



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Máster en Nanociencia y Nanotecnología Molecular

*Biosensores electroquímicos modificados con
subftalocianinas para la detección de compuestos
fenólicos*

Autora:

González Antón, Rocío

Tutora:

Rodríguez Méndez, Dra. María Luz

Departamento de Química-Física y Química
Inorgánica

Co-tutora:

García Cabezón, Dra. Ana Cristina

Departamento de CMeIM/EGI/ICGF/IM/IPF

Valladolid, 26 de Julio del 2017





AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Luz Rodríguez Méndez catedrática de la Universidad de Valladolid mi más sincero agradecimiento por aportarme sus conocimientos y por brindarme la oportunidad y apoyo de permitirme compaginar trabajo y estudios en su grupo de investigación UVaSens.

A la Dra. Ana Cristina García Cabezón profesora titular de la Universidad de Valladolid por su tiempo en enseñarme y guiarme durante el desarrollo de esta memoria.

A Marina Osipova de la Universidad Estatal de Moscú por elegir nuestro grupo de investigación para hacer su estancia y facilitarme las subftalocianinas empleadas en este proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio que me han apoyado y acompañado durante este año tanto en el ámbito laboral como personal.

Mis agradecimientos a MINECO-FEDER (AGL2015-67482-R), a la Junta de Castilla y León (VA-032U13) y Junta de Castilla y León (BOCYL-D-4112015-9) por su financiación.

Este proyecto se lo dedico a mi familia, gracias.





ABSTRACT

Subphthalocyanines (SubPcs) are the lowest homologues of phthalocyanines and they are widely studied and used in several fields, among them electrochemical sensors.

The possibility of using voltammetric electrodes based on subphthalocyanines as biosensor has been investigated, thus electrocatalytic and electron mediator properties.

Biofilms of hexa-chloro boron subphthalocyanine (ClSubPc), tri-*tert*-butyl boron subphthalocyanine (*t*-BuSubPc) and hexa-phenoxy boron subphthalocyanine (PhOSubPc) with tyrosinase (Tyr) and laccase (Lac) were fabricated, and their sensing properties towards two diphenol isomers (catechol and hydroquinone) were studied using cyclic voltammetry.

It has been shown the electrocatalytic properties of these biofilms are due to π - π interactions between subphthalocyanine rings and the active sites of enzymes.

Mediated electron transfer between enzymes and the electrode improved the limits of detection, reaching 10^{-7} M values. Besides, studies at increasing scan rates, confirmed the improvement of the charge transfer rates caused by the presence of the subphthalocyanines, showing that they are good electronic mediators.

Keywords: subphthalocyanine, catechol, hydroquinone, voltammetric biosensor, tyrosinase, laccase.





RESUMEN

Las subftalocianinas (SubPcs) son los homólogos menores de las ftalocianinas y son ampliamente estudiadas y utilizadas en múltiples campos, entre ellos el de los sensores electroquímicos.

Se ha investigado la posibilidad de usar electrodos voltamétricos basados en subftalocianinas como biosensores, así como las propiedades electrocatalíticas y su comportamiento como mediadores electrónicos.

Se fabricaron biofilms de subftalocianina de hexa-cloro boro (ClSubPc), subftalocianina de tri-*tert*-butil boro (*t*-BuSubPc) y subftalocianina de hexa-fenoxi boro (PhOSubPc) con tirosinasa (Tyr) y lacasa (Lac), y se estudiaron sus propiedades de detección hacia dos isómeros de difenol (catecol e hidroquinona) mediante voltamperometría cíclica.

Se ha demostrado que las propiedades electrocatalíticas de estos biofilms se deben a interacciones π - π entre los anillos de subftalocianina y los sitios activos de las enzimas.

La mediación de la transferencia de electrones entre las enzimas y el electrodo mejoró los límites de detección, alcanzando valores de 10^{-7} M. Además, los estudios a velocidades de barrido crecientes confirmaron la mejora de las tasas de transferencia de carga debido a la presencia de las subftalocianinas, demostrando por tanto, que son unos buenos mediadores electrónicos.

Palabras clave: subftalocianina, catecol, hidroquinona, biosensor voltamétrico, tirosinasa, lacasa.





ÍNDICE

Capítulo 1. Justificación y objetivos	15
Capítulo 2. Desarrollo.....	19
1.- ESTADO DEL ARTE	21
1.1.- Nanociencia y nanotecnología.....	21
1.2.- Materiales electrocatalíticos.....	25
1.3.- Sensores electroquímicos.....	27
1.4.- Antioxidantes	36
2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	38
2.1.- Material y reactivos	38
2.2.- Preparación de sensores y biosensores	39
2.3.- Caracterización de sensores y biosensores	42
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
3.1.- Espectroscopia UV-vis	47
3.2.- Comportamiento electroquímico: voltametría cíclica	51
Chapter 3. Conclusions	75
Capítulo 4. Referencias.....	79





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Richard Feynman.....	21
Figura 2. Norio Taniguchi.....	22
Figura 3. Campos de aplicación de la nanociencia y la nanotecnología.....	23
Figura 4. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones.....	24
Figura 5. Técnicas de fabricación en la nanoescala: top-down y bottom-up.....	25
Figura 6. Estructura molecular de las subftalocianinas empleadas: 1) subftalocianina de hexa-cloro boro, 2) subftalocianina de tri- <i>tert</i> -butil boro y 3) subftalocianina de hexa-fenoxi boro.....	27
Figura 7. Configuración de una celda electrolítica de 3 electrodos.....	28
Figura 8. Oxidación del catecol para dar benzoquinona en presencia de tirosinasa.....	31
Figura 9. Estructura molecular tridimensional de la tirosinasa.....	31
Figura 10. Oxidación de la hidroquinona para dar benzoquinona en presencia de lacasa.....	31
Figura 11. Estructura molecular tridimensional de la lacasa.....	32
Figura 12. Representación de la inmovilización de una enzima mediante la técnica cross-linking.....	32
Figura 13. Variación de potencial frente al tiempo en una VC.....	34
Figura 14. Voltamograma cíclico para un proceso reversible.....	35
Figura 15. Estructura molecular del catecol.....	37
Figura 16. Estructura molecular de la hidroquinona.....	37
Figura 17. Spincoater 1H-D7 (Mikasa, Co., Tokyo, Japan).....	41
Figura 18. Espectrofotómetro UV-vis Shimadzu 2600.....	43
Figura 19. Potenciostato/galvanostato PGSTAT128 (Autolab Metrohm, Utrecht, Netherlands).....	44
Figura 20. Distribución gaussiana para los límites de detección.....	46
Figura 21. Representación de una recta de regresión.....	47
Figura 22. Espectro de absorbancia de ClSubPc, <i>t</i> -BuSubPc y PhOSubPc en disolución de tolueno 5·10 ⁻⁵ M.....	48
Figura 23. Espectro de absorbancia de <i>t</i> -BuSubPc en disolución de tolueno 5·10 ⁻⁵ M y <i>t</i> -BuSubPc sobre ITO.....	49
Figura 24. Espectro de absorbancia de PhOSubPc en disolución de tolueno 5·10 ⁻⁵ M y PhOSubPc sobre ITO.....	49
Figura 25. Espectro de absorbancia de ClSubPc en disolución de tolueno 5·10 ⁻⁵ M y ClSubPc sobre ITO.....	50
Figura 26. Voltamograma del sensor de <i>t</i> -BuSubPc en 40 mL de PBS 0.01 M a pH 7.....	52



Figura 27. Voltamograma del sensor de ClSubPc en 40 mL de PBS 0.01 M a pH 7.	52
Figura 28. Voltamograma del sensor de PhOSubPc en 40 mL de PBS 0.01 M a pH 7.	53
Figura 29. Voltamograma de los sensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc, PhOSubPc y <i>t</i> -BuSubPc y del sensor sin modificar ITO en 40 mL de catecol 10 ⁻⁴ M.	54
Figura 30. Voltamograma de los sensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc, PhOSubPc y <i>t</i> -BuSubPc y del sensor sin modificar ITO en 40 mL de hidroquinona 10 ⁻⁴ M.	55
Figura 31. Voltamograma de los biosensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc-Tyr, PhOSubPc-Tyr y <i>t</i> -BuSubPc-Tyr y del biosensor sin modificar Tyr en 40 mL de catecol 10 ⁻⁴ M.	56
Figura 32. Voltamograma de los biosensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc-Lac, PhOSubPc-Lac y <i>t</i> -BuSubPc-Lac y del biosensor sin modificar Lac en 40 mL de hidroquinona 10 ⁻⁴ M.	57
Figura 33. Voltamograma de PhOSubPc y PhOSubPc-Tyr en catecol 10 ⁻⁴ M a una velocidad de 0.1 V·s ⁻¹	58
Figura 34. Voltamograma de ClSubPc inmerso en catecol aumentando la concentración de 5·10 ⁻⁷ M a 1.8·10 ⁻⁵ M en 40 mL de PBS.	60
Figura 35. Ajuste lineal de la gráfica intensidad frente a concentración para el estudio del límite de detección de onda catódica del sensor ClSubPc.	61
Figura 36. Voltamograma de PhOSubPc-Tyr inmerso en catecol aumentando la concentración de 5·10 ⁻⁷ M a 1.8·10 ⁻⁵ M en 40 mL de PBS.	62
Figura 37. Voltamograma de Tyr inmerso en catecol aumentando la concentración de 5·10 ⁻⁷ M a 1.8·10 ⁻⁵ M en 40 mL de PBS.	63
Figura 38. Voltamograma del biosensor <i>t</i> -BuSubPc-Lac inmerso en 40 mL de hidroquinona 10 ⁻⁴ M a distintas velocidades de barrido.	66
Figura 39. Representaciones de izquierda a derecha: intensidad frente a la velocidad de barrido e intensidad frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, para el pico catódico del biosensor <i>t</i> -BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10 ⁻⁴ M.	67
Figura 40. Representación de $I/(v^{1/2})$ frente a velocidad de barrido para el pico catódico del biosensor <i>t</i> -BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10 ⁻⁴ M.	68
Figura 41. Representación del logaritmo de la velocidad frente al potencial para calcular $\alpha \cdot n$ de la ecuación de Lavirón.	69
Figura 42. Gráfica Tafel: logaritmo de la intensidad frente al sobrepotencial para <i>t</i> -BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10 ⁻⁴ M.	70
Figura 43. Proceso de oxidación-reducción del catecol y de la hidroquinona.	72



