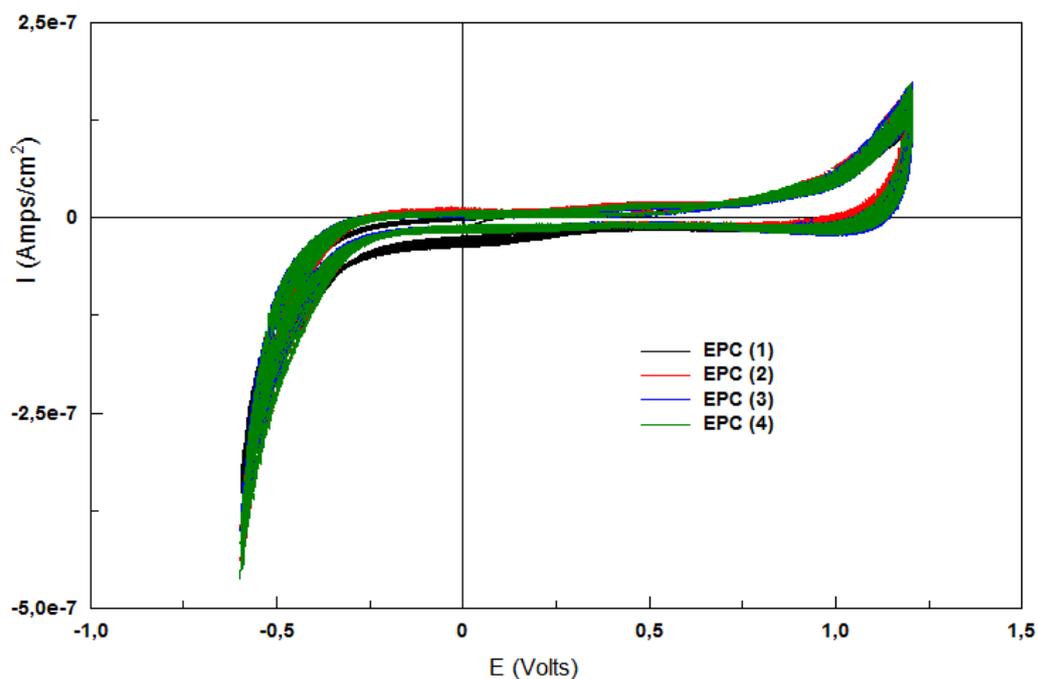


Figura 4.1: Voltamogramas en buffer fosfato a partir de cuatro EPC sin modificar

El voltamograma superior (Figura 4.1) se ha realizado con cuatro electrodos de pasta de carbono sin modificar elaborados con la misma pasta de grafito (Sección 3.1).

Se observa como los ciclos son superponibles, por lo que la reproducibilidad es excelente.

La presencia de poros o discontinuidades en la matriz puede afectar al voltamograma y evaluar el electrodo en buffer fosfato nos permite realizar un control de calidad sobre cada electrodo y la posibilidad de desecharlo antes de emplearlo en otros análisis.

El voltamograma de cualquier electrodo evaluado en buffer fosfato ha de ser plano en la parte central, ya que no existe ninguna sustancia susceptible de oxidarse o reducirse en dicha disolución. En cambio, en los extremos o bordes del voltamograma la intensidad debe subir y bajar bruscamente debido a que a ciertos valores negativos y positivos se produce la descomposición del agua. La zona plana es la zona de trabajo, conocida

como ventana, e interesa que sea lo más amplia posible para minimizar las interferencias del proceso redox que experimenta el agua con el estudio del analito de interés.

La presencia de algún tipo de pico anódico o catódico cuando analizamos una disolución buffer indica que algo no va bien, las causas principales se recogen a continuación:

- Parte de la disolución interna y/o externa de AgCl o KCl del electrodo de referencia, se haya salido del electrodo y estemos observando la oxidación y/o reducción de la plata.
- El electrodo de trabajo que estemos usando, puede que ya haya sido empleado en otros análisis con sustancias distintas del buffer y pueden haber quedado restos de estas sustancias en la superficie del electrodo por no limpiarle lo suficiente y entonces se observarán estos picos anódicos y/o catódicos de estas sustancias (aunque sean poco intensos).
- En otras ocasiones puede ocurrir que la placa de platino no esté bien limpia y queden restos de analitos procedentes de análisis previos.

Cabe destacar que la reproducibilidad de cada electrodo individualmente, aumenta a medida que aumenta el número de ciclos realizados. Esto quiere decir que los primeros ciclos que observamos en el voltamograma son menos fiables que los sucesivos, por lo que en los análisis de datos que haremos después estos ciclos serán despreciados.

La oxidación y la reducción del agua, también pueden apreciarse en la Figura 4.1. Tiene lugar en los puntos de potencial donde la corriente crece o decrece bruscamente, esto es a 1 V en el caso de la oxidación y, a -0.47 V en el caso de la reducción.

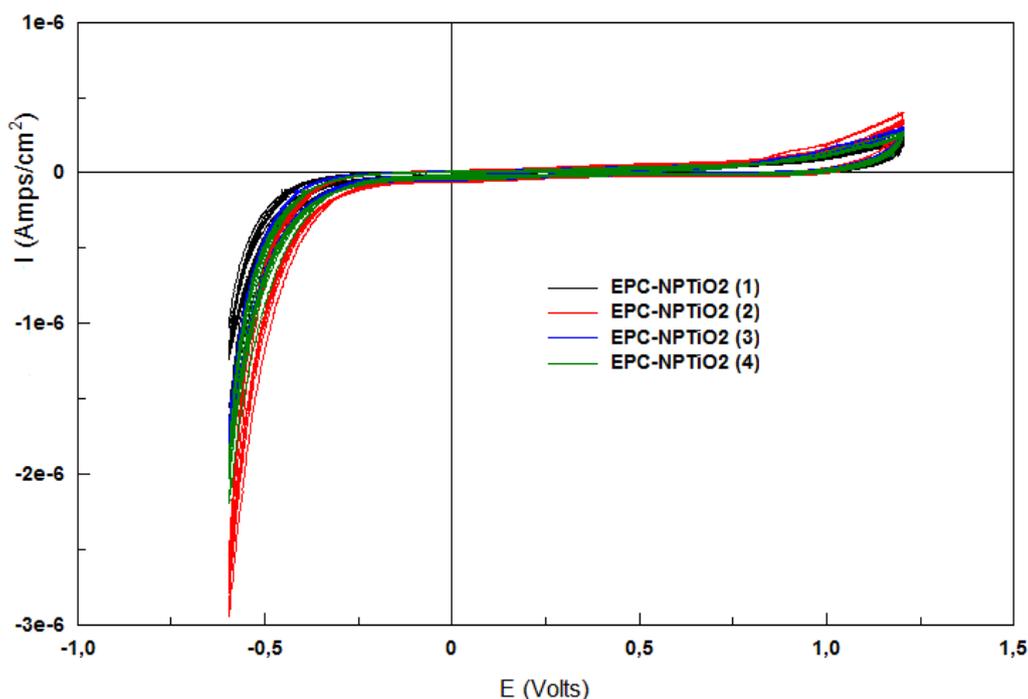


Figura 4.2: Voltamogramas en buffer fosfato, EPC modificados NP-TiO₂

El voltamograma superior se ha realizado con cuatro electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de TiO₂ elaborados en la misma tanda (para mantener las condiciones ambientales).

Como ya se ha explicado anteriormente, en una sustancia inactiva eléctricamente como el buffer fosfato, el voltamograma no debe presentar picos ni de oxidación ni de reducción, y esta característica se confirma de nuevo en la Figura 4.2.

Se observa que la reproducibilidad es alta, pudiéndose justificar las diferencias en los ciclos por la importancia del factor aleatoriedad en el proceso de elaboración de los electrodos. Sin embargo, estas diferencias son pequeñas y por ello se encuentran en el rango de lo aceptable analíticamente.

La oxidación y la reducción del agua, también pueden apreciarse en la Figura 4.2. La oxidación comienza a un valor de potencial de 0.8 V y la reducción a -0.25 V. Comparando este valor con el obtenido en el caso de EPC sin modificar, podemos afirmar que las nanopartículas de TiO₂ tienen

efecto electrocatalítico sobre la oxidación y reducción del agua, ya que estos procesos redox ocurren a potenciales menores en presencia de NP-TiO₂.

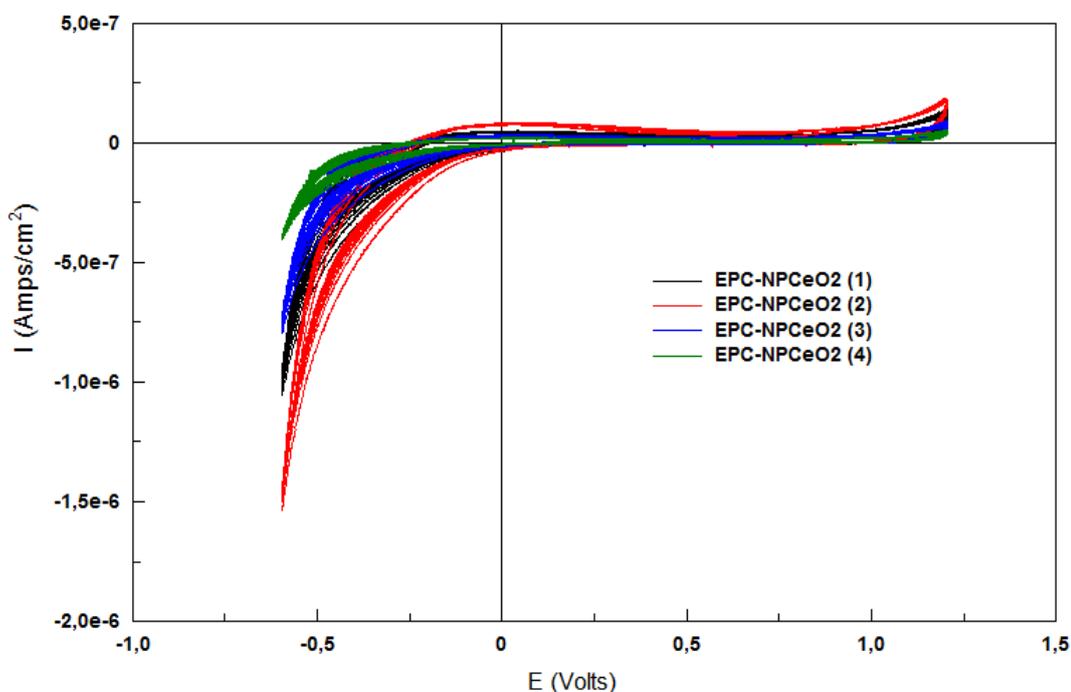


Figura 4.3: Voltamograma en buffer fosfato, EPC-NPCeO₂

El voltamograma superior (Figura 4.3) se ha realizado con cuatro electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de CeO₂ elaborados con la misma pasta. La reproducibilidad nuevamente es excelente y las desviaciones presentes se han justificado previamente.

Centrando la atención en el efecto catalítico de las nanopartículas, se observa que la oxidación del agua apenas puede observarse (0.87 V) mientras que la reducción se ve fácilmente y comienza a casi -0.2V. Nuevamente, podemos observar dicho efecto electrocatalítico de las nanopartículas, en este caso de las de CeO₂, en el proceso de reducción del agua de forma más marcada (intensidad mayor) que para los electrodos modificados con NP-TiO₂.

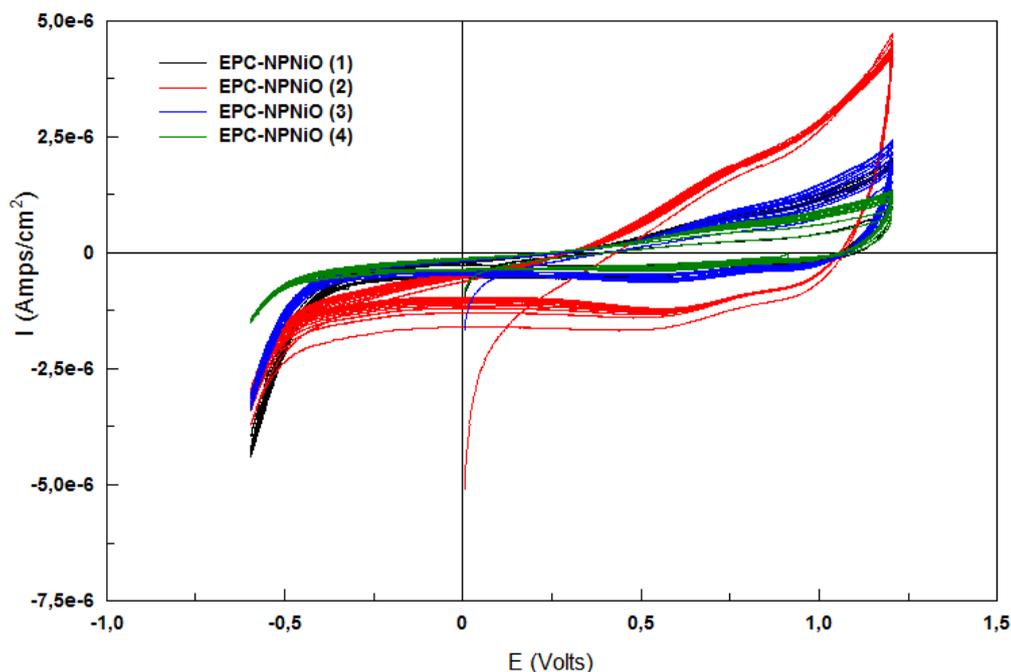


Figura 4.4: Voltamograma en buffer fosfato, EPC-NPNiO

El voltamograma mostrado en la Figura 4.4 se ha realizado con cuatro electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de NiO elaborados en una misma tanda. La reproducibilidad es buena y las desviaciones presentes en los electrodos 1, 3 y 4 son asumibles. Sin embargo el electrodo 2 (voltamograma rojo) se observa que por alguna razón se ha estropeado. Pese a limpiar la punta en sucesivas ocasiones y volver a ciclar el electrodo, el resultado siempre era el mismo, por lo que este electrodo está inutilizable.

En este caso se justifica la importancia de ciclar los electrodos en buffer antes de realizar otros experimentos, ya que así podremos desecharlos en casos como el que se observa para el electrodo 2 de la Figura 4.4, así se evitarán resultados erróneos.

Este electrodo modificado con NiO tiene un comportamiento diferente respecto a los anteriores, especialmente a potenciales positivos donde se obtiene una gran separación entre la onda catódica y la anódica. Esto indica

que el electrodo es muy sensible a la presencia de sustancias distintas al agua y, en este caso, se observa además la oxidación del fosfato.

A continuación, se presenta una tabla que recoja los potenciales a los que la oxidación y reducción del agua ha tenido lugar en el caso de cada tipo de electrodo. Con ello, se pretende ofrecer una mejor visualización de los resultados obtenidos en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1. Potenciales REDOX del H₂O para cada electrodo

| | POTENCIAL REDOX H ₂ O (V) | |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------|
| | OXIDACIÓN | REDUCCIÓN |
| EPC sin modificar | 1.00 | -0.47 |
| EPC- NP-TiO ₂ , | 0.80 | -0.25 |
| EPC-NP-CeO ₂ | 0.87 | -0.19 |
| EPC-NP-NiO | 1.00 | -0.37 |

Como puede apreciarse en la tabla superior, los electrodos modificados con nanopartículas de óxidos metálicos (TiO₂, NiO, CeO₂) han demostrado que catalizan la electrolisis del agua respecto los electrodos de pasta de carbono sin modificar al estudiar su respuesta en una disolución blanco (buffer fosfato).

Generan una señal electroquímica característica con una fuerte intensidad asociada al pico de disociación del agua. De esta forma se comprueba que el efecto catalítico de las nanopartículas resulta beneficioso en las mediciones electroquímicas.

4.2. Detección de antioxidantes con sensores

Una vez establecido el comportamiento de cada tipo de sensor en buffer fosfato, se realiza un estudio de la respuesta de los sensores a distintos tipos de compuestos fenólicos. Por tanto, el objetivo de los ensayos realizados en esta sección, es comparar la intensidad de la señal obtenida en la reducción y oxidación de cada antioxidante, en base a una intensidad de

referencia, que se considera que es la de los electrodos de pasta de carbono sin modificar.

Con esto se pretende demostrar que las propiedades físicas, eléctricas y estructurales de las nanopartículas de óxidos metálicos facilitan la transferencia de electrones, ofreciendo una señal electroanalítica de mayor intensidad en los picos de oxidación y reducción.

Se cuantificará este incremento en la intensidad de la señal para obtener una idea más clara de los beneficios del empleo de EPC modificados con NPs.

Con objeto de observar el efecto electrocatalítico que ofrecen distintos EPC modificados con NP-OM respecto de los electrodos sin modificar, se analizará la posición de los picos en los que la reducción-oxidación comienza, para verificar que las NPs hacen que ambos procesos tengan lugar a potenciales más pequeños.

Además se estudia la reversibilidad de la reacción electroquímica (Sección 2.5.5.2). Se puede afirmar que tiene lugar una reacción reversible si la intensidad del pico catódico es igual al valor absoluto de la intensidad del pico anódico, o si la diferencia entre el potencial al que tiene lugar la oxidación y el potencial al que tiene lugar la reducción es aproximadamente 0.059 V.