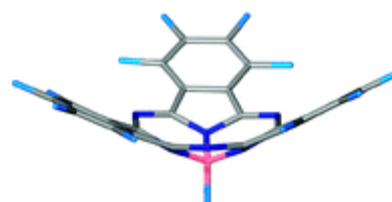
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de disolución de fenol seleccionadas para el estudio de los límites de detección.	59
Tabla 2. Cálculo de la desviación típica de la respuesta del sensor ClSubPc en PBS 0.01 M pH 7 para el estudio de los límites de detección.....	61
Tabla 3. Límites de detección catódica, rango lineal y sensibilidad obtenidos para la detección de catecol en todos los sensores y biosensores.	64
Tabla 4. Límites de detección catódica, rango lineal y sensibilidad obtenidos para la detección de hidroquinona en todos los sensores y biosensores.	64
Tabla 5. Valores obtenidos de las intensidades catódicas correspondientes a cada velocidad de barrido del biosensor <i>t</i> -BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10^{-4} M.	66
Tabla 6. Relación con la velocidad de barrido en biosensores inmersos en catecol 10^{-4} M, calculado en el pico catódico.	71
Tabla 7. Relación con la velocidad de barrido en biosensores inmersos en hidroquinona 10^{-4} M, calculado en el pico catódico.....	71
Tabla 8. Concentración superficial de los materiales sensibles en el electrodo de trabajo.	73
Tabla 9. Desviación estándar (SD) y coeficientes de variación en tanto por ciento, de los biosensores modificados inmersos en catecol e hidroquinona 10^{-4} M.....	74

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de Nernst para procesos reversibles.	35
Ecuación 2. Ecuación para procesos irreversibles.....	36
Ecuación 3. Límite de detección.	60
Ecuación 4. Ecuación de Lavirón.	69
Ecuación 5. Obtención de $\alpha \cdot n$ de la ecuación de Lavirón.....	69
Ecuación 6. Ecuación de Butler-Volmer.	70
Ecuación 7. Obtención de α de la ecuación de Butler-Volmer.....	71
Ecuación 8. Ecuación para obtener la concentración superficial de los materiales sensibles.	72





Capítulo 1. Justificación y objetivos





El trabajo de investigación llevado a cabo en este proyecto, se encuadra dentro de las líneas de investigación propias llevadas a cabo por el grupo UVaSens perteneciente al departamento de Química-Física y Química Inorgánica de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid.

El grupo UVaSens, se compone de un equipo multidisciplinar de científicos e ingenieros de distintas ramas de la ciencia y de la tecnología, cuyas líneas de investigación están dirigidas al desarrollo y diseño de sensores y biosensores, aplicados al análisis y control de calidad de bebidas y alimentos. Donde los fenoles cobran importancia, por ser una familia de compuestos de gran interés industrial debido a las propiedades organolépticas y antioxidantes que confieren al alimento o bebida que los contiene.

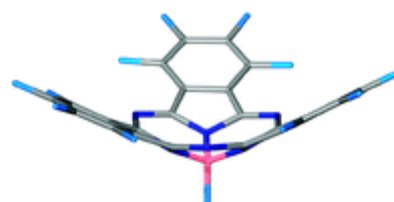
UVaSens lleva años trabajando con éxito y reconocimiento en el desarrollo de sensores y en concreto en el caso de sensores voltamétricos modificados con películas nanoestructuradas, como pueden ser las ftalocianinas y/o las nanopartículas. Hasta la fecha se han estado desarrollando en UVaSens, redes de sensores y biosensores modificados con ftalocianinas y/o nanopartículas ya sea con o sin compuestos funcionalizantes. A día de hoy, se pretende abrir, nuevas líneas de investigación en el grupo con el uso de biosensores modificados con subftalocianinas. Debido a ello, este proyecto ha abordado el desarrollo de nuevos biosensores voltamétricos modificados con diferentes tipos de subftalocianinas para así estudiar su capacidad como mediadores electrónicos.

Objetivos:

- Caracterizar tres tipos de subftalocianinas en disolución y formando películas depositadas sobre ITO (que hará de sustrato) mediante espectroscopia UV-vis.
- Desarrollar sensores y biosensores electroquímicos voltamétricos a partir de subftalocianinas depositadas por spincoating sobre ITO.
- Estudiar las interacciones formadas entre las subftalocianinas y las enzimas, así como analizar las posibles sinergias entre las subftalocianinas y las enzimas.
- Caracterizar los biosensores mediante voltametría cíclica (VC) para analizar su capacidad electrocatalítica y/o de mediación electrónica frente a dos isómeros difenólicos: catecol e hidroquinona.



- Calcular los límites de detección del biosensor frente a estos difenoles, así como determinar el mecanismo limitante del proceso mediante estudios de velocidad de barrido de dichos biosensores.



Capítulo 2. Desarrollo



1.- ESTADO DEL ARTE:

1.1.- Nanociencia y nanotecnología:

La nanociencia y la nanotecnología son dos disciplinas complementarias encargadas de estudiar y desarrollar nanomateriales. El prefijo nano, hace alusión a la milmillonésima parte de un metro, luego, 1 nanómetro (nm) son 10^{-9} m. Por tanto, todo material que se encuentre en aquel rango donde al menos una de sus dimensiones sea inferior a los 100 nm, se considerará un nanomaterial [1].

En el año 1959, el físico ganador del premio Nobel, Richard Feynman, escribió un ensayo titulado *'There is plenty of room at the bottom'* (*'Aún hay mucho espacio en el fondo'*), donde anunciaba la posibilidad de fabricar y manipular materiales situados en el rango atómico y/o molecular, es decir, nanomateriales. A raíz de dicho ensayo, se gestó el comienzo de esta nueva disciplina conocida como nanociencia.

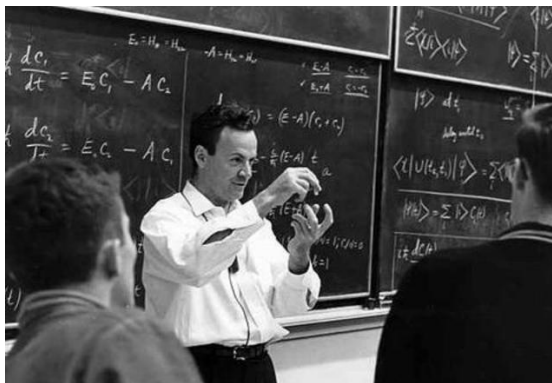


Figura 1. Richard Feynman.

Unas décadas después, en torno a los años 80, se desarrollaron nuevas técnicas experimentales, que permitieron implantar el gran salto de la nanociencia. Entre estas nuevas técnicas, podemos destacar la microscopía de barrido con efecto túnel (STM, del inglés *Scanning Tunneling Microscope*) y la microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscope*). Ambas técnicas permitieron observar tanto átomos como moléculas.

Estas técnicas, conocidas generalmente como microscopios de campo cercano (SPM, del inglés *Scanning Probe Microscope*), surgieron de la inherente limitación de los microscopios ópticos convencionales, debido a que trabajan con la longitud de onda de la luz, y esto hace que su resolución se restrinja en el rango de micras y no de nanómetros, impidiendo por tanto, observar los nanomateriales. Pero, además, estas nuevas técnicas abrieron la posibilidad de manipular los átomos de forma individual [1]. Con estos nuevos avances, se pudo materializar los pronósticos de Feynman presentados unas décadas antes.

Por otro lado, el término nanotecnología, se originó en 1974 gracias al profesor Norio Taniguchi, de la Tokyo University of Science, en un artículo titulado '*On the Basic Concept of Nanotechnology*' ('*Sobre el Concepto Básico de la Nanotecnología*') donde se describía la posibilidad de fabricar materiales alcanzando una precisión nanométrica [2].

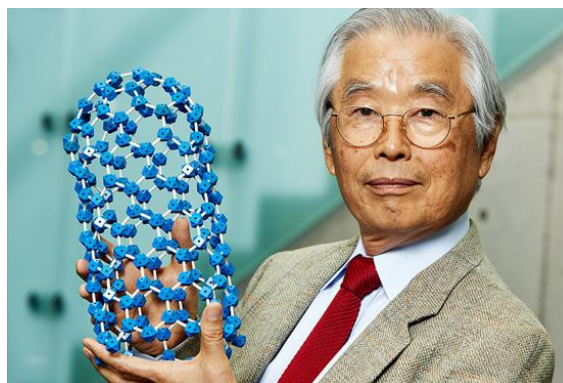


Figura 2. Norio Taniguchi.

Todo estos avances, que permitieron dar origen a la nanociencia y a la nanotecnología de forma contemporánea, hace que se presente la pregunta de cuáles son las barreras que separan y diferencian la nanociencia de la nanotecnología. Básicamente se puede decir que la nanociencia es la ciencia que trata de la obtención y estudio de las propiedades de los nanomateriales, y la nanotecnología es la aplicación práctica de la nanociencia, encargándose del diseño, caracterización, producción y/o aplicación de dispositivos y sistemas nanométricos. Aunque estas definiciones no se pueden tomar como restricciones, ya que ambas disciplinas se retroalimentan mutuamente y son convergentes. Para seguir avanzando en la nanotecnología, debe seguir desarrollándose la nanociencia y viceversa [1].

Existen seis grandes grupos donde tienen una mayor presencia la nanociencia y la nanotecnología, los cuales son: química, física, ingeniería, informática, biología y medicina [1].

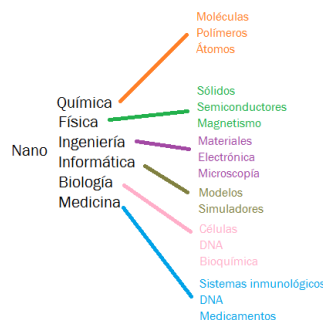


Figura 3. Campos de aplicación de la nanociencia y la nanotecnología.

Al abarcar la nanociencia y la nanotecnología tantos campos de estudio, se materializa la necesidad de que exista un ambiente multidisciplinar, por lo que en ambas disciplinas hay una gran presencia de físicos, químicos e ingenieros trabajando de forma conjunta.

Por otro lado, los retos de las investigaciones actuales tanto en nanociencia y en nanotecnología, consisten en dar al elemento 'nano' un papel más activo, como por ejemplo en el caso que nos ocupa. Desarrollo de sensores y biosensores voltamétricos modificados utilizando para ello materiales nanométricos como las subftalocianinas.

1.1.1.- Clasificación de los nanomateriales:

Una forma de clasificar los nanomateriales es según sus dimensiones o a la de alguno de sus componentes, indicando cuántas dimensiones superan los 100 nm: 0D (cero dimensiones), 1D (una dimensión), 2D (dos dimensiones) y 3D (tres dimensiones).

Los materiales 3D se pueden considerar nanomateriales si están formados a partir de estructuras 0D, 1D o 2D replicándose en las tres dimensiones del espacio de una forma ordenada [2].

En el caso que nos ocupa, nos encontramos en el rango 0D donde todas las dimensiones están por debajo de los 100 nm, como por ejemplo las subftalocianinas, para fabricar posteriormente dispositivos 2D, que serán los sensores y biosensores y donde tendremos dos dimensiones que superarán los 100 nm.

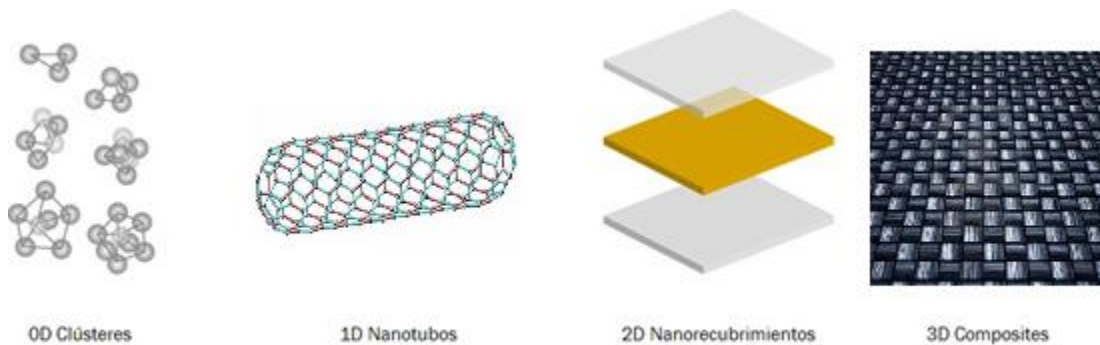


Figura 4. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones.

Pero esta no es la única clasificación de los nanomateriales, también, se pueden clasificar por su naturaleza química (orgánico, inorgánico o mixto) o por su procedencia (natural o artificial) entre otras clasificaciones.

1.1.2.- Técnicas de fabricación de la nanociencia y nanotecnología:

Se pueden clasificar en dos grupos: técnicas *top-down* (*descendente*) donde se parte de un material grande o a granel (*bulk*) para obtener un material nanométrico utilizando generalmente técnicas físicas para lograr tal fin y técnicas *bottom-up* (*ascendente*) que consisten en obtener a partir de átomos o moléculas y generalmente mediante procesos químicos, diversos materiales situados en el rango de la nanoescala, como pueden ser, por ejemplo, los clústeres o las nanopartículas [1]. El esquema del proceso llevado a cabo en ambas técnicas se puede ver en la figura 5 del presente proyecto.

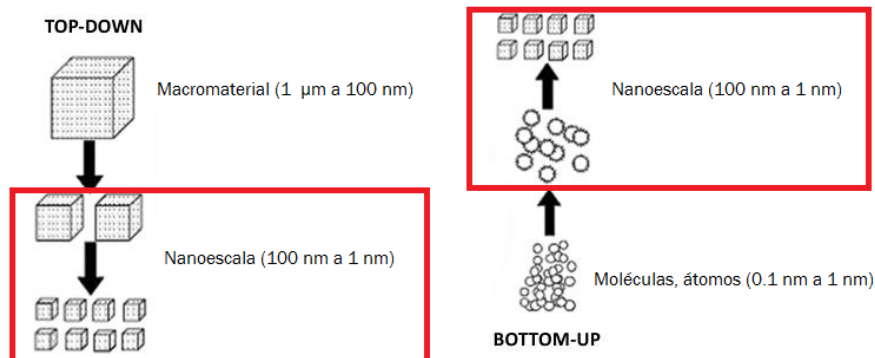


Figura 5. Técnicas de fabricación en la nanoescala: top-down y bottom-up.

En este caso, la fabricación de los sensores electroquímicos empleados, se realiza por el procedimiento bottom-up mediante técnicas de autoensamblado molecular, donde se aprovecha la propia capacidad de las moléculas para establecer enlaces no covalentes, con el fin de formar compuestos superiores y/o depositarse en superficies mediante dicho autoensamblado.

1.2.- Materiales electrocatalíticos:

Los materiales electroactivos son aquellos que sufren procesos redox (reducción-oxidación) al aplicar una diferencia de potencial, mientras que los materiales electrocatalíticos catalizan los procesos redox de otros compuestos.

Los mejores materiales electrocatalíticos son aquellos que se encuentran en la escala nanométrica debido a que al reducir el tamaño, la relación superficie/volumen aumenta, lo que conlleva a un aumento considerable de la reactividad química [2].

Algunos materiales electrocatalíticos destacables son: ftalocianinas, subftalocianinas, nanopartículas, polímeros conductores, grafeno o nanotubos de carbono, entre otros.



1.2.1.- Subftalocianinas:

Las subftalocianinas consisten en tres unidades isoindol con un átomo de boro en el centro y muestran un sistema tridimensional deslocalizado de 14 π -electrones con estructura en forma de cono no-planar [3,4].

Estos macrociclos poseen una alta estabilidad térmica y una alta solubilidad en disolventes orgánicos típicos, evitando así su agregación en solución gracias a su propia estructura y a la presencia de ligandos axiales.

En el campo de sensores, las subftalocianinas tienen como ventaja su importante papel como mediadores electrónicos pudiendo destacar las siguientes propiedades que son relevantes para alcanzar tal fin:

Propiedades ópticas: las subftalocianinas presentan una banda de absorción intensa, conocida como banda Q, situada en el rango de 500 a 600 nm y que es debida al sistema π - π^* HOMO-LUMO entre orbitales. Esta banda Q es la responsable del característico color de las subftalocianinas [5]. Además, dependiendo del comportamiento aceptor o dador electrónico de los grupos axiales, se originan desplazamientos característicos de la banda Q en el espectro de absorción a mayores o menores longitudes de onda según el caso y que determinarán posteriormente el comportamiento electroquímico [6,7].

Propiedades electroquímicas: gracias a la inherente naturaleza del núcleo aromático macrocíclico, así como de los grupos axiales, los potenciales a los que tienen lugar las oxidaciones y reducciones del sensor, se modifican, desplazándose a un mayor o menor valor según los distintos grupos axiales [3]. El uso de las subftalocianinas en electroquímica, se debe, tal y como se comentó, a su estructura macrocíclica totalmente π -conjugada, ya que presentan similitudes con otros compuestos pirrólicos tales como las ftalocianinas (compuestos tetrapirrólicos), las cuales ya han demostrado ser buenos electrocatalizadores para la detección de fenoles [8-11].

Esta situación, hace lógico que se espere que las subftalocianinas muestren al igual que las ftalocianinas, fuertes propiedades electrocatalíticas hacia los fenoles. Además, las ftalocianinas también han demostrado ser excelentes mediadores de electrones en biosensores, ya que facilitan la transferencia de electrones desde el sitio activo de la enzima (previamente inmovilizada en la superficie del electrodo) al electrodo de trabajo, ayudando así en el propio proceso de recuperación de la enzima [12-14].

Existen diferentes maneras de modificar o cambiar la estructura de las subftalocianinas [15-17], como por ejemplo, modificando los grupos axiales, o modificando el átomo central.

En este proyecto se emplean tres tipos de subftalocianinas obtenidas mediante el primer procedimiento consistente en la modificación de los grupos axiales:

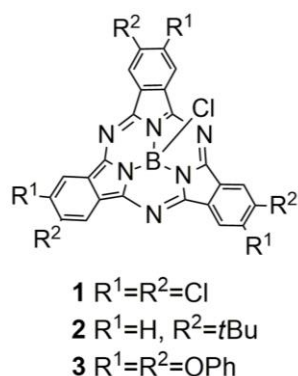


Figura 6. Estructura molecular de las subftalocianinas empleadas: 1) subftalocianina de hexa-cloro boro, 2) subftalocianina de tri-tert-butil boro y 3) subftalocianina de hexa-fenoxi boro.

Estas tres subftalocianinas tienen distinto comportamiento dador de electrones y entre ellas, este comportamiento dador crece de la forma siguiente: $ClSubPc < PhOSubPc < t-BuSubPc$. Como puede verse, $t-BuSubPc$ es el mayor dador de electrones, mientras que $ClSubPc$ tiene un comportamiento completamente atractor de electrones y $PhOSubPc$ se sitúa en un estado intermedio. Estas diferencias en el carácter dador/aceptor de electrones se espera que influyan en la respuesta electroquímica modificando así el valor de los potenciales del proceso electrolítico, luego existirá una diferente respuesta la cual se estudiará en este proyecto.

1.3.- Sensores electroquímicos:

La electroquímica se dedica al estudio de las reacciones químicas que ocurren en la interfase de un electrodo (que será un material conductor eléctrico) y un medio electrolítico (que será una disolución donde se produce la conducción iónica).