4.2.1. *Ácido vanílico*

La electro-oxidación del ácido vanílico (Imagen 4.1) sigue un mecanismo que implica solamente un paso con la transferencia de un electrón y de un protón.



Imagen 4.1: Mecanismo de electro-oxidación del ácido vanílico

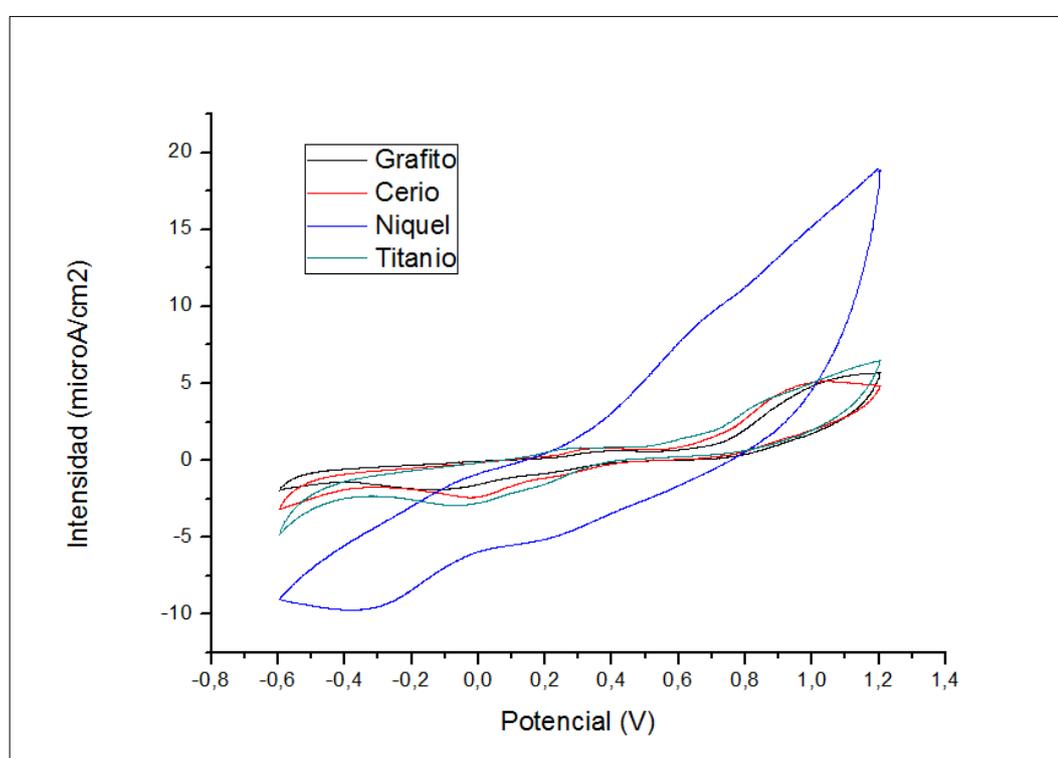


Figura 4.5: Voltamogramas en ácido vanílico para los distintos electrodos

El mecanismo de reacción mostrado en la Imagen 4.1 lógicamente tiene su correspondencia en el voltamograma de la Figura 4.5. La reacción directa (oxidación) se muestra como un pico en las líneas superiores de los voltamogramas y la reacción inversa (reducción) se observa en las líneas inferiores de cada voltamograma.

Como se aprecia en la Figura 4.5, cuando medimos ácido vanílico el voltamograma obtenido con los electrodos de pasta de carbono modificados con NP-NiO, es mucho más intenso que cuando se emplea cualquier otro tipo de electrodo de trabajo, confirmando la capacidad electrocatalítica obtenida en buffer fosfato.

Comparando los otros dos electrodos modificados con nanopartículas respecto al que solo contiene grafito, se confirma que las NP aumentan la intensidad de la señal obtenida, siendo el efecto de NP- TiO₂ mayor que el de NP-CeO₂.

Esto ocurre, como se explicó en el apartado 2.3, debido a que las NP-OM presentan una alta proporción de átomos en la superficie con valencias libres en comparación con el número total de átomos, un amplio ancho de banda y una alta proporción de su área respecto del volumen ocupado, lo que facilita la transferencia de electrones y el correspondiente aumento de la señal electroanalítica.

En la tabla siguiente (Tabla 4.2) se recoge el porcentaje en el que ha aumentado valor de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto a los electrodos no modificados (electrodo de pasta de grafito). Se asigna a la intensidad en los picos de oxidación y de reducción obtenida con los EPC sin modificar, el valor cero para tener un punto de referencia común sobre el que calcular el incremento en la corriente de los EPC modificados.

Con esto se pretende establecer una idea cuantitativa de la mejora en la intensidad de la señal electroanalítica que ofrecen estos electrodos modificados al detectar ácido vanílico.

Tabla 4.2: Ácido vanílico: Comparativa del aumento de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto de los EPC sin modificar

| | | Ácido vanílico | | |
|---------------------|-----------|--|---------------|-----------------------|
| | | Intensidad ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Potencial (V) | % Δ Intensidad |
| EPC | Oxidación | 5.0 | 1.05 | 0 |
| | Reducción | -2.3 | -0.10 | 0 |
| NP-CeO ₂ | Oxidación | 5.1 | 1.03 | 2 |
| | Reducción | -2.5 | 0.00 | 8 |
| NP-TiO ₂ | Oxidación | 5.2 | 1.00 | 4 |
| | Reducción | -2.7 | -0.05 | 15 |
| NP-NiO | Oxidación | 10.0 | 0.70 | 50 |
| | Reducción | -5.0 | 0.20 | 54 |

Aunque la mejora en la intensidad cuando se empleaban EPC modificados con NP-NiO ya era evidente en la Figura 4.5, los resultados recogidos en la Tabla 4.2, nos permiten afirmar que estas NPs aumentan hasta en un 54 % la señal electroanalítica medida. Las NP-TiO₂ aumentan la intensidad de la señal obtenida hasta un 15% y las NP-CeO₂ aumentan la intensidad de la señal obtenida hasta un 8%.

Con ayuda de la Tabla 4.2, podemos observar con mayor facilidad que la presencia de NPs ha modificado la posición de los picos de oxidación y reducción de los EPC sin modificar respecto a los modificados con NPs. Cuando se usan NPs se observa que tanto la oxidación como la reducción están ocurriendo a potenciales más bajos, lo que confirma el efecto catalítico ya mencionado.

Las intensidades no son iguales (en valor absoluto para la reducción) en los picos anódicos y catódicos y la diferencia entre los potenciales a los que se encuentran ambos picos no es 0.059 V, por lo que no se trata de una reacción reversible.

4.2.2. Ácido cafeico

La electro-oxidación del ácido cafeico (Imagen 4.2) sigue un mecanismo que implica solamente un paso con la transferencia de dos electrones y de dos protones en un disolvente aprótico.



Imagen 4.2: Mecanismo de electro-oxidación del ácido cafeico

Como se observa en la Imagen 4.2, cuando el ácido cafeico se reduce, perdiendo dos protones, se convierte en la orto-quinona.

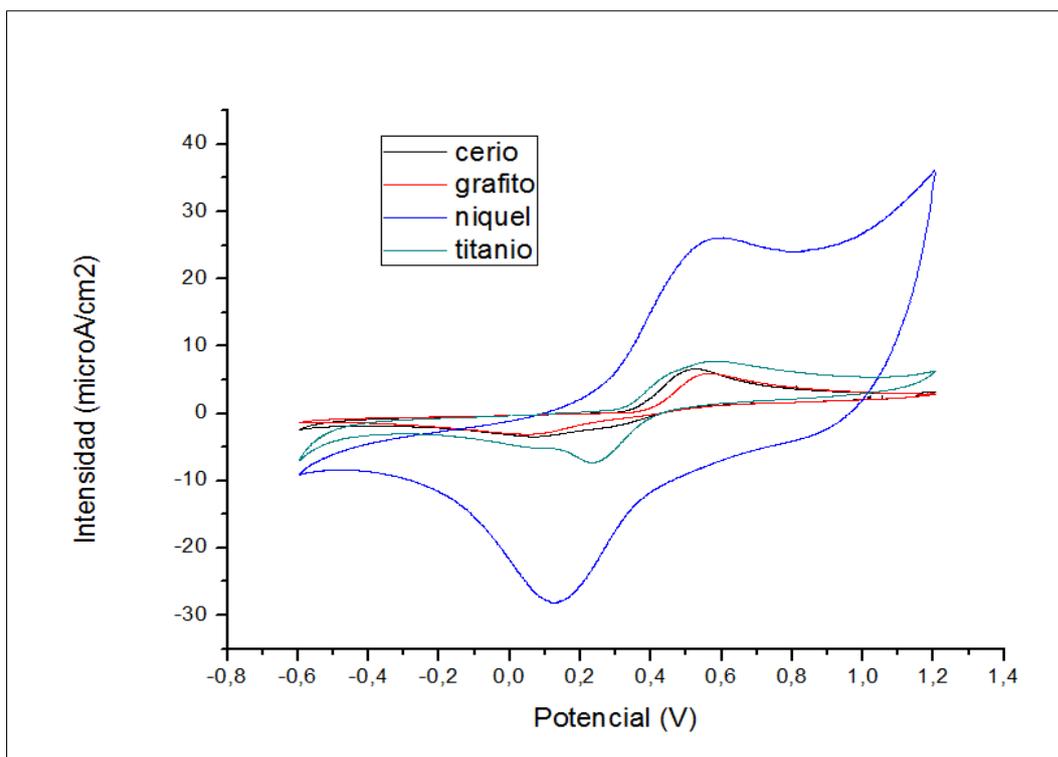


Figura 4.6: Voltamogramas en ácido cafeico para los distintos electrodos

En el estudio del ácido cafeico, el electrodo de trabajo que mayor intensidad nos ofrece en las señales obtenidas para la oxidación y la reducción, es el fabricado a partir de las NP-NiO.

Se confirma que las NPs aumentan la intensidad de la señal obtenida respecto de los EPC sin modificar, siendo el efecto de NP-TiO₂ mayor que el de NP-CeO₂, al igual que ocurría cuando el analito era ácido vanílico.

La tabla 4.3 recoge el porcentaje en el que ha aumentado el valor de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto a los electrodos no modificados (electrodo de pasta de grafito), del mismo modo que se realizó en el apartado anterior.

Tabla 4.3: Ácido cafeico: Comparativa del aumento de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto de los EPC sin modificar

| | | Ácido cafeico | | |
|---------------------|-----------|----------------------------------|---------------|----------------|
| | | Intensidad (µA/cm ²) | Potencial (V) | % Δ Intensidad |
| EPC | Oxidación | 5.0 | 0.59 | 0.0 |
| | Reducción | -3.4 | 0.06 | 0.0 |
| NP-CeO ₂ | Oxidación | 6.8 | 0.52 | 26.5 |
| | Reducción | -3.5 | 0.08 | 3.0 |
| NP-TiO ₂ | Oxidación | 7.5 | 0.58 | 33.3 |
| | Reducción | -7.5 | 0.23 | 54.7 |
| NP-NiO | Oxidación | 26 | 0.58 | 80.8 |
| | Reducción | 28 | 0.12 | 87.9 |

Aunque la mejora en la intensidad cuando se empleaban EPC modificados con NP-NiO ya fue observada en la Figura 4.6, los resultados recogidos en la Tabla 4.3, nos permiten cuantificar esta mejora. Las NP-NiO aumentan en la reducción hasta un 88 % la señal electroanalítica medida. Las NP-TiO₂ aumentan la intensidad de la señal obtenida hasta casi un 55%

en la reducción y las NP-CeO₂ hasta un 27 % en la oxidación, es decir, el efecto electrocatalítico es mayor para NP-TiO₂.

Observando la Tabla 4.3, podemos afirmar que los potenciales a los que tiene lugar la oxidación y la reducción del ácido cafeico son mayores (en valor absoluto para la reducción) cuando se emplean EPC sin modificar, confirmando nuevamente el efecto electrocatalítico de las NPs.

Las intensidades no son iguales (en valor absoluto para la reducción) en los picos anódicos y catódicos y la diferencia entre los potenciales a los que se encuentran ambos picos no es 0.059 V, por lo que no se trata de una reacción reversible cuando se emplean EPC y EPC-NP-CeO₂. En cambio podemos considerar que se trata de una reacción cuasireversible (ver Imagen 2.27) en el caso de NP-TiO₂ y NP-NiO, ya que la intensidad en el pico anódico y catódico es la misma.

4.2.3. Catecol

La electro-oxidación del catecol (Imagen 4.3) sigue un mecanismo que implica solamente un paso con la transferencia de dos electrones y de dos protones.

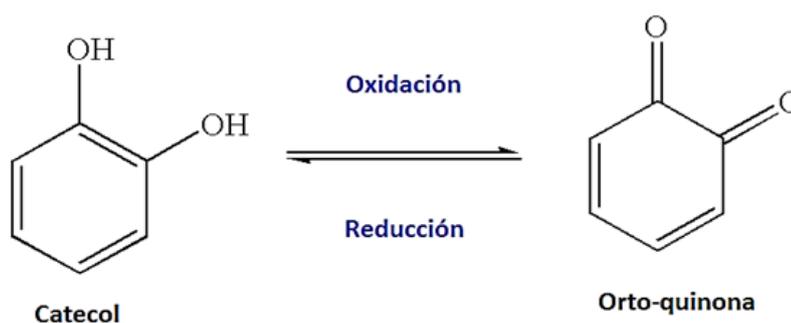


Imagen 4.3: Mecanismo de electro-oxidación del catecol

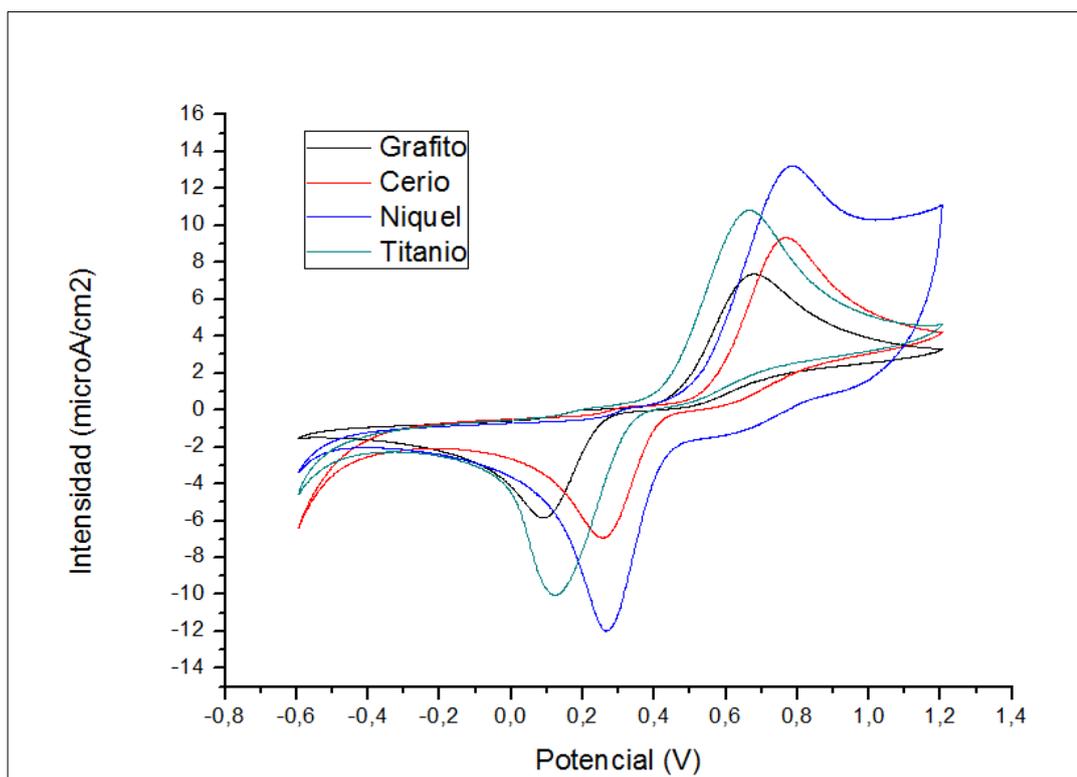


Figura 4.7: Voltamogramas en catecol para los distintos electrodos

Como se observa en la Figura 4.7, cuando medimos catecol el voltamograma obtenido con los electrodos de pasta de carbono modificados con NP-NiO, es nuevamente más intenso que cuando se emplean NP-TiO₂ o NP-CeO₂. El efecto electrocatalítico de las NPs resulta evidente al disminuirse el valor de los potenciales a los que tiene lugar la oxidación y la reducción del catecol.

El que ofrece una señal menos intensa es el de grafito, por lo que nuevamente se confirma el aumento de la actividad catalítica de las NP-OM.

La Tabla 4.4 recoge el porcentaje en el que ha aumentado el valor de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto a los electrodos no modificados.

Tabla 4.4: Catecol: Comparativa del aumento de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto de los EPC sin modificar

| | | Catecol | | |
|---------------------|-----------|--|---------------|-----------------------|
| | | Intensidad ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Potencial (V) | % Δ Intensidad |
| EPC | Oxidación | 7 | 0.7 | 0 |
| | Reducción | -6 | 0.1 | 0 |
| NP-CeO ₂ | Oxidación | 9 | 0.76 | 22.22 |
| | Reducción | -7 | 0.25 | 14.29 |
| NP-TiO ₂ | Oxidación | 11 | 0.68 | 36.36 |
| | Reducción | -10 | 0.12 | 40 |
| NP-NiO | Oxidación | 13 | 0.78 | 46.15 |
| | Reducción | -13 | 0.28 | 50 |

En la Tabla 4.4 observamos que las NP-NiO aumentan hasta en un 50 % la señal electroanalítica medida. Las NP-TiO₂ aumentan la intensidad de la señal obtenida hasta un 40 % y las NP-CeO₂ aumentan la intensidad de la señal obtenida hasta un 22 % en la oxidación. Sin embargo, esta vez las diferencias no son tan notables como cuando analizábamos ácido cafeico siendo el aumento máximo solo del 50%.

En función del valor de las intensidades en los picos anódicos y catódicos, podemos afirmar que se trata de una reacción irreversible cuando se emplean EPC y EPC-NP-CeO₂ y una reacción cuasireversible en el caso de NP-TiO₂ y NP-NiO, del mismo modo que ocurriría cuando el fenol analizado era el ácido cafeico.

4.2.4. Pirogalol

La electro-oxidación del pirogalol (Imagen 4.4) sigue un mecanismo de varios pasos en la transferencia de electrones y protones.

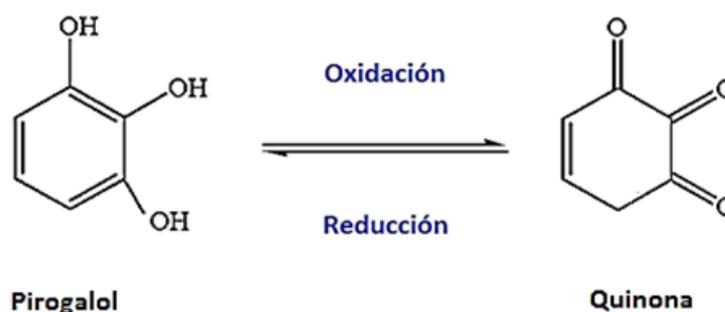


Imagen 4.4: Mecanismo de electro-oxidación del pirogalol

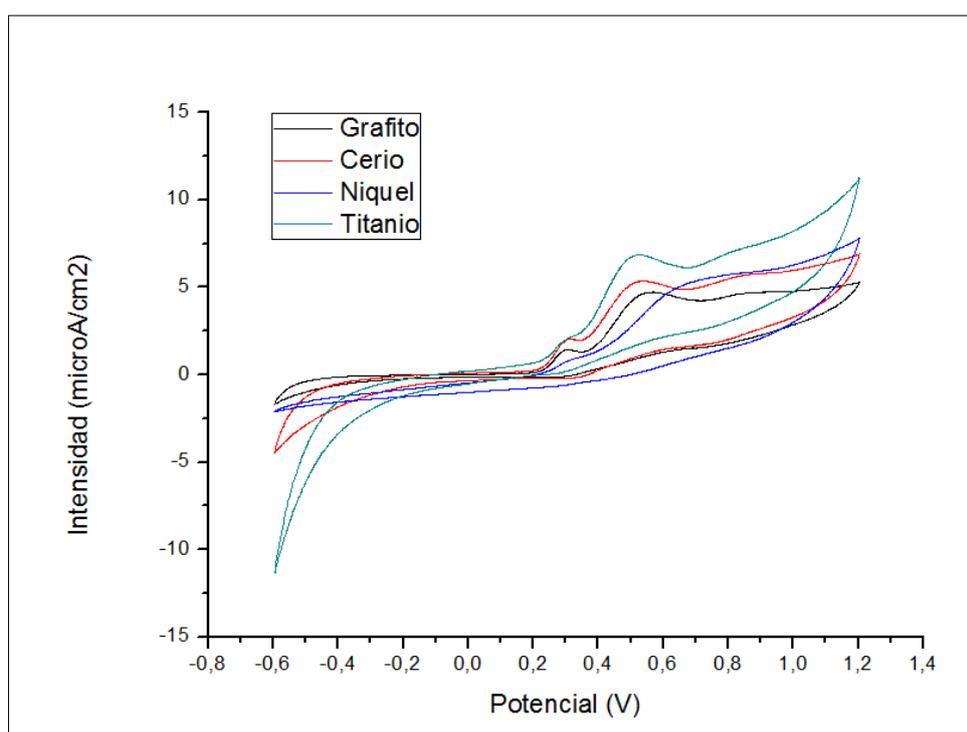


Figura 4.8: Voltamogramas en pirogalol para los distintos electrodos

Al analizar el pirogalol en sus múltiples oxidaciones, el mayor efecto electrocatalítico es el obtenido al emplear EPC modificados con NP-TiO₂, seguido de los EPC fabricados con NP-CeO₂. En este caso, el EPC modificado

con NP-NiO no ofrece una señal tan buena como en los casos anteriores donde fueron analizados otros antioxidantes.

La tabla 4.5 recoge el porcentaje en el que ha aumentado el valor de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto a los electrodos no modificados (electrodo de pasta de grafito).

Es evidente el aumento en la intensidad cuando se empleaban EPC modificados con NP-TiO₂ (Ver Figura 4.7), el cual se cuantificó en la Tabla 4.5:

Tabla 4.5: Pirogalol: Comparativa del aumento de la intensidad de corriente de los EPC modificados con NP-OM respecto de los EPC sin modificar

| Pirogalol | | | | |
|---------------------|-------------|---|---------------|-----------------------|
| | | Intensidad ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Potencial (V) | % Δ Intensidad |
| EPC | Oxidación 1 | 1.25 | 0.3 | 0 |
| | Oxidación 2 | 4.8 | 0.53 | 0 |
| | Oxidación 3 | 4.9 | 0.92 | 0 |
| NP-CeO ₂ | Oxidación 1 | 2 | 0.32 | 37.5 |
| | Oxidación 2 | 5 | 0.53 | 4 |
| | Oxidación 3 | 5.4 | 0.88 | 14.8 |
| NP-TiO ₂ | Oxidación 1 | 2.2 | 0.3 | 43.18 |
| | Oxidación 2 | 7 | 0.5 | 31.43 |
| | Oxidación 3 | 7.5 | 0.88 | 34.67 |
| NP-NiO | Oxidación 1 | 1.2 | 0.32 | -4 |
| | Oxidación 2 | 5 | 0.65 | 4 |
| | Oxidación 3 | 7 | 1.1 | 30 |

Los EPC modificados con NP-TiO₂ aumentan hasta en un 43 % la señal electroanalítica medida. Las NP-CeO₂ aumentan la intensidad de la señal obtenida hasta un 37 % y las de NP-NiO aumentan la intensidad de la señal

obtenida hasta un 4 % en la tercera oxidación. Pese a haber sido las NP-NiO las que más han aumentado la corriente en el caso del análisis del resto de antioxidantes, en el caso del pirogalol, se observa que no han funcionado como cabría esperar. Se confirma nuevamente el efecto electrocatalítico de las NPs, al modificar los potenciales a los que aparecen las oxidaciones a valores más próximos.

En resumen, las NPs están ofreciendo distintos comportamientos siendo el mayor aumento de intensidad en el caso del uso de EPC modificados con NiO al analizar ácido cafeico. Cabe destacar que para el análisis de pirogalol, las NPs que mejor funcionan al ofrecer picos más intensos son las de TiO₂. El efecto electrocatalítico de todas las NPs queda patente en cada uno de los ensayos realizados en esta sección, al verse modificados los potenciales de los picos anódicos y catódicos hacia potenciales de menor valor.

4.3. Límites de detección

Una vez conocido el comportamiento de los electrodos en los distintos fenoles, se procedió a determinar el límite de detección de cada tipo de sensor en los distintos antioxidantes: ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogalol. Cuanto menor sea el límite de detección menor será la cantidad de analito susceptible a ser detectada por el electrodo, con lo que se aumentará la sensibilidad del electrodo.

Se pretende comprobar si los electrodos de pasta de carbono modificados con NP-OM son más sensibles que los EPC que no han sido modificados, hasta el momento se conoce que aumentan la señal electroanalítica y que tienen efecto electrocatalítico.

Para ello, se realizaron análisis en disoluciones de buffer fosfato a las que se añadieron adiciones sucesivas de cantidades crecientes de la disolución del antioxidante de interés para estudiar el aumento en la intensidad de los picos anódicos y catódicos, según fue detallado en la Sección 3.7.3.

4.3.1. Ácido vanílico

Los voltamogramas que se observas a continuación (Figura 4.9-4.12) son los obtenido tras seguir el procedimiento indicado en el apartado previo (Apartado 4.7.3), empleando cada tipo de electrodo y disolución de ácido vanílico. Además, en cada figura se recogen las corrientes máximas y potenciales en los que ocurre la oxidación y la reducción de los antioxidantes.

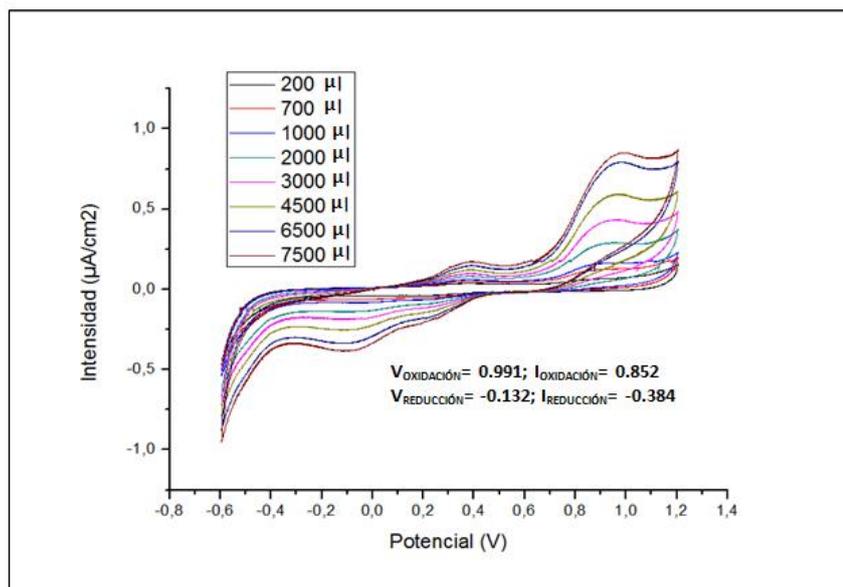


Figura 4.9: LD: Voltamogramas EPC sin modificar en ácido vanílico

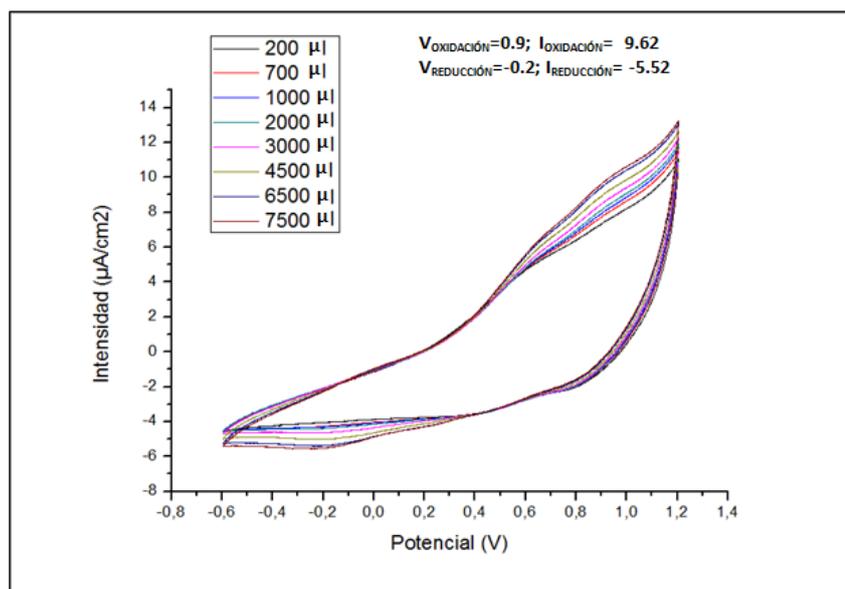


Figura 4.10: LD: Voltamogramas EPC modificados NP-NiO en ácido vanílico

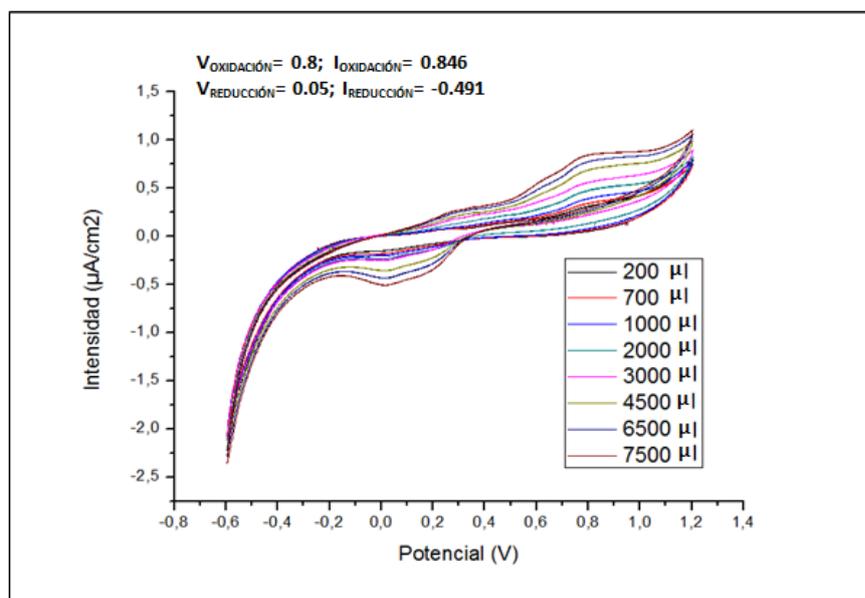


Figura 4.11: LD: Voltamogramas EPC modificados NP-TiO₂ en ácido vanílico

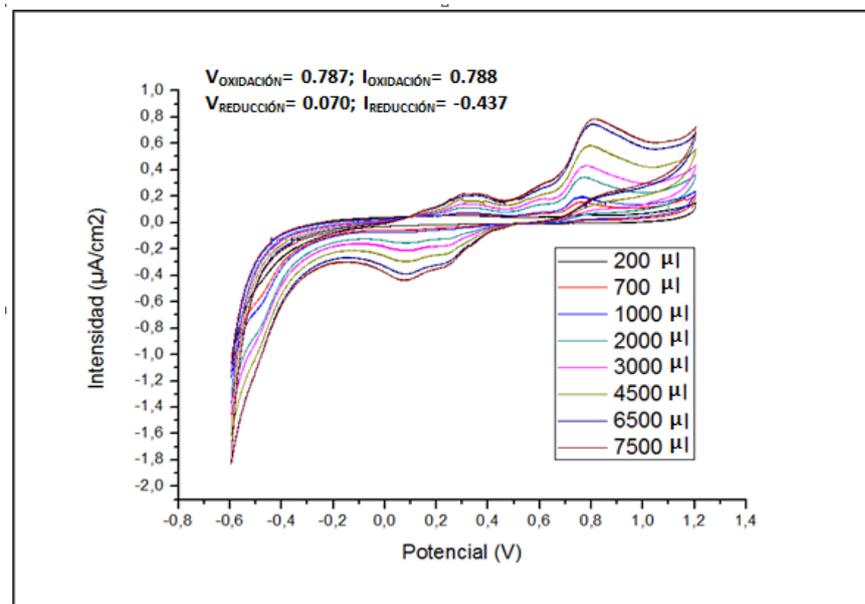


Figura 4.12: LD: Voltamogramas EPC modificados NP-CeO₂ en ácido vanílico

A continuación, en la Tabla 4.6, se recoge el valor del LD para cada tipo de electrodo en ácido vanílico. También aparece el valor del coeficiente de correlación R^2 obtenido tras realizar el ajuste lineal de la concentración frente a la intensidad (Imagen 3.41-3.42) para demostrar que no se ha cometido ningún error en el ajuste (Anexo 1: Gráficos 1.1)

Tabla 4.6: LD del ácido vanílico empleando EPC modificados con NP-OM empleando EPC modificados con NP-OM y sin modificar

| LIMITE DETECCIÓN (mol/L) | | | | |
|--------------------------|------------------|--|------------------|--|
| | <u>OXIDACIÓN</u> | <u>R²_{oxidación}</u> | <u>REDUCCIÓN</u> | <u>R²_{reducción}</u> |
| EPC | 8,21-E-05 | 0.9923 | 4,64-E-05 | 0.9973 |
| EPC-NiO | 2,28-E-05 | 0.9929 | 1,45-E-05 | 0.9912 |
| EPC-TiO ₂ | 5,03-E-06 | 0.9923 | 5,56-E-06 | 0.9933 |
| EPC-CeO ₂ | 2,87-E-07 | 0.9929 | 1,04-E-06 | 0.9919 |

Comparando en la curva de oxidación los límites de detección entre los EPC sin modificar y los modificados, se observa una mejora de un orden de magnitud en el empleo de NP-TiO₂ y dos órdenes de magnitud en el uso de NP-Ce₂O. En la curva de reducción, las NP citadas anteriormente mejoran un orden de magnitud los LD. Sin embargo, a pesar del aumento en la intensidad no existe mejora en el LD cuando se utilizan NP-NiO, ya que los límites de detección presentan el mismo orden de magnitud que los EPC sin modificar.