Hay dos sistemas electroquímicos: las celdas galvánicas o baterías (donde la caída de potencial entre electrodos es debida a una reacción química espontánea para obtener energía eléctrica) y celdas electrolíticas (cuando la reacción es debida a la aplicación de una diferencia de potencial realizada por un potencióstato o conductímetro, provocando así la electrólisis).

La electrólisis consiste en un proceso de transformación de una sustancia química (analito) que se encuentra en medio electrolítico debido al paso de corriente eléctrica y donde el intercambio de electrones tiene lugar en el electrodo.

Las celdas electroquímicas están constituidas por un recipiente que contiene la disolución electrolítica y varios electrodos. Las celdas más sencillas poseen dos electrodos, donde un electrodo hace de cátodo (reducción) y el otro electrodo hace de ánodo (oxidación), generándose una corriente de electrones que circula del ánodo al cátodo.

Entre las superficies de los electrodos y en la disolución electrolítica ocurren diferentes reacciones electroquímicas, aunque la reacción de mayor interés en este contexto, es la que tiene lugar en la superficie del electrodo anódico (oxidación) conocido como electrodo de trabajo (WE, del inglés *Working Electrode*), mientras que el electrodo catódico (reducción) se conoce como contraelectrodo (CE, del inglés *Counter Electrode*), el cual posee una baja resistencia para no producir errores excesivos en las mediciones y se emplea para cerrar el circuito.

La configuración más común de las celdas electroquímicas, son las celdas de tres electrodos, donde el tercer electrodo se conoce como electrodo de referencia (RE, del inglés *Reference Electrode*) de potencial estable, valor conocido y alta resistencia interna. Gracias a este RE, se minimizan los errores de tensión debidos a la pérdida óhmica o resistiva a través del medio electrolítico.

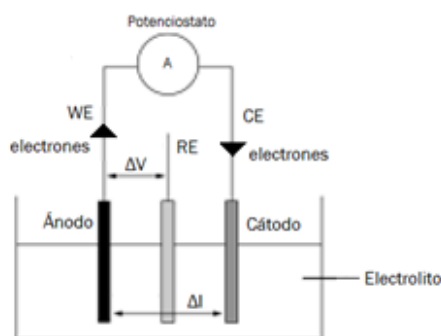


Figura 7. Configuración de una celda electrolítica de 3 electrodos.

El potencióstato o conductímetro, se conecta a la celda y aplica variaciones de potencial entre los electrodos, para medir la intensidad de corriente debida a las reacciones redox del analito que ocurren en el WE, donde uno o más electrones del analito pasarán al WE.



El WE en muchos casos consiste en un sensor electroquímico modificado, que se puede definir como un dispositivo que contiene un sistema de reconocimiento del analito, junto con un transductor conectado a éste que es capaz de traducir la información química del analito en una señal útil que normalmente es una señal eléctrica [18].

La preferencia en el uso de sensores químicos a sensores físicos (los cuales detectan cambios como la presión, etc.) se debe a la necesidad de la industria de obtener información química y dentro de los sensores químicos (donde se pueden encontrar ópticos, másicos, térmicos y electroquímicos), la preferencia de sensores electroquímicos radica en su posibilidad de emplear reducidas cantidades de analito y que su señal se obtiene de forma inmediata, extrayendo los resultados de forma directa.

Los sensores tienen importantes ventajas para la industria como su robustez, fabricación simple, baratos de producir, amplio rango de linealidad y un tiempo de respuesta corto. Permiten realizar análisis on-line con gran fiabilidad y sensibilidad, además de ser una alternativa a complejos instrumentos de caracterización de analitos como puede ser la cromatografía.

Hay tres tipos de sensores electroquímicos, que se diferencian según la forma de obtener la información del analito:

- Sensores conductimétricos: se basan en la variación de la conductividad, o de alguna propiedad asociada a esta, producida por el analito.
- Sensores amperométricos: se aplica un potencial fijo sobre el WE, respecto al RE para medir las intensidades, además, se incorpora un CE para completar el circuito.
- Sensores voltamétricos: son un tipo particular de sensores amperométricos cuyo fundamento consiste en la variación del potencial de trabajo en función del tiempo para obtener información del analito a partir de intensidades de corriente. Estos sensores se utilizan con distintos métodos de medición como barrido lineal, barrido cíclico, barrido de onda cuadrada, etc. y en función de estas señales se obtienen distintas voltametrías, como la voltametría cíclica (VC) usando barridos cíclicos. Igualmente, un CE completa el circuito.



Los sensores electroquímicos tienen el gran potencial añadido de que se pueden modificar, con objeto de mejorar las propiedades electrocatalíticas de éste hacia la detección de un analito. El hecho de modificar los sensores, supone además un aumento de la relación superficie/volumen del sensor, provocando así una mayor rapidez de la adsorción y desadsorción del analito.

1.3.1.- Biosensores electroquímicos:

Dentro de los sensores electroquímicos, están los biosensores, que son aquellos sensores, donde el receptor tiene una procedencia biológica, como puede ser el caso de las enzimas, los anticuerpos, el ADN, las células, etc., y al igual que los sensores electroquímicos, éstos se encargan de transformar la señal química del analito en una señal eléctrica.

Desde los años 1990, el interés en el estudio de la transferencia de electrones entre compuestos biológicos y electrodos modificados con nanomateriales ha ido creciendo debido a su elevada área específica y a una alta superficie de energía libre.

En este caso, se desarrollan por tanto, biosensores electroquímicos voltamétricos de tipo enzimático modificados con distintas subftalocianinas. La adición de componentes, como puede ser el caso de las subftalocianinas al biosensor, se realiza para otorgar una mejor selectividad, un mejor comportamiento electrocatalítico y bajos límites de detección al biosensor, ya que las subftalocianinas actúan como mediadores electrónicos, facilitando así, la recuperación de la enzima y la transferencia de los electrones de la enzima al electrodo de trabajo [19].

Las enzimas empleadas en estos biosensores, son la tirosinasa y la lacasa que corresponden al grupo de las oxidasas. Su uso se justifica por demostrar ser una buena alternativa para la detección de fenoles debido a su alta especificidad, rapidez en su respuesta y sensibilidad a éstos, permitiendo diferenciar en este caso entre isómeros como son el catecol y la hidroquinona [12,20–22].

Tirosinasa: también conocida como monofenol monooxigenasa o catecol oxidasa, cataliza la oxidación de monofenoles y *p*- y *o*- difenoles a la correspondiente benzoquinona. En presencia de catecol (uno de los difenoles que se pretende detectar y del que la tirosinasa es selectiva por ser el *o*-difenol uno de los mejores sustratos para la tirosinasa), se obtiene la benzoquinona (*ortho*-benzoquinona) y los hidrógenos extraídos del catecol se combinan con oxígeno para dar agua [23].

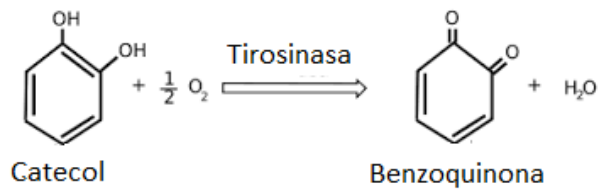


Figura 8. Oxidación del catecol para dar benzoquinona en presencia de tirosinasa.

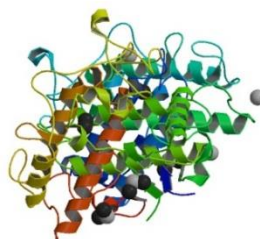


Figura 9. Estructura molecular tridimensional de la tirosinasa.

Lacasa: otro tipo de enzima perteneciente al grupo de las oxidasas y que cataliza la oxidación de monofenoles y *p*- y *o*- difenoles formando radicales que se convierten en benzoquinonas en la segunda etapa de la oxidación. En presencia de hidroquinona (el otro de los difenoles que se pretenden detectar y del que la lacasa es selectiva por ser el mejor sustrato para ésta los difenoles de posición *p*-), se obtiene la benzoquinona (*para*-benzoquinona) y los hidrógenos extraídos de la hidroquinona se combinan con oxígeno para dar agua [23].

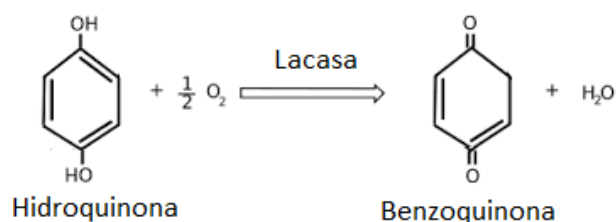


Figura 10. Oxidación de la hidroquinona para dar benzoquinona en presencia de lacasa.

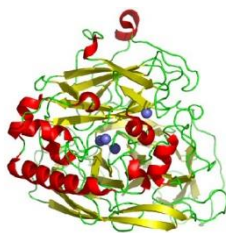


Figura 11. Estructura molecular tridimensional de la lacasa.

La principal dificultad que representa el uso de enzimas en sensores, es la necesidad de inmovilizarlas en éste [24], ya que la mayoría de las enzimas en solución no pueden intercambiar electrones directamente con el electrodo, debido a la gran cadena de polipéptidos complejos que rodean sus centros redox y que se encuentran en el núcleo de la enzima. Estas cadenas impiden la transferencia de electrones de la enzima al electrodo de trabajo, pero cuando se inmovilizan las enzimas sobre la superficie del electrodo, dicha dificultad se solventa.

Para inmovilizar las enzimas en un sensor, se pueden emplear distintas técnicas mediante retención física como atrapamiento o microencapsulado, así como técnicas químicas como pueden ser la deposición electroquímica, Langmuir-Blodgett (LB), Layer-by-Layer (LbL) o inmovilización por casting seguido de cross-linking [24,25].

En este caso, la técnica empleada para la inmovilización tanto de la tirosinasa como de la lacasa sobre un substrato de vidrio tipo ITO (óxido de indio y estaño) consiste en un proceso de casting de una disolución de la enzima correspondiente en buffer fosfato (pH 7) a una concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido de una etapa de cross-linking con glutaraldehído al 2.5 % (v/v). Luego este proceso tiene lugar en dos pasos: un primer paso de adsorción de la enzima al sensor y un segundo paso consistente en un entrecruzamiento debido a la acción del glutaraldehído, (que es uno de los entrecruzadores más habituales), facilitando así las uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima [24].

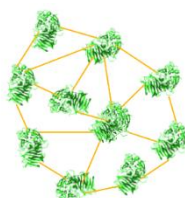


Figura 12. Representación de la inmovilización de una enzima mediante la técnica cross-linking.



1.3.2.- Técnicas electroquímicas: voltametría cíclica:

Tanto los sensores como los biosensores, se pueden caracterizar mediante técnicas amperométricas (miden intensidades) o las técnicas potenciométricas (miden potenciales).

Dentro de las técnicas amperométricas, la voltametría cíclica (VC) es muy útil en el estudio de las reacciones electroquímicas, donde se pueden analizar compuestos particulares presentes en mezclas de compuestos orgánicos e inorgánicos debido a la propia especificidad del proceso. Ha sido exitosamente utilizado como método de detección de compuestos por el grupo UVaSens y para caracterizar sensores modificados. Por tanto, será la técnica a utilizar en este proyecto.

La VC consiste en aplicar un barrido de voltaje y medir las variaciones de intensidad producidas por la presencia de especies electroactivas (analito) en la disolución electrolítica o en el propio WE, estos cambios se representan en un gráfico intensidad/potencial, conocido como voltamograma.

La VC permite obtener una respuesta de intensidad medida entre el WE y el CE frente a una diferencia de potencial aplicado entre el RE y el WE y medida por el RE en un medio electrolítico donde se producirá la electrólisis del analito y cuyo intercambio de electrones ocurre sobre la superficie del WE [26].

Estudiando las respuestas de intensidad, se conoce el límite de detección (mínima cantidad de analito que detecta el sensor), así como mediante estudios de la velocidad de barrido, se conoce el mecanismo redox que ocurre en el proceso.

Luego, el barrido de voltaje de la VC aplicado entre el WE y el RE, se escanea con forma triangular cíclicamente, aunque puede tener otras formas [26], desde un valor inicial E_i a un límite predeterminado E_b , conocido como potencial de conmutación o potencial de barrido, donde, posteriormente se invierte la dirección a su valor de inicio E_i . Este ciclo puede sucederse repetidas veces.

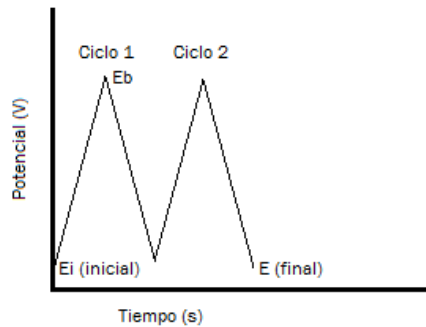


Figura 13. Variación de potencial frente al tiempo en una VC.

La dirección de barrido puede ser positiva o negativa, y se puede establecer el siguiente convenio:

- Intensidad positiva: corriente anódica.
- Intensidad negativa: corriente catódica.
- Picos a intensidades positivas: picos de oxidación (anódicos).
- Picos a intensidades negativas: picos de reducción (catódicos).

Por otro lado, es importante poseer una línea base correcta para medir las corrientes de pico, para comprobar que no hay procesos redox indeseados, para conocer a qué potenciales se descompone el medio electrolítico y cuál es el intervalo de potencial adecuado en cada situación.

En la figura 14, se puede ver un voltamograma cíclico reversible, donde no hay procesos redox indeseados, es decir, sólo se ve el analito de interés, en nuestro caso el catecol o la hidroquinona dependiendo del medio electrolítico preparado. Los parámetros importantes son los potenciales del pico anódico (E_{pa}) y catódico (E_{pc}) y las intensidades de ambos picos (I_{pa} e I_{pc}).

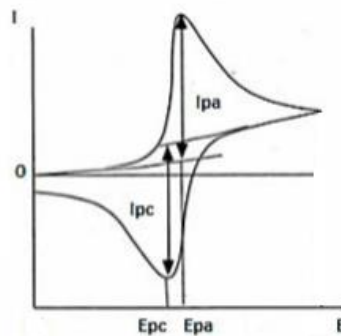


Figura 14. Voltamograma cíclico para un proceso reversible.

Si se trata de un voltamograma de una disolución compleja habrá tantos picos de oxidación y reducción cómo especies se oxiden y reduzcan.

Según la forma del voltamograma, podemos obtener tres tipos de reacciones [26]:

- **Reversibles:** intercambio rápido de los electrones con el WE, donde se cumple la ecuación de Nernst durante todo el proceso (n es el número de electrones). Además, el cociente entre las intensidades de los picos de oxidación y reducción debe ser igual a 1 y las intensidades de los picos son proporcionales a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

$$\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = \frac{59}{n}$$

Ecuación 1. Ecuación de Nernst para procesos reversibles.

- **Irreversibles:** a bajas velocidades de barrido, la transferencia de electrones es rápida y el voltamograma registrado es como el de un proceso reversible, pero a altas velocidades de barrido, la velocidad de transferencia de electrones es más lenta, pudiéndose observar cómo los picos de oxidación y reducción se separan con los ciclos y la intensidad necesaria para la oxidación no coincide con la intensidad empleada para la reducción.



Además, el cociente entre las intensidades de los picos de oxidación y reducción no es igual a 1. En esta situación se cumple (donde $\alpha \cdot n$ es el número de electrones transferidos):

$$\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = \frac{-47.7}{\alpha \cdot n}$$

Ecuación 2. Ecuación para procesos irreversibles.

- Cuasi-reversibles: al aumentar la velocidad de barrido, la forma del voltamograma se asemeja a un proceso reversible.

Cuando se modifican sensores con material electroactivo y/o electrocatalítico, se mejora la selectividad de los electrodos [27,28] y los voltamogramas mostrarán picos de oxidación y reducción asociados tanto a los analitos analizados (catecol o hidroquinona) como a los materiales sensibles que modifican el electrodo estableciéndose una sinergia entre componentes.

1.4.- Antioxidantes:

El objetivo de desarrollar biosensores modificados con subftalocianinas, es detectar antioxidantes presentes en los alimentos y sus concentraciones.

Los antioxidantes son una familia de múltiples componentes químicos de gran interés para la industria alimentaria. A bajas concentraciones pueden prevenir los daños oxidativos que provocan los radicales libres en las biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos poliinsaturados y azúcares) y tener efectos beneficiosos para la salud [29].

Dentro de los antioxidantes, destacan los polifenoles que se encuentran en una gran variedad de alimentos retardando o previniendo su oxidación, y preservando los alimentos (decoloración de la carne, manchas marrones en las frutas, etc.). Esta capacidad antioxidante se relaciona con su estructura molecular (número de grupos hidroxilo (-OH) y dobles enlaces conjugados) [30].

La principal fuente de polifenoles son las bayas, el té, la cerveza, el vino, el aceite de oliva, las nueces, el trigo, las patatas, los puerros, etc.

Los polifenoles (cerca de 8000 diferentes y presentes en más de 450 alimentos) son generalmente subdivididos en taninos, ligninas y flavonoides y juegan todos ellos un papel importante en los atributos organolépticos del alimento [8].

Entre los polifenoles, este proyecto, se centra en el estudio de dos isómeros, el catecol y la hidroquinona. El primero de ellos en posición *ortho* y el segundo en posición *para*.

El catecol, conocido como pirocatecol o 1,2-dihidroxibenceno, se usa principalmente en las industrias del caucho, química, fotográfica, colorantes, grasas, aceites, cosméticos y productos farmacéuticos.

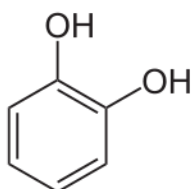


Figura 15. Estructura molecular del catecol.

La hidroquinona, conocida como 1,4-dihidroxibenceno, se usa como materia prima en multitud de colorantes y actúa como agente blanqueador de la piel y/o despigmentante débil para tratar manchas cutáneas.

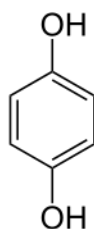


Figura 16. Estructura molecular de la hidroquinona.

Tanto el catecol como la hidroquinona poseen un buen comportamiento electroquímico, por lo que se pueden analizar mediante VC. Anteriormente a la VC, las técnicas usadas para detectar antioxidantes se enfocaban en análisis de muestras a nivel de laboratorio con técnicas lentas, caras y complejas [31].



2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL:

2.1.- Material y reactivos:

Los reactivos y disolventes a emplear son los disponibles comercialmente y se usan en la forma comercial en la que se adquieren. Teniendo en cuenta las correspondientes fichas de seguridad.

En este estudio se utilizan tres tipos de subftalocianinas sintetizadas y cedidas por la Universidad Estatal de Moscú al grupo UvaSens [15,32], las cuales se preparan en disoluciones de tolueno 10^{-3} M:

- Subftalocianina de hexa-cloro boro (ClSubPc) MW=636 g/mol.
- Subftalocianina de tri-*tert*-butil boro (*t*-BuSubPc) MW=600 g/mol.
- Subftalocianina de hexa-fenoxi boro (PhOSubPc) MW=982 g/mol.

Los dos tipos de enzimas que se utilizan son:

- Tirosinasa de champiñón ≥ 1000 unidad/mg (Sigma-Aldrich, CAS: 9002-10-2).
- Lacasa de trametes versicolor ≥ 10 unidad/mg (Sigma-Aldrich, CAS: 80498-15-3).