4.3.2. Ácido cafeico

El proceso para la determinación del ácido cafeico es análogo al explicado en la Sección 4.3.1 para el ácido vanílico. Por ello, se presentan los voltamogramas obtenidos (4.13-4.16) y los valores para los distintos límites de detección (Tabla 4.7).

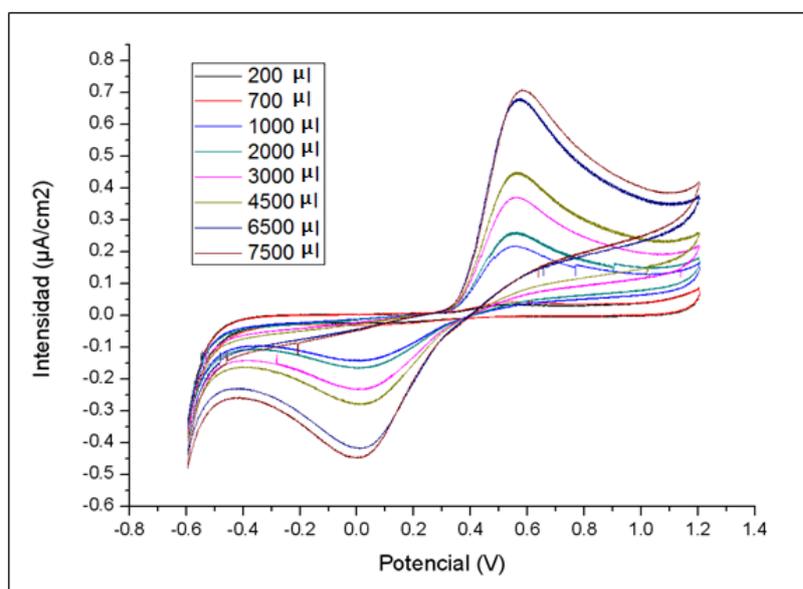


Figura 4.13: LD: Voltamogramas EPC sin modificar en ácido cafeico

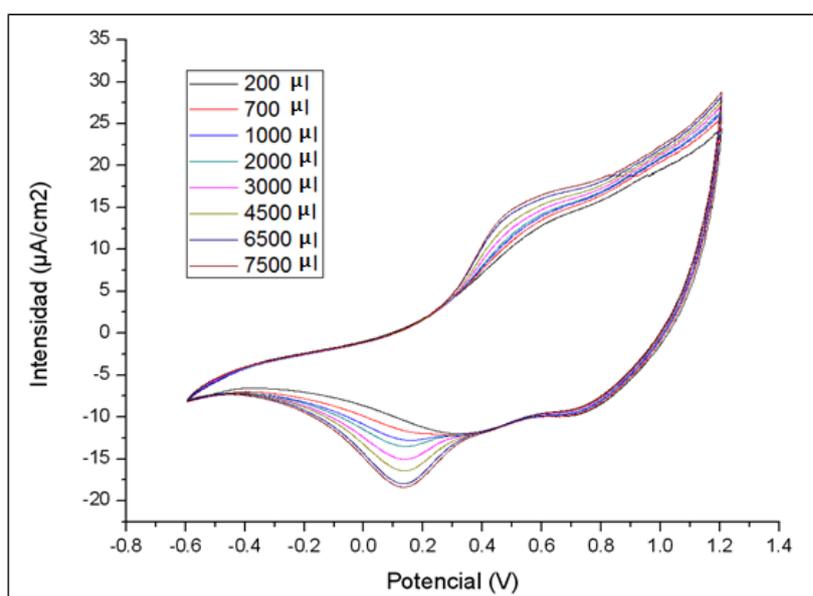


Figura 4.14: LD: Voltamogramas EPC modificados NP- NiO en ácido cafeico

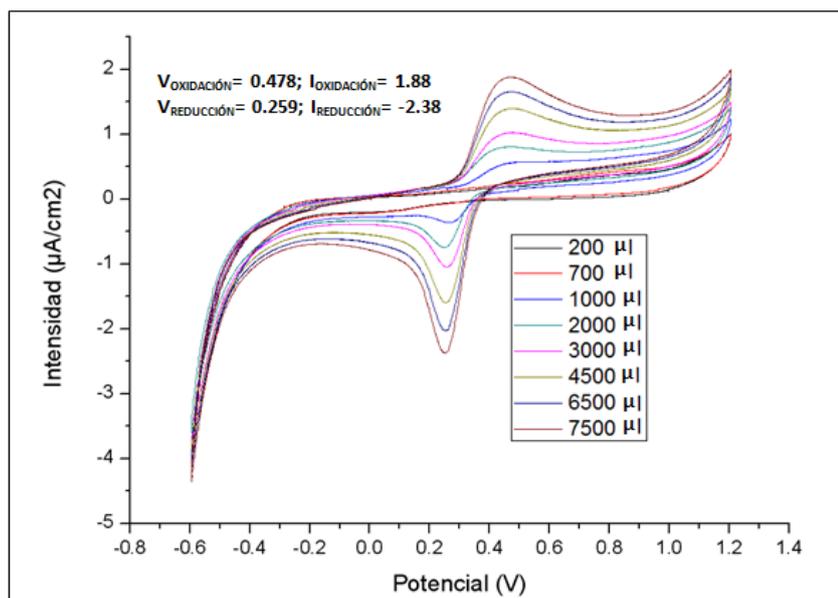


Figura 4.15: LD: Voltamogramas EPC modificados NP- TiO₂ en ácido cafeico

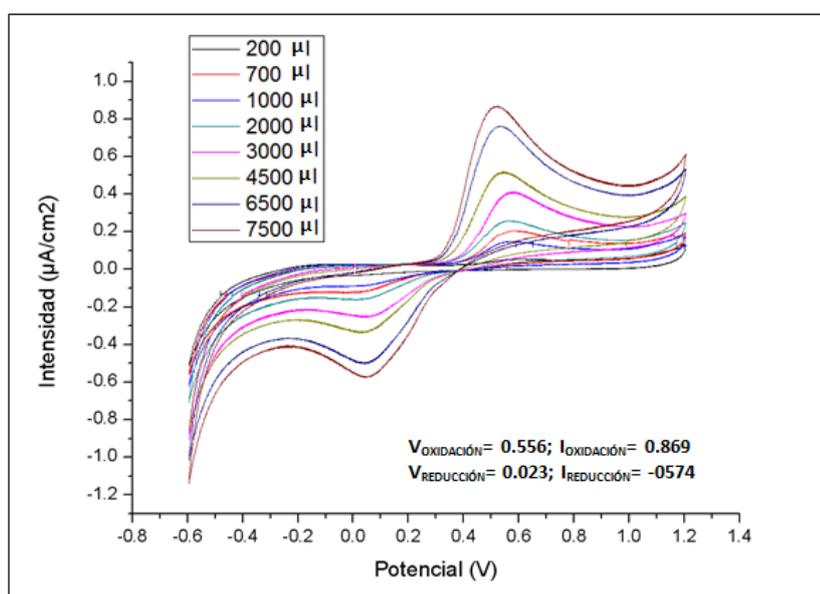


Figura 4.16: LD: Voltamogramas EPC modificados NP-CeO₂ en ácido cafeico

La Tabla 4.7, se recoge el valor del LD para cada tipo de electrodo en ácido cafeico. También aparece el valor del coeficiente de correlación R^2 (Anexo 1: Gráficos 1.2).

Tabla 4.7: LD del ácido cafeico empleando EPC modificados con NP-OM y sin modificar

| LIMITE DETECCIÓN (mol/L) | | | | |
|--------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| | <u>OXIDACIÓN</u> | <u>$R^2_{oxidación}$</u> | <u>REDUCCIÓN</u> | <u>$R^2_{reducción}$</u> |
| EPC | 3,64-E-05 | 0.9908 | 2,92-E-07 | 0.9908 |
| EPC-NiO | 2,65-1E-05 | 0.9924 | 1,03-E-05 | 0.9911 |
| EPC-TiO ₂ | 2,82-E-07 | 0.9918 | 2,03-E-07 | 0.9915 |
| EPC-CeO ₂ | 9,75-E-07 | 0.9964 | 1,65-E-06 | 0.9982 |

Comparando los límites de detección entre los EPC sin modificar y los modificados, se observa una mejora en el LD de oxidación de dos órdenes de magnitud en el empleo de NP-TiO₂ y en el LD de la oxidación de NP-Ce₂O.

Sin embargo, no existe mejora en el LD ni en la curva de oxidación ni en la de reducción en el empleo de NP-NiO. La sensibilidad de NP-NiO incluso disminuye en el caso del cálculo del LD para la curva de reducción.

Para el LD de la reducción, se observa que los EPC sin modificar son tan sensibles como los modificados con NP-TiO₂.

El LD ofrecido por las NP-CeO₂ es un orden de magnitud menor que el ofrecido por los EPC sin modificar. Al igual que ocurría en la curva de reducción en la detección del ácido vanílico, las NP-NiO no están ofreciendo ninguna mejora en la sensibilidad del electrodo. Sin embargo, esto no excluye el hecho de que los LD obtenidos sean muy bajos y, por tanto, los electrodos sean muy sensibles y útiles.

4.3.3. Catecol

El proceso para la determinación del catecol es análogo al explicado en la Sección 4.3.1, por lo que exclusivamente se presentan los

voltamogramas obtenidos (4.17-4.20). Los valores para los distintos límites de detección, así como el valor del coeficiente de correlación R^2 aparecen recogidos en la Tabla 4.8. Las gráficas para la determinación de la pendiente son las correspondientes al ANEXO 1: Gráficos 1.3.

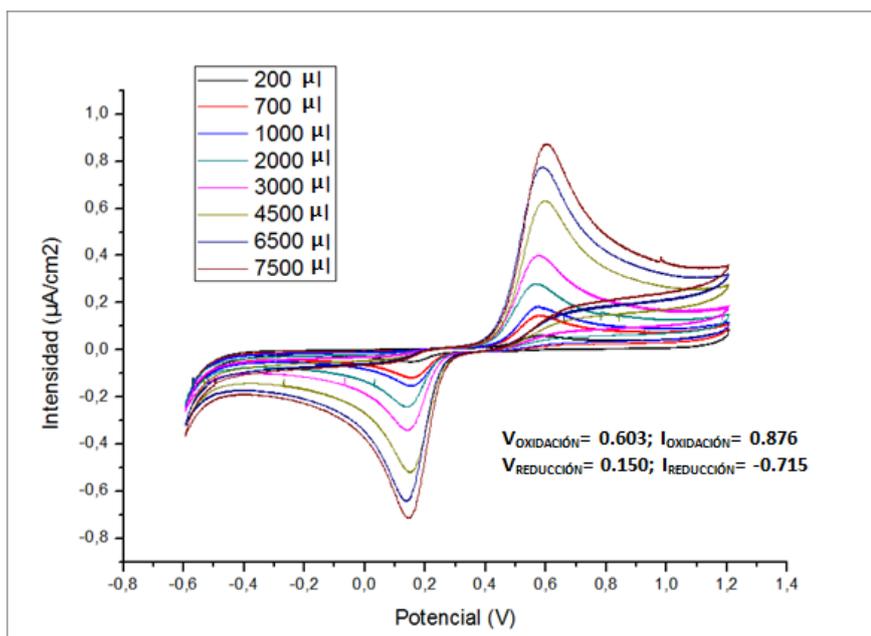


Figura 4.17: LD: Voltamogramas EPC sin modificar en catecol

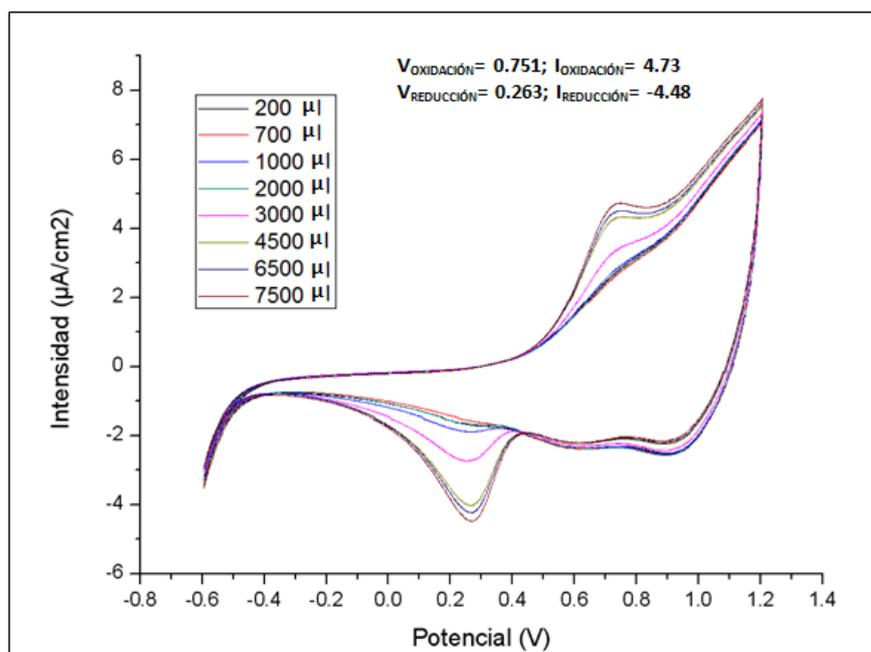


Figura 4.18: LD: Voltamogramas EPC modificados NP- NiO en catecol

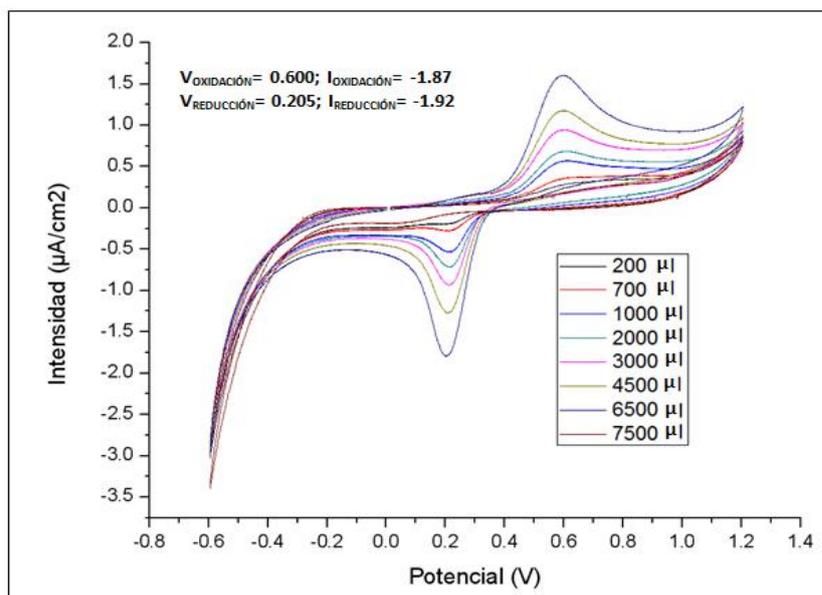


Figura 4.19: LD: Voltamogramas EPC modificados NP- TiO₂ en catecol

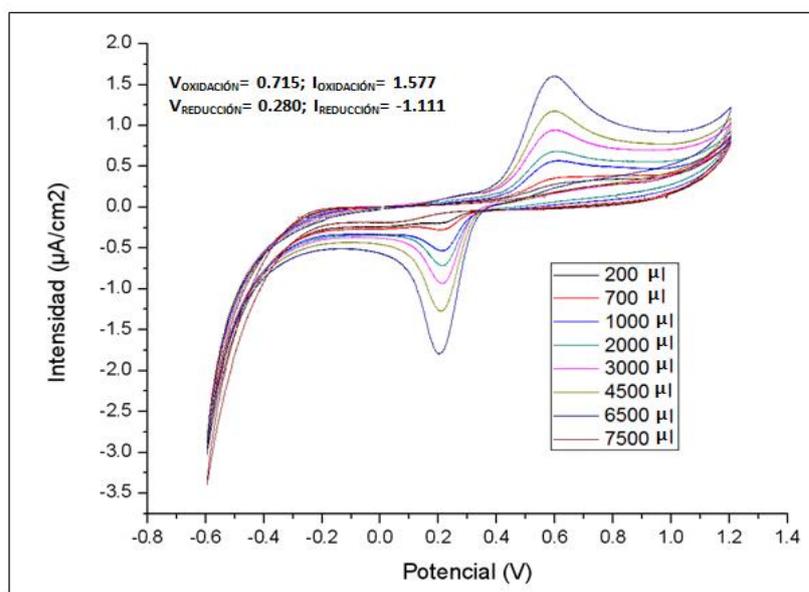


Figura 4.20: LD: Voltamogramas EPC modificados NP-CeO₂ en catecol

Tabla 4.8: LD del catecol empleando EPC modificados con NP-OM y sin modificar

| LIMITE DETECCIÓN (mol/L) | | | | |
|--------------------------|------------------|--|------------------|--|
| | <u>OXIDACIÓN</u> | <u>R²_{oxidación}</u> | <u>REDUCCIÓN</u> | <u>R²_{reducción}</u> |
| EPC | 1,09·E-07 | 0.9907 | 1,90·E-08 | 0.9900 |
| EPC-NiO | 4,40·E-06 | 0.9925 | 3,65·E-06 | 0.9948 |
| EPC-TiO ₂ | 2,32·E-07 | 0.9927 | 2,07·E-07 | 0.9912 |
| EPC-CeO ₂ | 1,92·E-07 | 0.9902 | 4,10·E-08 | 0.9946 |

Comparando los límites de detección entre los EPC sin modificar y los modificados no se observa una mejora apreciable. Los resultados en el LD de la curva de oxidación de los electrodos modificados con NP-OM son del mismo orden de magnitud que los EPC sin modificar, excepto para el caso de NP-NiO, que es menor.

Al igual que ocurría en los dos antioxidantes anteriores analizados, las NP-NiO no están ofreciendo ninguna mejora en la sensibilidad del electrodo, incluso tanto para la curva de reducción como para la de oxidación se están obteniendo resultados menores que con el empleo de EPC sin modificar.

Los resultados en el LD de la curva de reducción de los electrodos modificados con NP-CeO₂ son del mismo orden de magnitud que los EPC sin modificar. En el caso de NP-TiO₂ el LD en la reducción es un orden de magnitud mayor.

4.3.4. Pirogalol

El proceso para la determinación del catecol es análogo al explicado en la Sección 4.3.1, por lo que exclusivamente se presentan los voltamogramas obtenidos (4.21-4.24). Los valores para los distintos límites de detección, así como el valor del coeficiente de correlación R^2 aparecen recogidos en la Tabla 4.9 y las gráficas de las rectas en el Anexo 1: Gráficas 1.4.

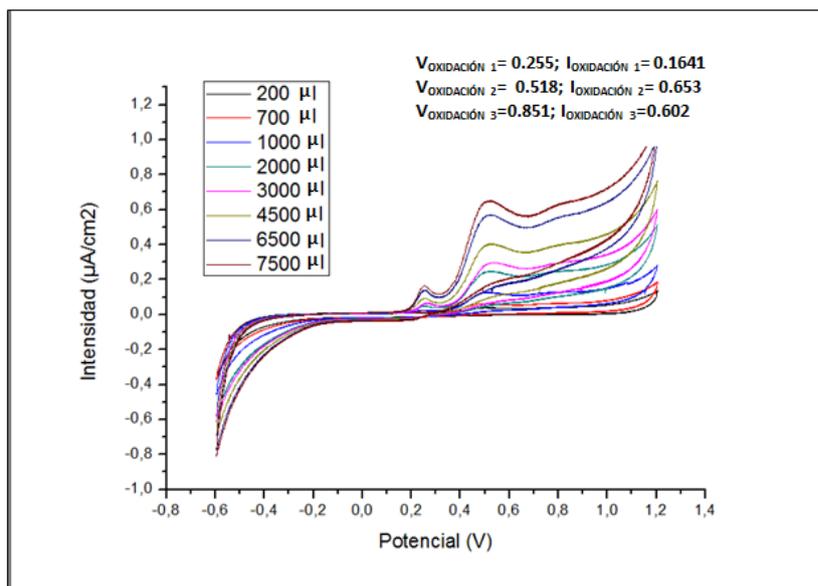


Figura 4.21: LD: Voltamogramas EPC sin modificar en pirogalol

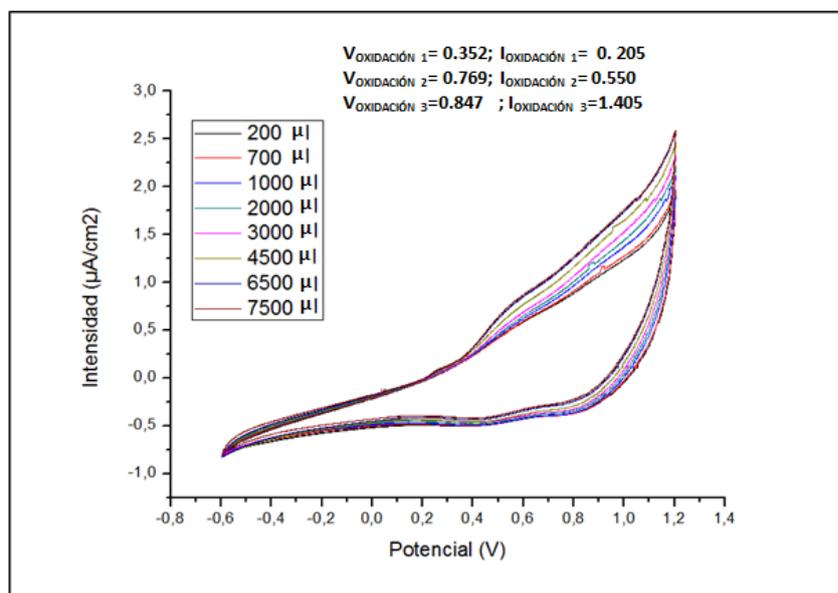


Figura 4.22: LD: Voltamogramas EPC modificados NP- NiO en pirogalol

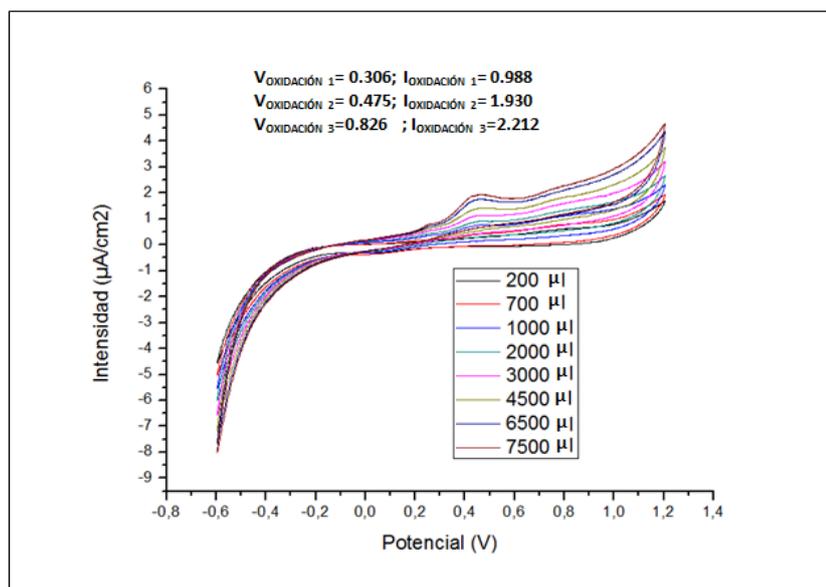


Figura 4.23: LD: Voltamogramas EPC modificados NP- TiO_2 en pirogalol

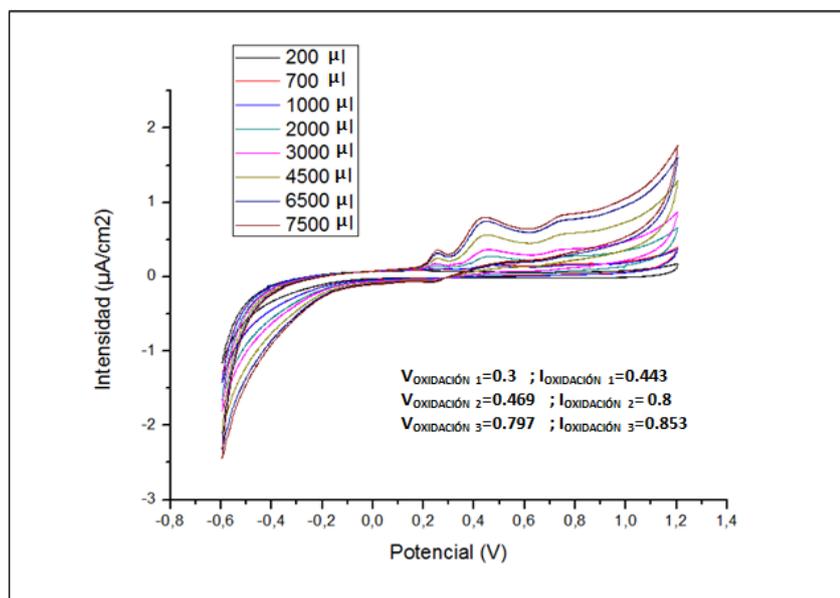


Figura 4.24: LD: Voltamogramas EPC modificados NP- CeO_2 en pirogalol

Tabla 4.9: LD del pirogalol empleando EPC modificados con NP-OM y sin modificar

| LIMITE DETECCIÓN (mol/L) | | | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| | <u>OX. 1</u> | <u>R²_{ox. 1}</u> | <u>OX. 2</u> | <u>R²_{ox. 2}</u> | <u>OX. 3</u> | <u>R²_{ox. 3}</u> |
| EPC | 2,35-E-06 | 0.9956 | 1,41-E-06 | 0.9941 | 1,59-E-06 | 0.9950 |
| EPC-NiO | 5,15-E-06 | 0.9969 | 4,79-E-06 | 0.9933 | 4,90-E-06 | 0.9921 |
| EPC-TiO ₂ | 4,72-E-06 | 0.9928 | 3,20-E-06 | 0.9939 | 3,88-E-06 | 0.9917 |
| EPC-CeO ₂ | 6,29-E-07 | 0.9903 | 2,98-E-07 | 0.9913 | 5,41-E-07 | 0.9933 |

Comparando los límites de detección en la curva de oxidación y de reducción entre los EPC sin modificar y los modificados, se observa una mejora en el LD de oxidación de un orden de magnitud en el empleo de NP-Ce₂O. No existe mejora para el resto de las nanopartículas de óxidos metálicos empleadas respecto de los EPC sin modificar, el LD mantiene el mismo orden de magnitud para el resto de los casos.

En resumen, observamos que todos los LD tanto para los EPC modificados con NPs como los que no están modificados son muy bajos, con lo que la sensibilidad es muy buena.

No se observa una tendencia clara en la mejora, ya que en algunos casos las NPs aumentan el LD y en otros no. En cualquier caso, la detección de antioxidantes empleando sensores de pasta de carbono resulta excelente y pese a que las NPs no ofrezcan una mejora significativa en el LD, sí que lo hacen en la intensidad de la señal analítica obtenida y en el proceso de catálisis de las reacciones redox que tienen lugar.

4.4. Lengua electrónica

Disponemos de una red de sensores voltamétricos constituida por EPC, EPC-TiO₂, EPC-NiO y EPC-CeO₂ que han sido ensayados mediante voltametría cíclica en disoluciones (10⁻³M) de distintos tipos de antioxidantes: ácido vanílico, ácido cafeico, catecol y pirogalol. Se ha realizado el análisis de componentes principales, PCA, el cual ha sido descrito en la Sección 3.7.4, de manera independiente para la curva de oxidación, la curva de reducción y el voltamograma completo.

El objetivo de realizar la PCA para la curva de oxidación, la de reducción y el voltamograma completo es ver cuánta información se recoge en cada caso para conocer con que caso se obtiene mayor discriminación y así determinar la mejor opción para trabajos futuros.

Los distintos tipos de antioxidantes se observan en las gráficas siguientes con distintos números, la asignación es la siguiente:

- 1→ Catecol (difenol)
- 2→ Pirogalol (trifenol)
- 3→ Ácido vanílico (monofenol)
- 4→ Ácido cafeico (difenol)

4.4.1. PCA aplicada al ciclo de reducción

La Figura 4.25 ilustra el gráfico de scores de los resultados obtenidos de la PCA aplicada al ciclo de reducción (PC1 frente a PC2 frente a PC3). La primera componente *PC1* representa el 66,37 % de la variación de la señal electroquímica, la segunda componente *PC2* aporta el 20,64 % de la variación y la *PC3* el 10,85 %. De este modo, entre la primera, segunda y tercera componente principal explican el 97,86 % de la variación total entre los distintos antioxidantes.

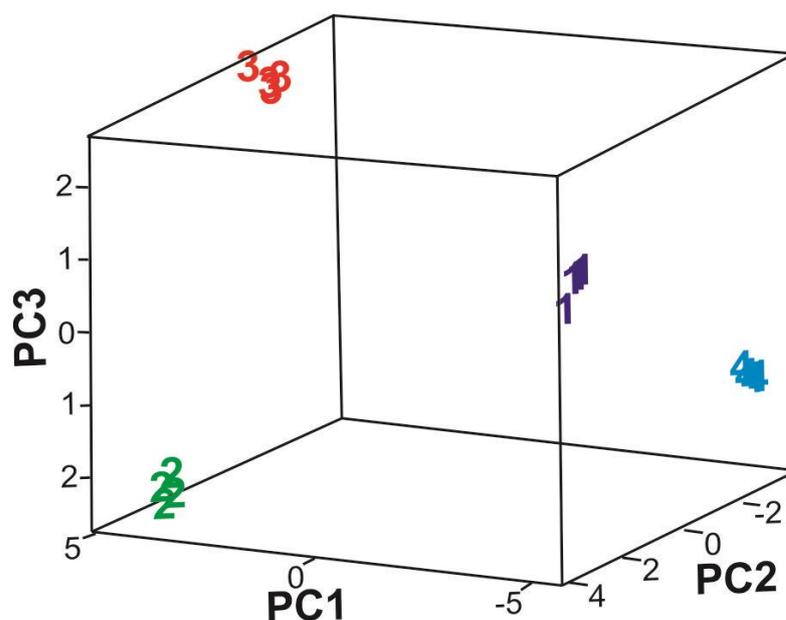


Figura 4.25: PCA aplicada a la curva de reducción, 3D

Como se aprecia en la Figura 4.25 los antioxidantes estudiados con la red de sensores aparecen claramente discriminados en función del número de grupos hidroxilos presentes en su estructura.

Se puede observar como los antioxidantes 1 y 4 están más próximos entre sí, esto es debido a que ambos son difenoles (ácido cafeico y catecol). La reproducibilidad de los sensores es bastante alta, destacando la obtenida en el caso del ácido cafeico (4).

Los resultados para la discriminación de los antioxidantes con sensores también se muestran en dos dimensiones (2D), porque a pesar de que la gráfica muestra menos información la representación en 3D puede dar lugar a mayor confusión en la posición relativa de los clusters. En la gráfica izquierda de la Figura 4.26 se representa en el eje de abscisas la PC1 y en el de ordenadas la PC2, siendo ambas variables las que más varianza presentan, por lo que recogen más información que la gráfica de la derecha (Figura 4.26), donde se representa la PC1 y la PC3, ya que la información aportada por PC3 es menor que la aportada por PC2.

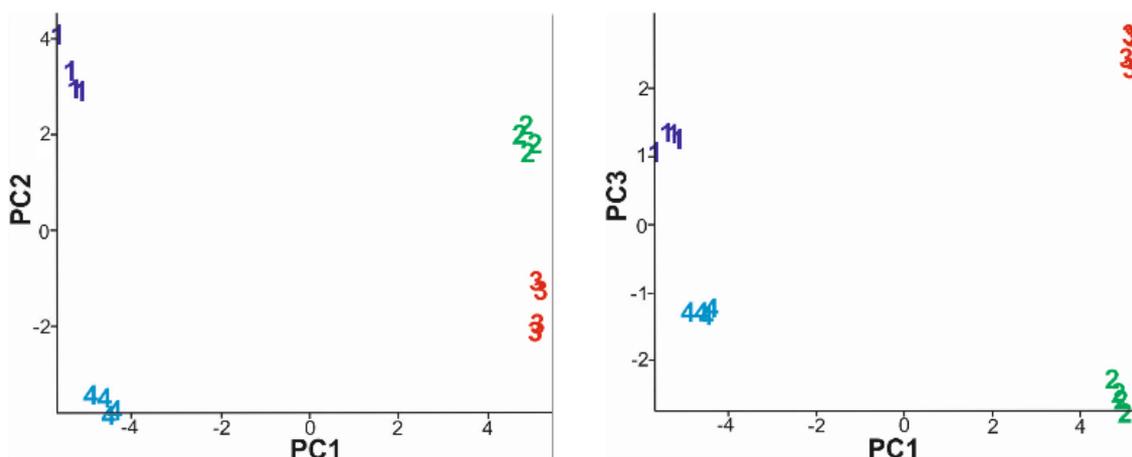


Figura 4.26: PCA aplicada a la curva de reducción, 2D

Tenemos dos antioxidantes que son difenoles, el catecol (1) y el ácido cafeico (4) se asemejan en que ambos se encuentran en la parte negativa de la *PC1*. Podemos diferenciarlos porque el catecol se encuentra en la parte positiva de la *PC2* y de la *PC3*, al contrario que el ácido cafeico que se encuentra en la parte negativa de la *PC2* y *PC3*.

El pirogalol (2) es un trifenol y se localiza en la parte positiva de *PC1* y *PC2*, y en la negativa de *PC3*. El ácido vanílico (3) es un monofenol y se localiza en la parte positiva de la *PC1* y *PC3*, y en la negativa de *PC2*.

Se observa que cada antioxidante queda localizado dentro de un cuadrante, resultando casi completamente diferenciables, la información contenida en 3D es del 97,86 %.