El listado del resto de productos es:

- Tolueno anhidro 99.8 %, C_7H_8 (Sigma-Aldrich, CAS: 108-88-3 C_7H_8 MW=92.14 g/mol).
- di-Sodio hidrogenofosfato anhidro ≥ 99 %, HNa_2O_4P (Sigma-Aldrich, CAS: 7558-79-4, MW=141.96 g/mol).
- Sodio dihidrogenofosfato ≥ 99 %, NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, CAS: 7558-80-7, MW=119.98 g/mol).
- Glutaraldehído, 50 % acuoso, $C_5H_8O_2$ (Alfa Aesar, CAS: 111-30-8 $C_5H_8O_2$, MW=100.12 g/mol).
- Agua desionizada (Equipo Millipore, Direct-Q, $\rho=18.2$ M Ω -cm).



En cuanto al material y equipos básicos a emplear durante todo el proyecto son:

- Balanza analítica de precisión.
- Embudo de vidrio.
- Eppendorfs.
- Espátula de metal.
- Frasco lavador con agua desionizada.
- Guantes, bata y gafas.
- Matraces aforados de 25 mL y tapones.
- Matraces aforados de 200 L y tapones.
- Matraz aforado de 500 L y tapón.
- Micropipeta (100 a 1000 μ L) y puntas.
- Pinzas de plástico.
- Vaso de precipitados de 250 mL.
- Vasos de precipitados de 5 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Vidrios de reloj.

2.2.- Preparación de sensores y biosensores:

El material necesario para preparar los biosensores es:

- Horno.
- Multímetro.
- Pintura conductora de plata (Electrolube).
- Spincoater 1H-D7 (Mikasa, Co., Tokyo, Japan).
- Sustrato ITO de vidrio.
- Ultrasonidos (Ultrasons Selecta).



Las disoluciones que se requieren previamente preparadas y se emplean en la fabricación de los sensores y/o biosensores son:

- Disolución buffer fosfato (PBS): se preparan 500 mL de este tampón químico a una concentración 0.01 M con pH 7, para ello se pesan 0.3659 g de NaH_2PO_4 y 0.2697 g de NaHPO_4 . El PBS se usa para disolver los analitos y para aportar al medio un pH neutro y así evitar la desnaturalización de las enzimas.
- Disolución de glutaraldehído al 2.5 % (v/v): se preparan 100 mL, para ello se toman 4.45 mL de disolución de glutaraldehído y se diluyen hasta 100 mL en PBS.
- Viales de enzima: es conveniente destacar la necesidad de las enzimas de ser conservadas en todo momento congeladas o en hielo mientras se preparan los viales, de forma que no se desnaturalicen y descongelarlas 15 minutos antes de depositarlas en los sensores. Para ello, se pesan 5 mg de enzima en el eppendorf, se añade 1 mL de PBS y se disuelve la enzima con sumo cuidado de no romper su membrana, después, se toman 60 μL y se va alicuotando en los eppendorf y manteniendo en hielo picado hasta agotar el volumen inicial y mientras no se usen, se congelan.

Para la preparación de los sensores electroquímicos, se limpian los ITOs en un baño ultrasónico con agua, jabón neutro y acetona durante 10 minutos, se aclaran con agua desionizada y se secan.

Una vez secos, se sitúan en el equipo spincoater con el lado conductor expuesto (con la ayuda del multímetro), para depositar sobre éste 100 μL de la subftalocianina correspondiente para cada ITO. Las películas de subftalocianina se obtienen aplicando una rotación a 700 rpm durante 180 segundos, de los cuales, 60 segundos son de rampa para alcanzar las 700 rpm.



Figura 17. Spincoater 1H-D7 (Mikasa, Co., Tokyo, Japan).

La técnica spincoating, permite obtener películas homogéneas pero sin ordenamiento (sin ser nanoestructuradas) y es altamente reproducible.

A continuación, los ITOs con las películas de subftalocianina se llevan al horno durante 10 minutos a 50°C para asegurar la completa evaporación del disolvente y se pinta una línea de laca de plata en un extremo del sensor para facilitar la conducción al WE.

Tras este paso, el sensor ya se puede caracterizar o modificar nuevamente para obtener el biosensor depositando la correspondiente enzima sobre la propia película de subftalocianina.

Para obtener el biosensor, se lava primeramente el sensor durante 2 minutos en solución de PBS en un vaso de precipitados de 5 mL y se deja secar, después, se toman 50 μL de solución que contiene 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la enzima que se precise (previamente descongelada) con una micropipeta y se reparte dicho volumen sobre la película de subftalocianina y se deja secar para que se adsorba sobre la superficie del sensor. Después del secado, la película se sumerge durante 5 minutos en una solución de glutaraldehído al 2.5 % (v/v) en un vaso de precipitados de 5 mL y se deja secar para que ocurra el cross-linking. A continuación, el biosensor se sumerge durante 20 segundos en PBS para eliminar la enzima que no ha realizado cross-linking y se deja secar [24]. Finalmente, se pinta una línea de laca de plata en el extremo del biosensor acabando así el proceso.



Los sensores y biosensores preparados fueron los siguientes con la siguiente nomenclatura:

- ClSubPc.
- *t*-BuSubPc.
- PhOSubPc.
- Tyr.
- ClSubPc-Tyr.
- *t*-BuSubPc-Tyr.
- PhOSubPc-Tyr.
- Lac.
- ClSubPc-Lac.
- *t*-BuSubPc-Lac.
- PhOSubPc-Lac.

2.3.- Caracterización de sensores y biosensores:

2.3.1.- Caracterización mediante espectroscopia UV-vis:

El material necesario para la caracterización es:

- Gradilla metálica.
- Micropipeta (100 a 1000 μ L) y puntas.
- Sensores modificados con subftalocianina.
- Tubos de vidrio cilíndricos de 1 cm de paso óptico.
- Espectrofotómetro UV-vis Shimadzu 2600.

El espectrofotómetro UV-vis Shimadzu 2600, es un equipo disponible en el laboratorio de doble haz. Las condiciones de trabajo son con un rango espectral de 300 nm a 700 nm y un valor de resolución medio.



Figura 18. Espectrofotómetro UV-vis Shimadzu 2600.

En este equipo se caracterizan tanto las subftalocianinas en disolución como depositadas en sensor, pudiendo ver cómo dependiendo del carácter dador o aceptor de los ligandos, la banda Q se desplaza a mayores o menores longitudes de onda, así como la variación de la banda Q de la subftalocianina en disolución y en el sensor debido a la disposición de los núcleos moleculares en el empaquetamiento.

2.3.2.- Caracterización mediante voltimetría cíclica:

Mientras que para la caracterización mediante VC, se emplea:

- 2 Septum.
- Electrodo de referencia (RE) Ag | AgCl/KCl.
- Electrodo de trabajo (WE).
- Celda electrolítica.
- Contraelectrodo (CE).
- Mechero.
- Micropipeta (100 a 1000 μ L) y puntas.
- Pinzas metálicas.
- Pinzas de plástico.
- Potenciostato/galvanostato PGSTAT128 (Autolab Metrohm, Utrecht, Netherlands).

- Soporte para la celda electrolítica.
- Soporte universal (pie y varilla cilíndrica).



Figura 19. Potenciostato/galvanostato PGSTAT128 (Autolab Metrohm, Utrecht, Netherlands).

Los reactivos empleados para la caracterización por VC son:

- Catecol $\geq 99\%$, $C_6H_6O_2$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 120-80-9).
- Hidroquinona 99% , $C_6H_6O_2$ (Sigma-Aldrich, CAS: 123-31-9).
- Ácido sulfúrico al 96% , H_2SO_4 (Panreac).
- Cloruro potásico y cloruro de plata 3 M para análisis volumétrico, KCl y $AgCl$ (Panreac, Lote: 0000505288).
- PBS, 0.01 M y $pH\ 7$.
- Cloruro potásico $\geq 99\%$, KCl (Sigma-Aldrich, CAS: 7447-40-7).
- Agua desionizada, H_2O (Equipo Millipore, Direct-Q, $\rho=18.2\text{ M}\Omega\text{-cm}$).

Para la preparación del RE, se introduce una disolución de $KCl + AgCl\ 3\text{ M}$ (Panreac) comercial en el capilar interior, mientras que en la camisa se introduce una disolución de $KCl\ 0.1\text{ M}$ a $pH\ 5$.

Las disoluciones que se requieren previamente preparadas y se emplean en la caracterización por VC son:



- Disolución catecol: se preparan 200 mL a una concentración 10^{-4} M, para ello se pesan 0.002 g de catecol y se disuelven en 100 mL de PBS. El catecol es fácilmente oxidable, por lo que cada vez que se hacen mediciones se prepara una disolución fresca y mientras se mide permanece debidamente tapado de la luz.
- Disolución hidroquinona: se preparan 200 mL a una concentración 10^{-4} M, al ser un isómero del catecol, la cantidad pesada fue la misma que con el catecol. Se trabaja con disoluciones frescas en cada medición y se tapa debidamente de la luz.
- Disolución KCl: se preparan 100 mL a una concentración 0.1 M a pH 5, para ello se pesan 0.746 g.

Las mediciones se realizan en la celda electrolítica de vidrio con los tres electrodos acoplados a temperatura ambiente, sin atmósfera inerte y sin agitación externa:

- Electrodo de referencia (RE): Ag | AgCl/KCl 3 M.
- Contraelectrodo (CE): placa de platino (Pt) de superficie 7 cm^2 (3 cm x 2.3 cm).
- Electrodo de trabajo (WE): sensor o biosensor modificado con subftalocianinas sobre un sustrato de ITO.

Como medio electrolítico se emplea 40 mL PBS 0.01 M, a un pH 7 o 40 mL de disolución de catecol o hidroquinona en PBS 10^{-4} M dependiendo de cada análisis [25].

La VC se aplica bajo las siguientes condiciones: función de barrido con forma triangular desde -0.5 V a 1.2 V, 10 ciclos para asegurar la estabilización del sensor, una velocidad de barrido de $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (excepto en los estudios de velocidad de barrido) y una adquisición de datos de 0.001 V/punto.