4.4.2. PCA oxidación

La Figura 4.27 ilustra el gráfico de scores de los resultados obtenidos de la PCA aplicada al ciclo de oxidación. La primera componente *PC1* representa el 40,61 % de la variación de la señal electroquímica, la segunda componente *PC2* aporta el 39,23 % de la variación y la *PC3* el 19,40 %. De este modo, entre la primera, segunda y tercera componente principal explican el 99,23% de la variación total entre los distintos antioxidantes.

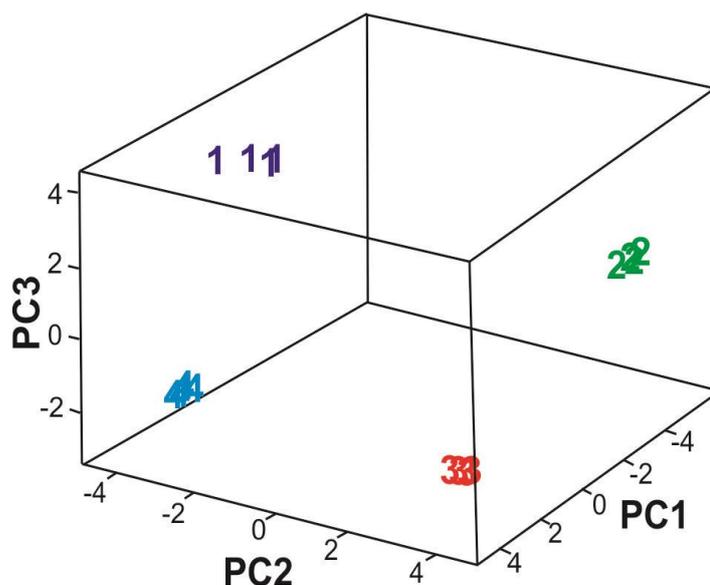


Figura 4.27: PCA aplicada a la curva de oxidación, 3D

En la Figura 4.27, podemos apreciar como nuevamente los antioxidantes estudiados con la red de sensores se discriminan en función del número de fenoles. Cabe destacar que la reproducibilidad de los sensores es bastante alta, como puede observarse en el caso 3 y 4.

La Figura 4.28 muestra los resultados para la discriminación de los antioxidantes en dos dimensiones, porque pese a contener menos información, permite una buena diferenciación entre los clusters.

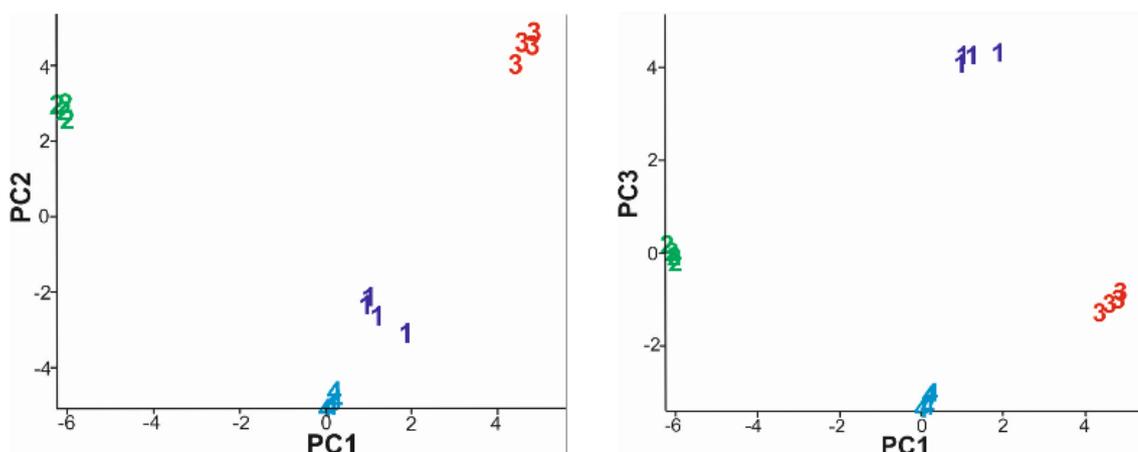


Figura 4.28: PCA aplicada a la curva de reducción, 2D

Los difenoles, el catecol (1) y el ácido cafeico (4), se asemejan en que ambos se encuentran en la parte positiva de la *PC1* y en la negativa de la *PC2*. Se pueden diferenciar porque el catecol se encuentra en la parte positiva de la de la *PC3*, al contrario que el ácido cafeico que se encuentra en la parte negativa de la *PC3*.

El pírogalol (2) es un trifenol y se localiza en la parte negativa de *PC1* y en la positiva de *PC2*, y con respecto a *PC3* se encuentra muy próximo del cero de esta componente. El ácido vanílico (3) es un monofenol y se localiza en la parte positiva de la *PC1* y *PC2*, y en la negativa de *PC3*.

En este caso no se observa que cada antioxidante esté localizado dentro de un cuadrante, pero la información contenida en 3D es del 99,23 %, este es un valor aun mayor que para el caso de la reducción por lo que la información contenida y representada en este caso es más fiable.

4.4.3 PCA voltamograma completo

En esta última sección se recoge la Figura 4.29, la cual ilustra el gráfico de scores de los resultados obtenidos de la PCA aplicada al voltamograma completo.

La primera componente *PC1* representa el 61,31% de la variación de la señal electroquímica, la segunda componente *PC2* aporta el 20,61 % de la variación y la *PC3* el 17,02 %.

De este modo, entre la primera, segunda y tercera componente principal explican el 98,94 % de la variación total entre los distintos antioxidantes.

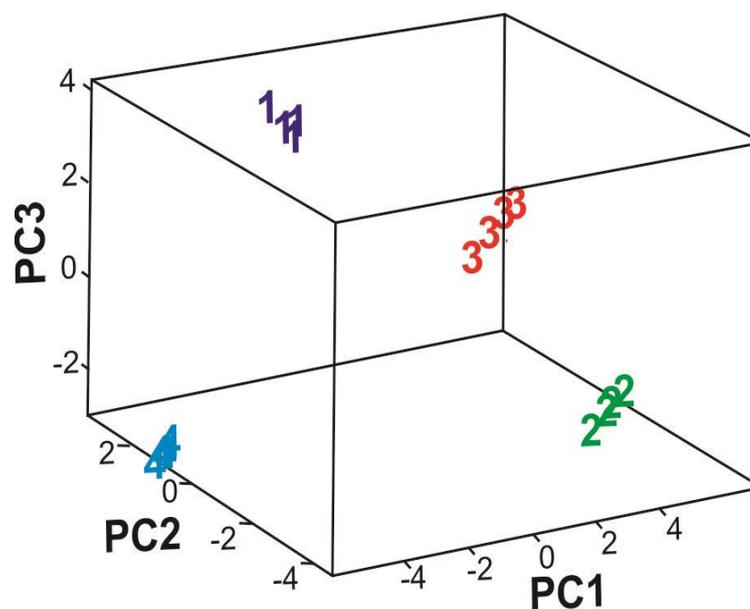


Figura 4.29: PCA aplicada al voltamograma completo, 3D

Nuevamente en la Figura 4.29, podemos percibir como los antioxidantes se discriminan en función del número de grupos hidroxilo presentes en la estructura.

La Figura 4.30 muestra los resultados para la discriminación de los antioxidantes en dos dimensiones.

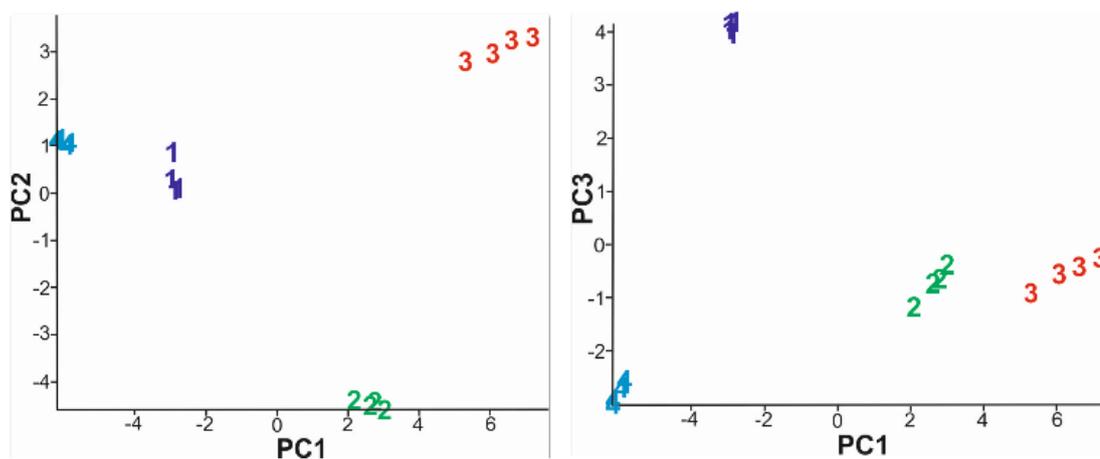


Figura 4.30: PCA aplicada al voltamograma completo, 2D

El catecol (1) y el ácido cafeico (4) son difenoles y se asemejan en que ambos se encuentran en la parte negativa de la *PC1* y en la positiva de la *PC2*. Podemos diferenciarlos porque el catecol se encuentra en la parte positiva de la de la *PC3*, al contrario que el ácido cafeico que se encuentra en la parte negativa de la *PC3*.

El pirogalol (2) es un trifenol y se localiza en la parte positiva de la *PC1* y en la negativa de la *PC2* y *PC3*. El ácido vanílico (3) es un monofenol y se localiza en la parte negativa de la *PC1* y *PC3*, y en la positiva de *PC2*.

Entre los tres análisis de componentes principales realizados, podemos concluir que el que más cantidad de información contiene es el gráfico 3D obtenido para la oxidación, que representa el 99,23 % de la variabilidad contenida en los datos. Sin embargo, el de reducción contiene el 97,86 % de la información y el voltamograma completo el 98,94 %.

Dado que la diferencia no es significativamente grande, en trabajos futuros se podrá usar indistintamente cualquiera de las tres opciones: curva de reducción, curva de oxidación o voltamograma completo, garantizando que existirá discriminación entre los distintos antioxidantes en cualquiera de los casos.

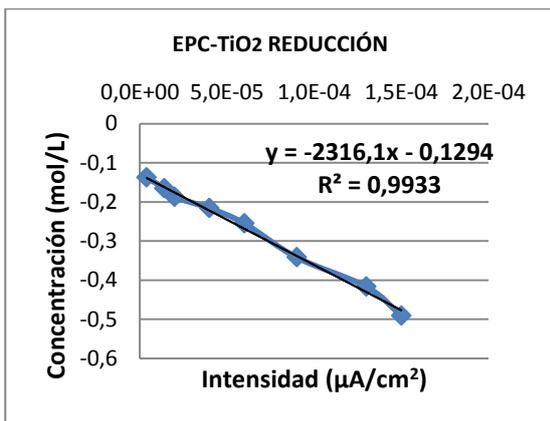
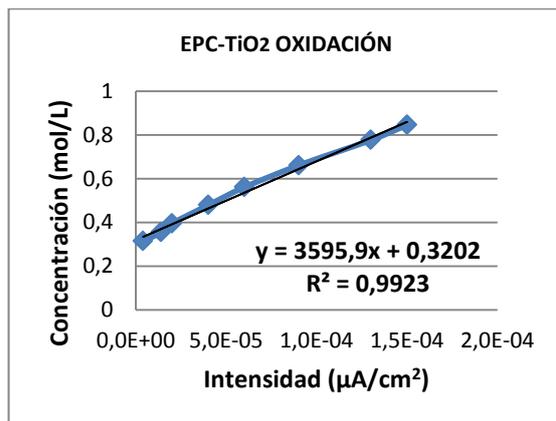
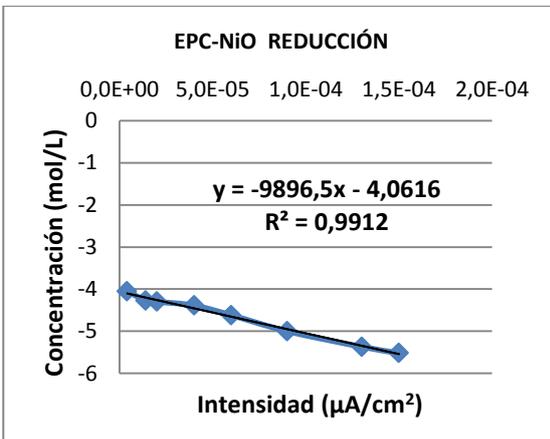
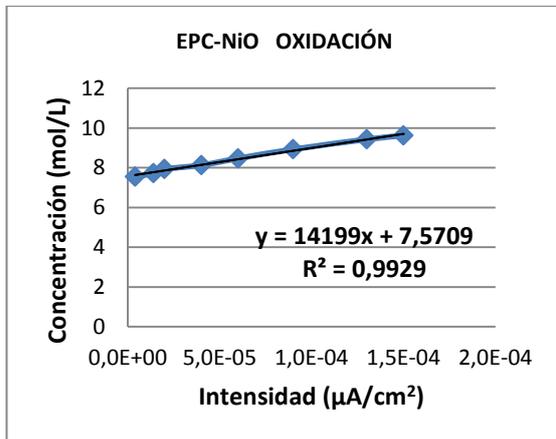
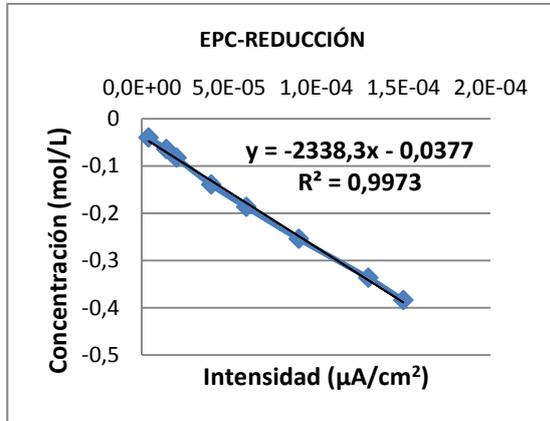
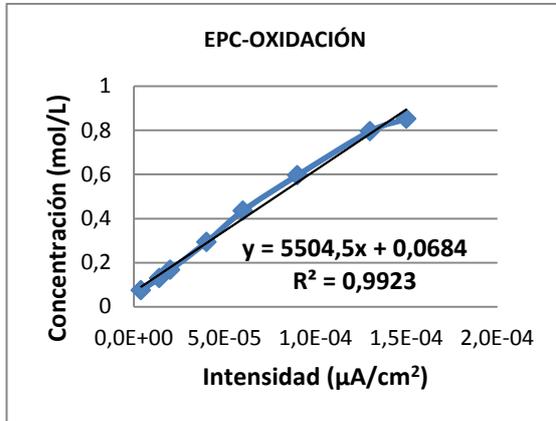
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

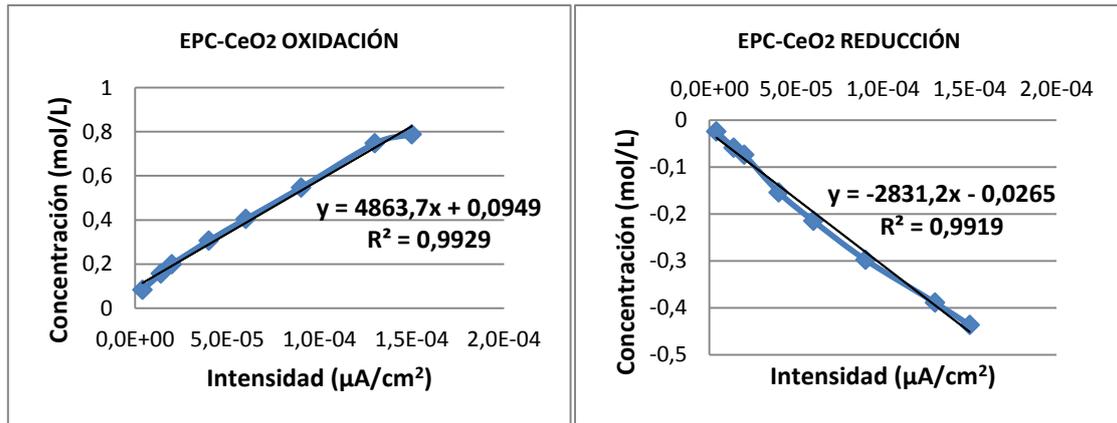
Las conclusiones obtenidas a lo largo de este trabajo de investigación, pueden resumirse en los puntos siguientes:

- ✓ Los electrodos modificados con nanopartículas de óxidos metálicos incrementan la señal eléctrica observable en los picos de oxidación y reducción. Dichas NPs tienen un claro efecto electrocatalítico frente a fenoles.
- ✓ Destaca el efecto observado en las NP-NiO, su efecto electrocatalítico es tal que se llega a aumentar la intensidad hasta un 88 % respecto de los electrodos de pasta de carbono sin modificar.
- ✓ La reproducibilidad y repetitividad de todos los electrodos fabricados en este proyecto es altísima, con lo que se puede afirmar que los resultados obtenidos son fiables y comparables.
- ✓ Los límites de detección obtenidos en todos los sensores fabricados son bajos, esto garantiza la detección de cantidades de antioxidantes muy pequeñas en el análisis con este tipo de electrodos, llegando hasta del orden de 10^{-8} mol/L.
- ✓ La respuesta de cada antioxidante fue diferente para cada tipo de sensor dando lugar a una huella dactilar de la muestra, útil para su detección y discriminación.
- ✓ La utilización conjunta de una red de sensores (EPC, EPC-NP-TiO₂, EPC-NP-CeO₂, EPC-NP-NiO), proporciona mayor información del medio a analizar. Permite discriminar entre distintos tipo de compuestos fenólicos, en función del número de fenoles existentes en su estructura.
- ✓ Los electrodos de pasta de carbono han demostrado tener un buen comportamiento en la detección de antioxidantes, por lo que se avala su uso como herramienta de análisis para la determinación de estas sustancias tan importantes y beneficiosas en la industria alimentaria.