Para el estudio de los límites de detección (LD), se trabaja en un rango de concentraciones de $2\cdot 10^{-5}$ M a $5\cdot 10^{-7}$ M de disolución de catecol o hidroquinona en 40 mL y se calculan los límites de detección a partir de las respuestas de intensidad en los picos catódicos y/o anódicos, tomadas de los voltamogramas registrados a diferentes concentraciones, siguiendo el criterio ' $3 \cdot \text{SD} / m$ '.

Este criterio viene de cuando se hace una medición de una muestra en un blanco, los resultados se distribuyen en forma de campana de Gauss, si se toma una probabilidad del 95 %, se puede definir un límite (L) el cual se podría considerar un límite de detección (LD) ya que por encima de éste, está el 5 % de los resultados que podrían pertenecer al blanco (parte sombreada de la figura 20, curva A). Pero si se tiene una muestra con una señal media de L , sus resultados tienen una distribución gaussiana como en la figura 20, curva B, y en este caso la probabilidad de concluir que una muestra pertenece al blanco es del 50 %.

Es por ello, que se considera más adecuado considerar el valor medio (M) de una distribución gaussiana como en la figura 20, curva C, de tal modo que el 5 % de sus valores se encuentren por debajo del límite (L).

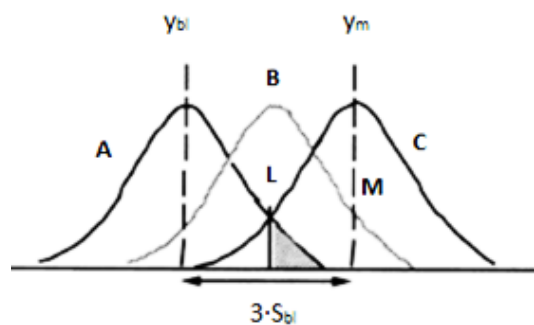


Figura 20. Distribución gaussiana para los límites de detección.

Esto sucede cuando la distancia de y_{bl} e y_m es 3 veces la SD del blanco (llamada S_{bl}), siendo y_m la mínima señal analítica distinguible que se calcula como: ' $y_m = y_{bl} + 3 \cdot S_{bl}$ '.

Por otro lado, una recta de regresión convencional para la calibración tiene la forma: ' $y = y_{bl} + m \cdot C$ ', donde y es la señal medida, m la pendiente y C la concentración (figura 21).

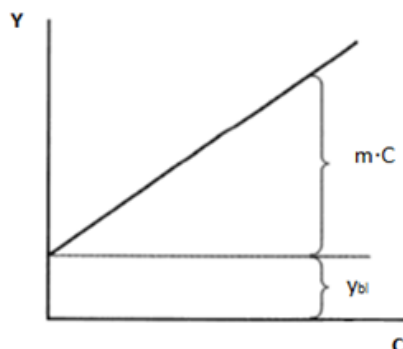


Figura 21. Representación de una recta de regresión.

En el límite de detección, ' $y_m = y_{bl} + m \cdot C_m$ ', luego la concentración mínima (C_m) perceptible resulta de combinar ' $y_m = y_{bl} + 3 \cdot S_{bl}$ ' y ' $y_m = y_{bl} + m \cdot C_m$ ', obteniéndose: $C_m = y_m - y_{bl} / m = 3 \cdot S_{bl} / m$ y éste es el criterio que se emplea para calcular los límites de detección.

Finalmente, para el estudio de velocidades de barrido, se trabaja en un rango de velocidades de 0.1 Vs^{-1} a 1.1 Vs^{-1} .

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

3.1.- Espectroscopia UV-vis:

En primer lugar, se presentan los espectros de absorbancia de las tres subftalocianinas en disolución de tolueno representados de forma conjunta (figura 22) y posteriormente los espectros de las tres subftalocianinas depositadas en el sensor (figuras 23, 24 y 25).

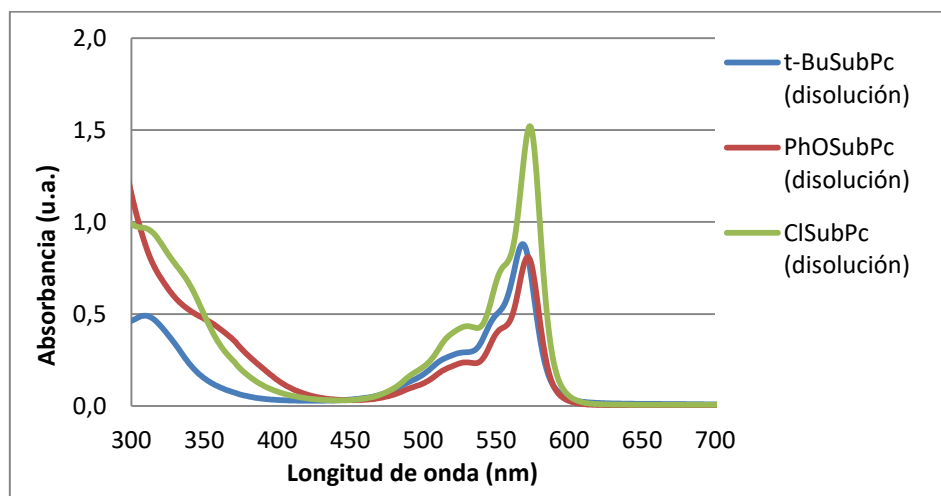


Figura 22. Espectro de absorción de ClSubPc, t-BuSubPc y PhOSubPc en disolución de tolueno $5 \cdot 10^{-5}$ M.

En el espectro de la figura 22, se puede observar en todos los casos una fuerte banda Q asignada a las transiciones $\pi-\pi^*$ de las subftalocianinas en disolución [33]. Además, se puede observar cómo la banda Q se desplaza a longitudes de onda menores cuando la subftalocianina presenta grupos dadores, es decir, el valor de longitud de onda de la banda Q disminuirá cuanto más dador sea el grupo axial, siguiendo por tanto el orden: t-BuSubPc (568 nm) < PhOSubPc (572 nm) < ClSubPc (573 nm).

Otro resultado que se puede extraer del espectro anterior, es que las longitudes de onda de las subftalocianinas son menores a las observadas en las ftalocianinas, cuya banda Q se encuentra entre 650 y 670 nm. Esta disminución en la longitud de onda se debe a la forma cono-no planar de las subftalocianinas [34].

A continuación, en las figuras 23, 24 y 25 se va a mostrar de forma comparativa el espectro de absorción de las distintas subftalocianinas (ClSubPc, PhOSubPc y t-BuSubPc) tanto en disolución como depositadas sobre el sustrato de tipo ITO formando así el sensor.

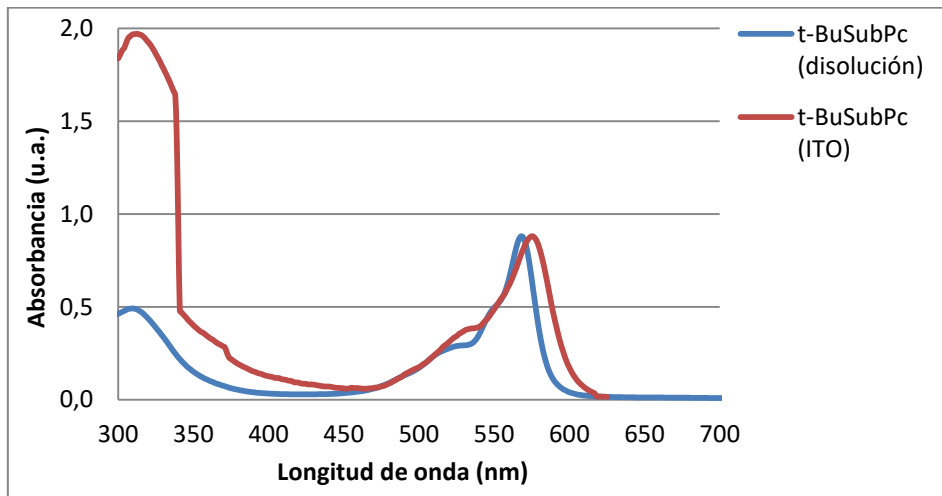


Figura 23. Espectro de absorbancia de t-BuSubPc en disolución de tolueno $5 \cdot 10^{-5}$ M y t-BuSubPc sobre ITO.

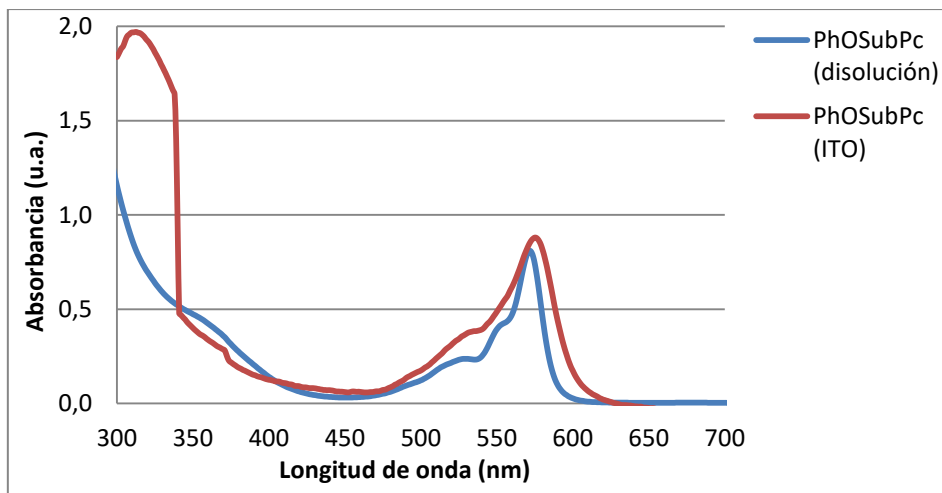


Figura 24. Espectro de absorbancia de PhOSubPc en disolución de tolueno $5 \cdot 10^{-5}$ M y PhOSubPc sobre ITO.