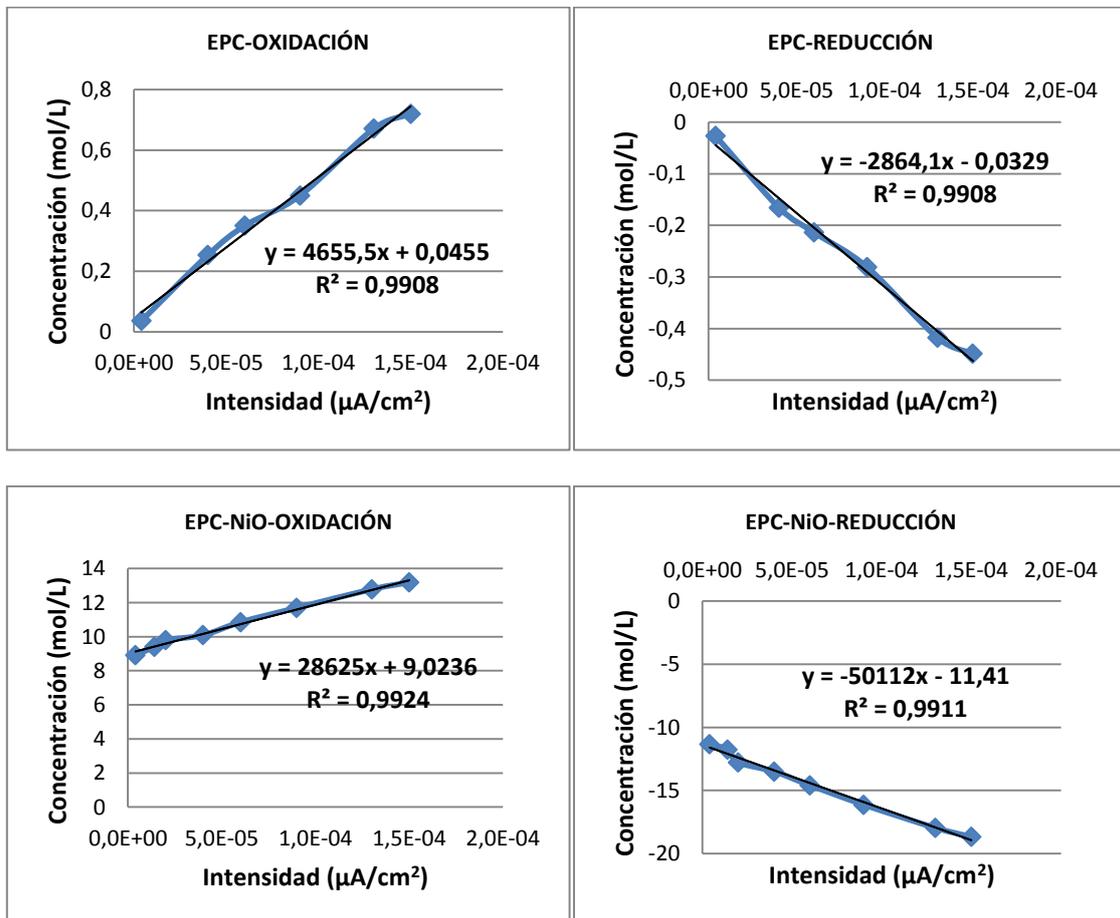
["Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación"]

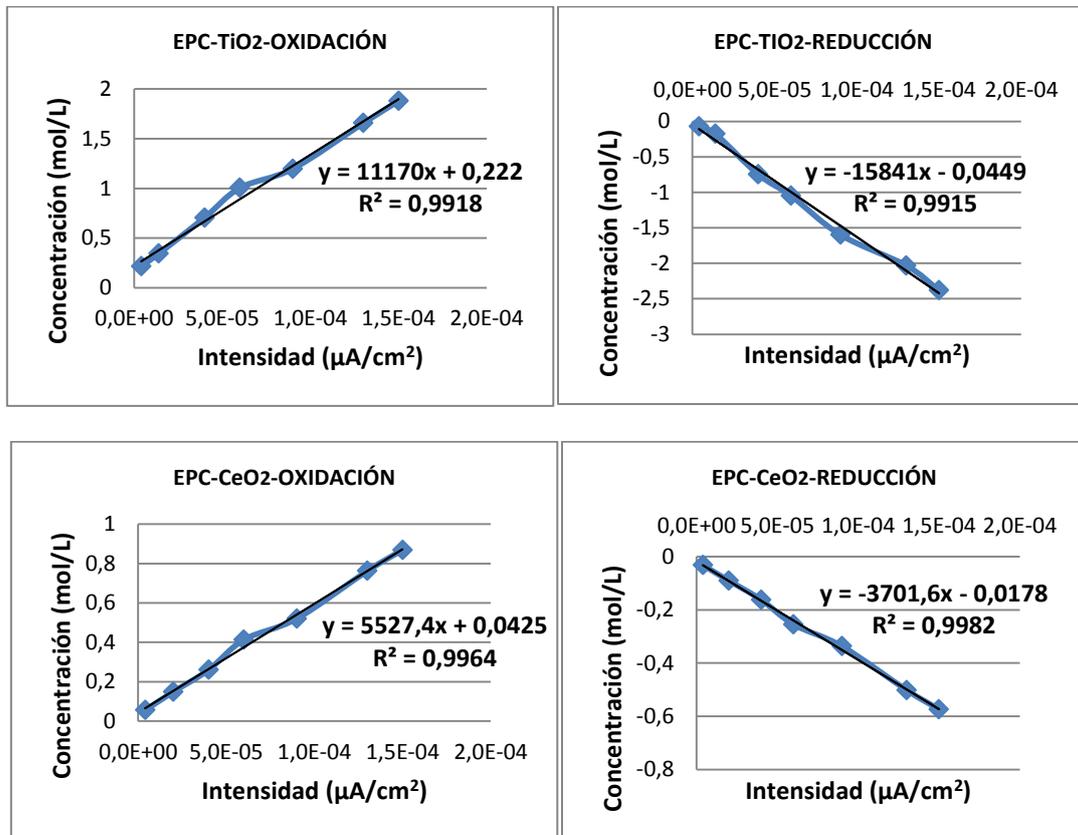
ANEXO I**ÁCIDO VANILICO**



Gráficos Anexo 1.1: Cálculo LD en ácido vanílico

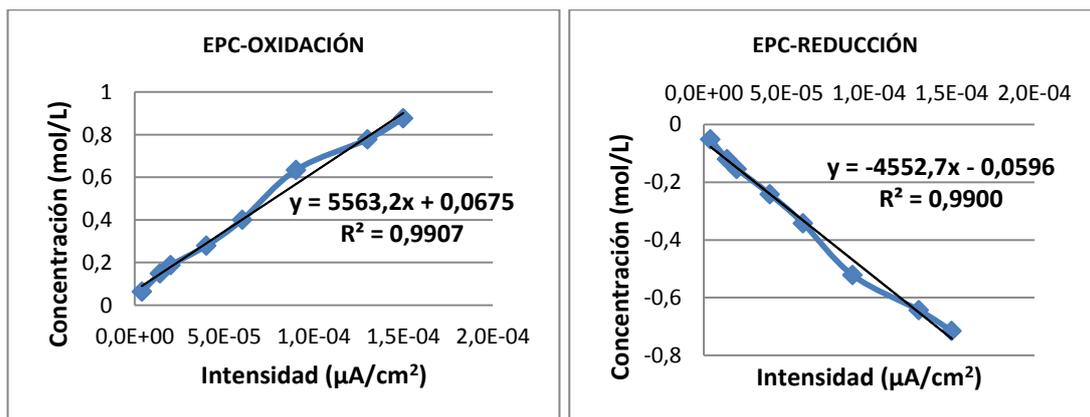
ÁCIDO CAFEICO

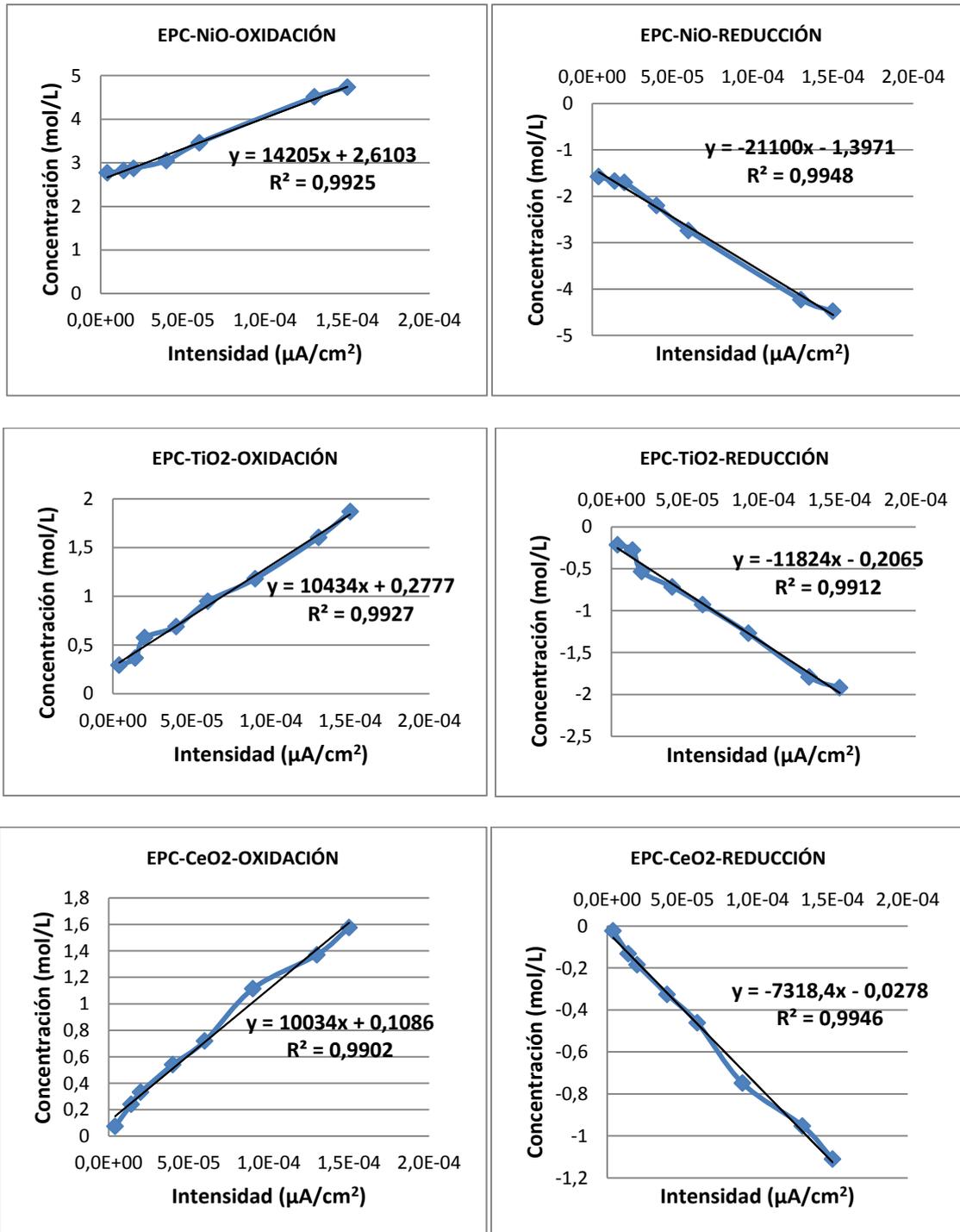




Gráficos Anexo 1.2: Cálculo LD en ácido cafeico

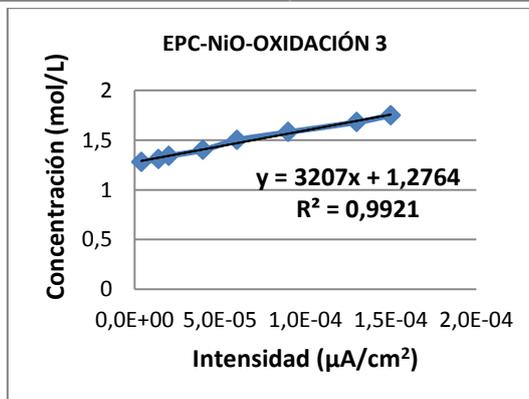
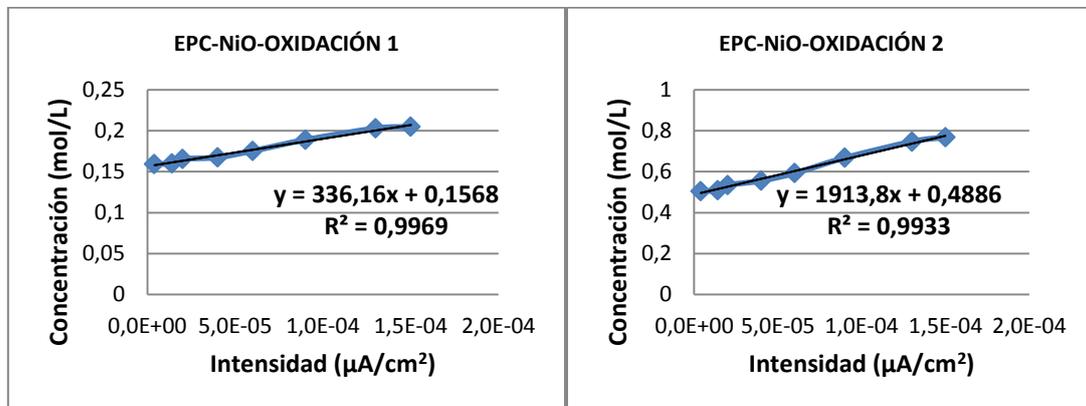
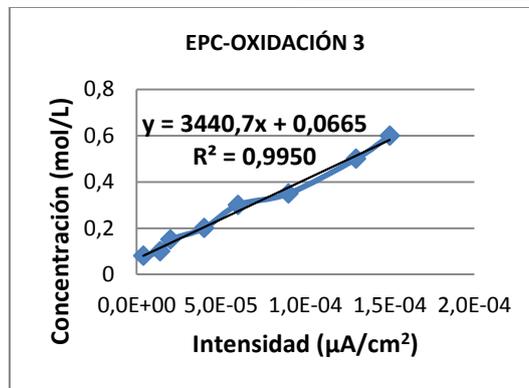
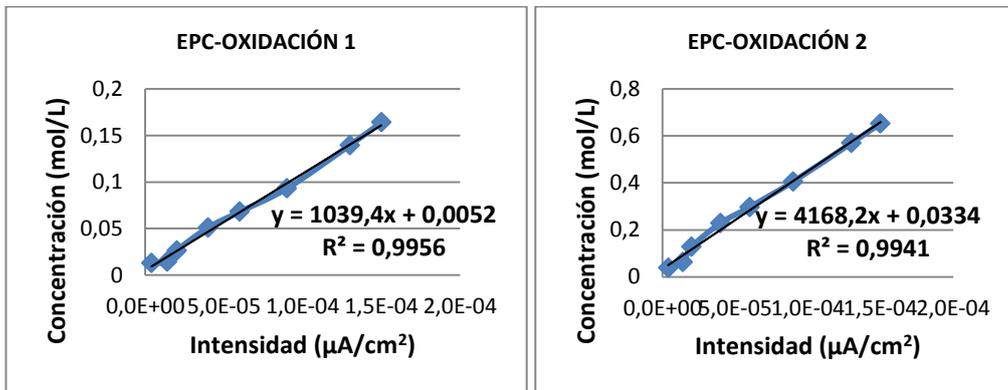
CATECOL

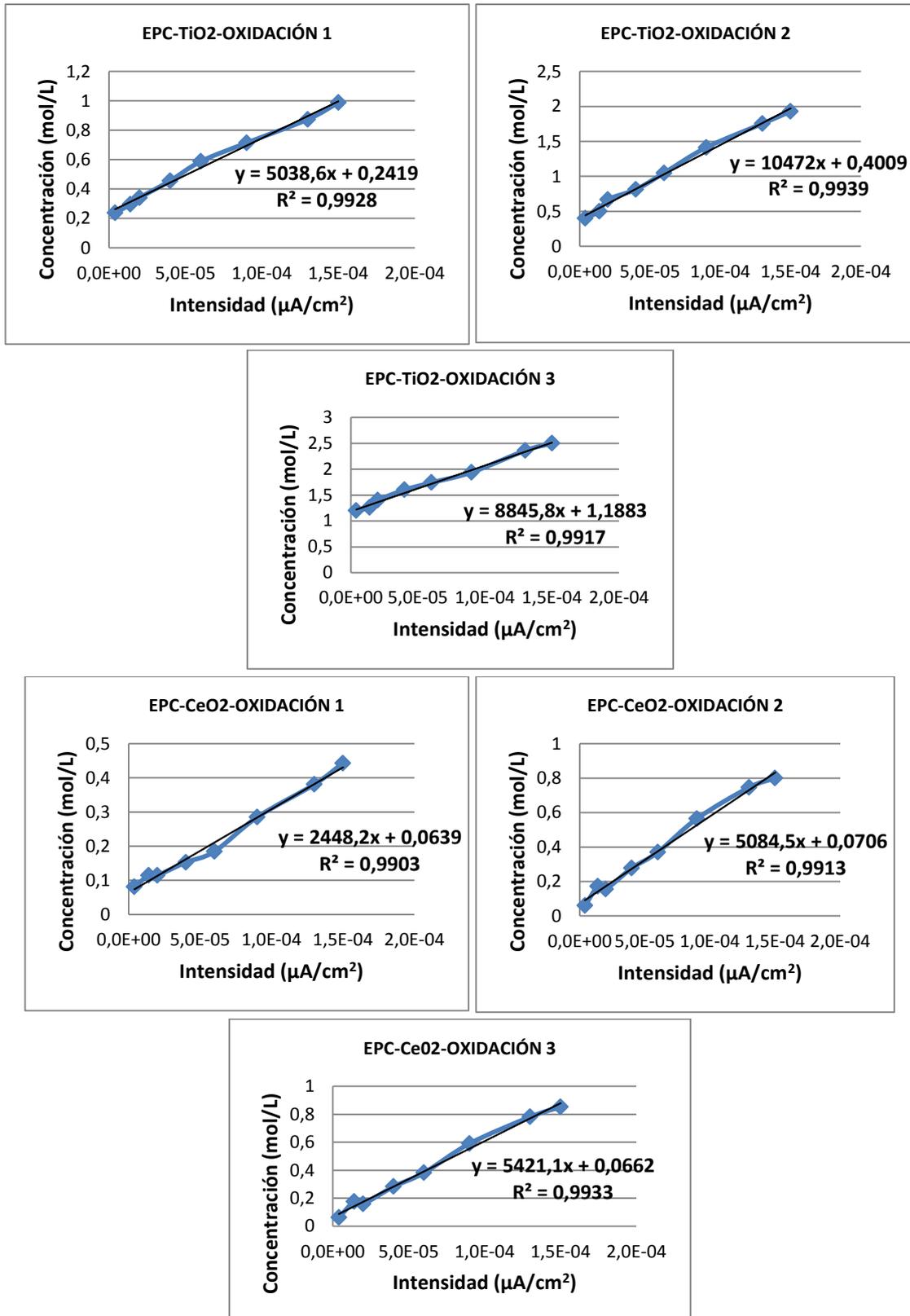




Gráficos Anexo 1.3: Cálculo LD en catecol

PIROGALOL





Gráficos Anexo 1.4: Cálculo de LD en pirogalol

BIBLIOGRAFÍA

1. **Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Gobierno de España).** Última visita: 18/06/2016
<http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/>
2. **Cetó, X., Apetrei, C., del Valle and M. Rodríguez Méndez, M.L (2013).** *Evaluation of red wines antioxidant capacity by means of a voltammetric e-tongue with an optimized sensor array.* *Electrochimica Acta*, Vol. 120, 180-186.
3. **Piovesan, J. V., Jost, C. L. and Spinelli, A. (2015).** *Electroanalytical determination of total phenolic compounds by square-wave voltammetry using a poly (vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrodes.* *Sensors & Actuators: B*, Vol. 216, 192-197.
4. **Lim, W. Q. and Gao, Z. (2015).** *Metal oxide nanoparticles in Electroanalysis.* *Electroanalysis*, Vol. 27, 2071-2090.
5. **Rodríguez Méndez, M. L. (2016).** *Electronic noses and tongues in food science.* Editorial: ELSEVIER. ISBN: 978-0-12-800243-8.
6. **Hornyak, G.L., y otros. (2008).** *Introduction to Nanoscience.* Editorial: CRC Press. ISBN: 978-1-4200-4805-6.
7. **Lindsay, S. M. (2010).** *Introduction to nanoscience.* Editorial: Oxford University Press. ISBN: 978-0-19-954421-9.
8. **Hulla, J.E., Sahu, S.C. and Hayes, A.W. (2015).** *Nanotechnology: Hystory and future.* *Human and Experimental Toxicology (HET)*, Vol. 34(12) 1318–1321.
9. **Schaming, D. and Remita, H. (2015).** *Nanotechnology: from the ancient time to nowadays.* *Foundations of Chemistry*, Vol. 17 (3), 187-205.

10. Zuluaga, D. y otros. (2007). *Métodos de fabricación de nanotecnología: Informe de vigilancia tecnológica. Programa nacional de electrónica, telecomunicaciones e informática*. Editorial: Colciencias. ISBN : 978-958-8290-25-6.
11. Roldan Cuenya, B. (2010). *Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition and oxidation state effects*. Thin Solid Films, Vol. 518 (12), 3127-3150.
12. Laureano, C. (2015). *Nuevas Tecnologías y Materiales*. Última visita: 25/06/2016
<http://nuevatecnologiasymateriales.com/el-porque-las-diferentes-propiedades-de-las-nano-particulas/>
13. Guozhong, C. (2007). *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*. Editorial: Imperial College Press. ISBN: 1-86094-480-9.
14. Boholm, M. and Arvidsson, R. (2016). *A definition framework for the terms Nanomaterial and Nanoparticle*. NanoEthics, Vol. 10 (1), 25-40.
15. Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson ,K., Castranova, V., Fitzpatrick, J. y otros (2005). *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements os a screening strategy*. Particle and Fibre Toxicology, Vol. 2 (8).
16. **Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (2007)**. *Opinion on the scientific aspects of the existing and proposed definitions relating to products of nanoscience and nanotechnology*. Última visita: 09/06/15
http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/opinions/scenih_r_opinions_en.htm
17. **Report of the Expert Panel on Nanotechnology (2008)**. *Small is different: A science perspective on the regulatory challenges of the nanoscale*. Editorial: Council of Canadian Academies. ISBN: 978-0-9781778-8-1.

18. **Commission European (2011).** *Commission recommendation on the definition of nanomaterial.* Official Journal of the European Union, Vol. 275, 38-40.
19. **Behnajady, M. A., Eskandarloo, H. , Modirshahla, M. and Shokri, M. (2011).** *Investigation of the effect of sol-gel synthesis variables on structural and photocatalytic properties of TiO₂ nanoparticles.* Desalination, Vol. 278 (1-3), 10-17.
20. **Mutuma, B. K., Shao, G. N., Kim, W.D. and Kim, H. T. (2014).** *Sol-gel synthesis of mesoporous anatase-brookite and anatase-brookite-rutile TiO₂ nanoparticles and their photocatalytic properties.* Journal of Colloid And Interface Science, Vol. 442, 1-7.
21. **Melchionna, M. and Fornasiero, P. (2014).** *The role of ceria-based nanostructured materials in energy applications.* Materials Today, Vol. 17(7), 349-357.
22. **Ávila Paredes, H. J. (2011).** *Conducción eléctrica en electrolitos sólidos con estructura cristalina tipo fluorita: importancia de las interfases en materiales nanoestructurados.* Ide@s CONCITEG, Vol. 6 (72), 739-759.
23. **Khalaji, A. D., Nikookar, M. and Das, D. (2013).** *Preparation and characterization of nickel oxide nanoparticles via solid state thermal decomposition of dinuclear nickel (II) Schiff base complex [Ni₂(Brsal-1,3-ph)₂] as a new precursor.* Research on Chemical Intermediates, Vol. 41 (1), 357-363.
24. **Wu, M. S., Huang, Y. A. and Yang, C. H. (2007).** *Electrodeposition of nanoporous nickel oxide film for electrochemical capacitors.* International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 32(17), 4153-4159.
25. **Quimitube (2016).** Última visita: 15/05/16
<http://www.quimitube.com/solidos-ionicos-con-estructura-de-sal-gema>.
26. **Hernández Hernández, L. y González Perez, C. (2002).** *Introducción al análisis instrumental.* Editorial: Ariel Ciencia. ISBN: 84-344-8043-3.

27. **Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. (2001).** *Principios de análisis instrumental*. Editorial: MacGraw-Hill. ISBN: 84-481-2775-7.
28. **Sánchez Batanero, P. (1981).** *Química electroanalítica: fundamentos y aplicaciones*. Editorial: Alhambra, ISBN: 84-205-0824-1.
29. **Aldaz Riera, A. (2006).** *Electroquímica*. Universidad Nacional de Educación a Distancia, ISBN: 84-362-2218-0.
30. **Vytras, K., Svancara, I. and Metelka, R. (2009).** *Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry*. Journal of the Serbian Chemical Society, Vol. 74 (10), 1021-1033.
31. **Svancara, I., Walcarius, A., Kalcher, K. and Vytrās, K. (2009).** *Carbon paste electrodes in the new millennium*. Open Chemistry, Vol. 7 (4), 598–656.
32. **Apetrei, C., Mirela Apetrei, I. , de Saja, J. A. and Rodríguez-Méndez, M. L. (2011).** *Carbon paste electrodes made from different carbonaceous materials: application in the study of Antioxidants*. Sensors 2011, Vol. 11 (2), 1328-1344.
33. **Guerreiro, G. V., Zaitouna, A. J. and Lai, R.Y. (2013).** *Characterization of an electrochemical mercury sensor using alternating current, cyclic, square wave and differential pulse voltammetry*. Analytica Chimica Acta, Vol. 810, 79-85.
34. **Laborda, E., Molina, Á., Martínez-Ortiz, F. and Compoton, R. G. (2012).** *Electrode modification using porous layers. Maximising the analytical response by choosing the most suitable voltammetry: Differential Pulse vs Square Wave vs Linear sweep voltammetry*. Electrochimica Acta, Vol. 73, 3-9.
35. **Lin, X., Ni, Y. and Kokot, S. (2013).** *Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants*. Analytica Chimica Acta, Vol. 765, 54-62.

36. Quiñones, M., Miguel, M. and Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. Nutrición Hospitalaria, Vol. 27, Número 1.
37. Rodríguez Méndez, M. L., Apetrei, C. and de Saja, J.A. (2008). *Evaluation of the polyphenolic content os extra virgín olive oils using an array of voltammetric sensors*. Electrochimica Acta, Vol. 53 (20), 20, 5867–5872.
38. Matemadombo, F., Apetrei, C., Nyokong, T. and Rodríguez Méndez, M. L. (2012). *Comparison of carbon screen-printed and disk electrodes in the detection os antioxidants using CoPc derivates*. Sensors and Actuators B: Chemical, Vol.166–167, 457–466.
39. Gay Martín, M., de Saja, J. A, Muñoz, R. and Rodríguez Méndez, M. L. (2012). *Multisensor system based on bisphthalocyanine nanowires for the detection of antioxidants*. Electrochimica Acta, Vol. 68, 88-94.
40. Parra, V., Hernando, T., Rodríguez-Méndez, M. L. and de Saja, J. A. (2004). *Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine midified carbon paste electrodes for discrimination of red wines*. Electrochimica Acta, Vol. 49 (28), 5177–5185.
41. Sharpe, E., Bradley, R. Frasco, T., Jayathilaka, D., Marsh, A. and Andreescu, S. (2014). *Metal oxide based multisensor array and portable database for field analysis of antioxidants*. Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 193, 552-562.
42. Medina Plaza, C., García Cabezón C., García Hernández, C., Bramorski C., Blanco-Val , Y., Martín Pedrosa, F., Kawai T., de Saja J. A. and Rodríguez-Méndez M. L. (2014). *Analysis or organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir-Blodgett films based on functionalized nanoparticles*. Analytyca Chimica Acta, Vol. 572–578.
43. de la Fuente Fernández, Santiago (2011). *Análisis de componentes principales*. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Madrid.

44. Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., Di Natale and C., D'Amico, A. (2005). *Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, Vol. 77 (11), 1965–1983.
45. Rodríguez-Mendez, M.L., Parra, V., Apetrei, C., Gay, M., Prieto, N. and de Saja, J.A. (2008). *Electronic tongue based on voltammetric electrodes modified with electroactive materials. Applications*. Microchimica Acta, Vol. 163 (1-2), 23-31.
46. Rodríguez Méndez, M. L., García Hernandez, C., Medina Plaza, C., García-Cabezón, C. and de Saja, J. A. (2016). *Multisensor systems based on phthalocyanines for monitoring the quality of grapes*.
47. Rodríguez Méndez, M. L., de Saja, J.A., González Antón, R., García Hernández, C., Medina, C., García Cabezón, C. and Martín Pedrosa, F. (2016). *Electronic noses and tongues in wine Industry*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology (Bionics and Biomimetics), ID: 212083.
48. Janata, J., Josowicz, M., Vanýsek P. and DeVaney, M. (1998). *Chemical sensors*. Analytical Chemistry, Vol. 70 (12), 179–208.
49. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, A., Wilson, R. and George S. (2001). *Electrochemical biosensor: recommended definitions and classification*. Biosensors and Bioelectronics, Vol. 16 (1-2), 121-131.
50. Hulanicki, A. A., Geab, S. and Ingman, F. (1991). *Chemical sensors definitions and classification*. Vol.63 (9), 1247-1250.
51. Galán-Vidal, C. A., Muñoz, J., Domínguez, C. and Alegret, S. (1995). *Chemical sensors, biosensors and thick-film technology*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 14 (5), 225-231.
52. Tahara, Y. and Toko, K. (2013). *Electronic Tongues*. Sensors Journal, Vol. 13 (8), 3001-3011.

53. Ciosek, P. and Wróblewski, W. (2011). *Potentiometric electronic tongues for foodstuff and biosample recognition*. Sensors Journal, Vol. 11 (5), 4688-4701.
54. Legin, A., Makarychev Mikhailov, S., Goryacheva, O., Kirsanov, D. and Vlasov Y. (2002). *Cross-sensitive chemical sensors based on tetrapheylporphyrin and phthalocyanine*. Analytica Chimica Acta, Vol. 457 (2), 297-303.
55. Rodríguez Méndez, M.L., Apetrei, C., Gay, M. and de Saja, J.A. (2009). *Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensorsystem based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and Screen Printed Electrodes*. Electrochimica Acta, Vol. 54 (27), 7033-7041.
56. Winqvist, F. (2008). *Voltammetric electronic tongues - basic principles and applications*. Microchimica Acta, Vol. 163 (1-2), 3-10.
57. Del Valle, M. (2013). *Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems*. International Journal of Electrochemistry, Vol. 2012, ID: 986025.
58. Kutyła Olesiuka, A., Nowackab, M. , Wesolya, M. and Cioseka, P. (2013). *Evaluation of organoleptic and texture properties of dried apples by hybrid electronic tongue*. Sensors and Actuators- B, Vol. 187, 234-240.
59. Rodríguez Méndez, M.L., Medina Plaza, C., García Hernández, C., de Saja, J.A., Fernández Escudero, J.A., Barajas Tola, E. and Medrano, G. (2015). *Analysis of grapes and wines using a voltammetric bioelectronic tongue: Correlation with the phenolic and sugar content*. IEEE Sensors 2014 Proceedings, 2139-2142.
60. Gay, M., Apetrei, C., Nevares, I., del Álamo, M., Zurro, J., de Saja, J.A. and Rodríguez Méndez, M.L. (2010). *Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine*. Electrochimica Acta, Vol. 55 (22), 6782-6788.
61. Cetó, X., Céspedes, F. and del Valle, M. (2012). *BioElectronic Tongue for the quantification of total polyphenol content in wine*. Talanta, 99.

62. Lvova, L., Denis, S., Barra, A., Mielle, P., Salles, C., Vergoignan, C. DiNatale, C., Paolesse, R., Temple Boyer, P. and Feron, G. (2012). *Salt release monitoring with specific sensors "in vitro" oral and digestive environments from soft cheeses*. *Talanta*, 97.
63. Pein, M., Kirsanov, D. and Ciosek, P. (2015). *Independent comparison study of six different electronic tongues applied for pharmaceutical analysis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 114, 321-329.
64. McIllduff, C. (2016). *An improved electrical impedance myography (EIM) tongue array for use in clinical trials*. *Journal of Clinical Neurophysiology*, Vol. 127 (1), 932-935.
65. Kutyla Olesiuk, A., Nowacka, M., Wesoly, M. and Ciosek, P. (2013). *Evaluation of organoleptic and texture properties of dried apples by hybrid electronic tongue*. *Sensors and Actuators-B*, Vol. 187, 234-240.
66. Lvova, L., Pudi, R., Galloni, P., Lipollis, V., Di Natalie, Co., Lundström, I. and Paolesse, R. (2015). *Multi-transduction sensing films for Electronic Tongue applications*. *Sensors & Actuators: B*, Vol. 207 Part B, 1076-1086.
67. Winqvist, F., Olsson, J. and Eriksson, M. (2011). *Multicomponent analysis of drinking water by a voltammetric electronic tongue*. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 683 (2), 192-197.
68. Del Valle, M. (2010). *Electronic tongues employing electrochemical sensors*. *Electroanalysis*, Vol. 22 (14), 1539-1555.



[“Desarrollo de sensores nanoestructurados basados en nanopartículas para el análisis de fenoles de interés en alimentación”]