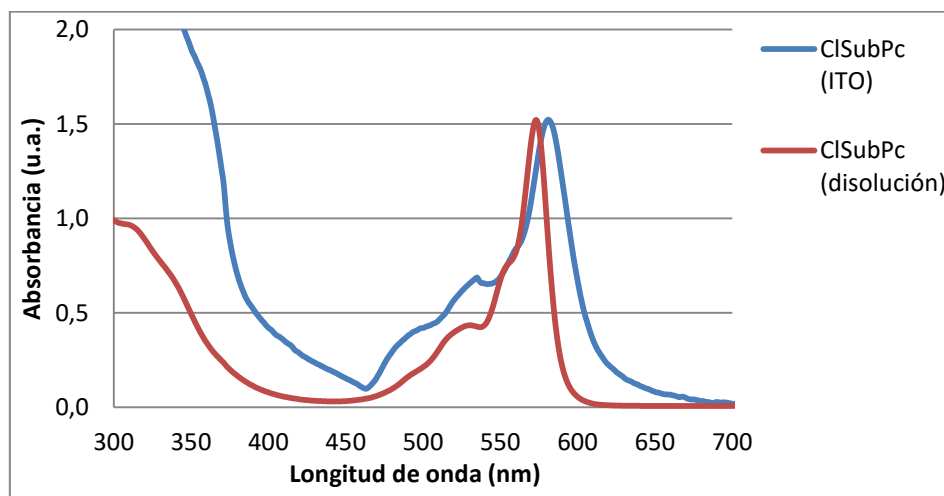


Figura 25. Espectro de absorción de CISubPc en disolución de tolueno $5 \cdot 10^{-5}$ M y CISubPc sobre ITO.

Luego en las figuras 23, 24 y 25, se puede observar cómo en todos los casos hay un ligero desplazamiento de la banda Q de las subftalocianinas depositadas en el sensor con respecto a las subftalocianinas presentes en disolución. Se puede ver que en disolución, para *t*-BuSubPc, la banda Q está a 568 nm, mientras que la misma subftalocianina depositada sobre el sensor, la banda Q está a 575 nm. Para PhOSubPc en disolución, la banda Q está a 572 nm y PhOSubPc depositada en el sensor, la banda Q está a 579 nm y finalmente, para CISubPc en disolución, la banda Q está a 573 nm, mientras que depositada en el sensor, la banda Q está a 580 nm.

Además, en todos los casos se puede observar un desplazamiento de la banda Q a mayores longitudes de onda cuando las subftalocianinas están depositadas sobre ITO con respecto a las subftalocianinas presentes en disolución.

Este desplazamiento de la banda Q, puede explicarse utilizando la teoría de excitones [35], que indica la formación de agregados de tipo J producidos por interacciones intermoleculares entre los anillos aromáticos de las subftalocianinas, lo que hace que la banda Q se desplace a mayores longitudes de onda. Este desplazamiento también puede estar relacionado con el empaquetamiento de los núcleos moleculares de las subftalocianinas en el sensor, que es mayor que en disolución.



3.2.- Comportamiento electroquímico: voltametría cíclica:

Como paso previo a la realización de los ensayos mediante voltametría cíclica para poder realizar los correspondientes estudios electroquímicos de los sensores y biosensores, se debe realizar un acondicionamiento previo del material que se describe a continuación:

Para preparar el CE, se debe limpiar la placa de platino al rojo vivo, sumergirla en H_2SO_4 concentrado, volver a calentar la placa al rojo vivo, aclarar con agua desionizada y secar. Con esto, se asegura la eliminación de cualquier posible residuo depositado sobre la placa y que pueda interferir en las mediciones.

Para el montaje de la celda, se elige una configuración que se mantiene a lo largo de los ensayos, manteniendo siempre constante la posición de los electrodos como puede ser su inclinación, distancia entre electrodos, etc. ya que puede influir en los resultados finales de la VC, y de no cuidar esta configuración de los electrodos, no sería posible la comparación entre voltamogramas. Para este trabajo, se sitúa el RE en el centro y a cada lado del RE, se sitúa el WE y el CE respectivamente.

Por último, marcar que es importante tapar con Septum todos los orificios que no se usen en la celda electroquímica para evitar la entrada de aire durante la medición, así como nunca sumergir en el medio electrolítico las pinzas del WE y CE ya que se modifican los valores de intensidad que se registren en la VC.

Las mediciones por tanto, comienzan con el análisis de la respuesta electroquímica de las subftalocianinas depositadas sobre ITO en disolución de PBS 0.01 M a pH 7, lo que permitirá conocer los picos anódicos y catódicos propios de las subftalocianinas inmersas en un medio libre de analito (caso de catecol e hidroquinona).

Estas tres respuestas se muestran en las figuras 26, 27 y 28:

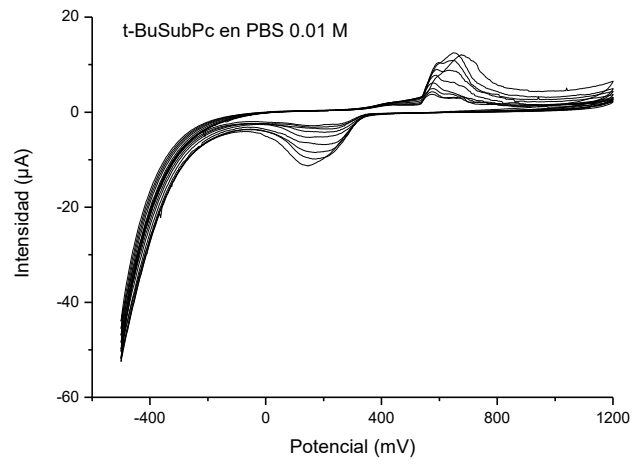


Figura 26. Voltamograma del sensor de t-BuSubPc en 40 mL de PBS 0.01 M a pH 7.

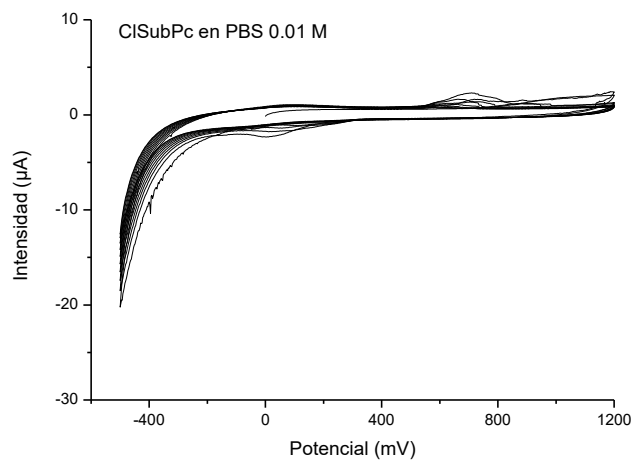


Figura 27. Voltamograma del sensor de ClSubPc en 40 mL de PBS 0.01 M a pH 7.

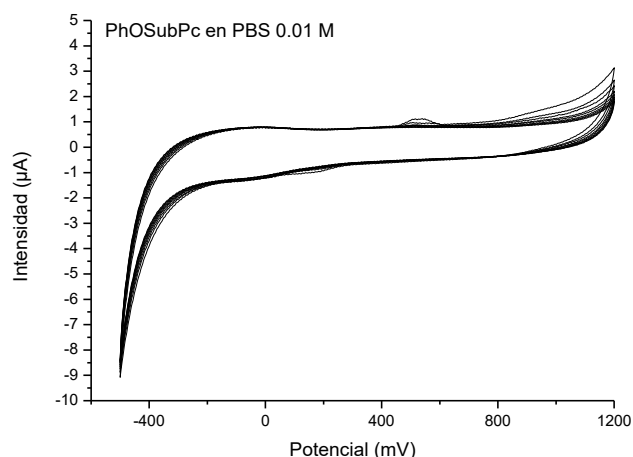


Figura 28. Voltamograma del sensor de PhOSubPc en 40 mL de PBS 0.01 M a pH 7.

Luego en los voltamogramas anteriores se pueden observar las respuestas electroquímicas de las subftalocianinas en el blanco (sin analito), que es el PBS. Los tres voltamogramas muestran picos tanto anódicos como catódicos correspondientes a un proceso de transferencia de un electrón de la subftalocianina al electrodo de trabajo. Se puede ver que la forma de los voltamogramas se rige por un proceso cuasi-reversible debido a la existencia de una separación de potencial entre el pico anódico y el pico catódico (aproximadamente de 0.5 V) lo que es típico de procesos electroquímicos presentes en películas sólidas delgadas.

Además, los valores de potencial registrados en el pico de anódico y catódico para cada subftalocianina depositada en ITO, concuerdan con el comportamiento electroquímico de las subftalocianinas en disolución [33], ya que en estos sensores los potenciales de oxidación siguen la secuencia: $t\text{-BuSubPc}$ (0.53 V) < PhOSubPc (0.55 V) < ClSubPc (0.60 V), mientras que la reducción sigue la tendencia opuesta: ClSubPc (-0.05 V) < PhOSubPc (0.05 V) < $t\text{-BuSubPc}$ (0.15 V). Como se ha comentado, esta secuencia mostrada tanto en oxidación como en reducción se repite si las subftalocianinas están en disolución. Esto resulta lógico ya que por ejemplo, considerando los casos extremos, el ClSubPc al ser un atractor de electrones, se requiere un mayor potencial para oxidarlo y el $t\text{-BuSubPc}$ al ser un dador de electrones, se requiere un mayor potencial para reducirlo. Luego este comportamiento hace que los picos redox se desplacen a distintas posiciones según la influencia dadora o aceptora de los grupos periféricos correspondientes a cada subftalocianina.

Finalmente, se puede añadir que estos voltamogramas presentan una buena repetitividad y reproducibilidad. Dichos ensayos se presentarán en el apartado '3.2.4.- Ensayos de reproducibilidad'.

A continuación, se muestra la respuesta de los sensores de ITO modificados con las distintas subftalocianinas inmersos en una disolución de catecol 10^{-4} M, obteniéndose las respuestas de la figura 29 (se muestra el último ciclo, por ser el más estable en todos los casos):

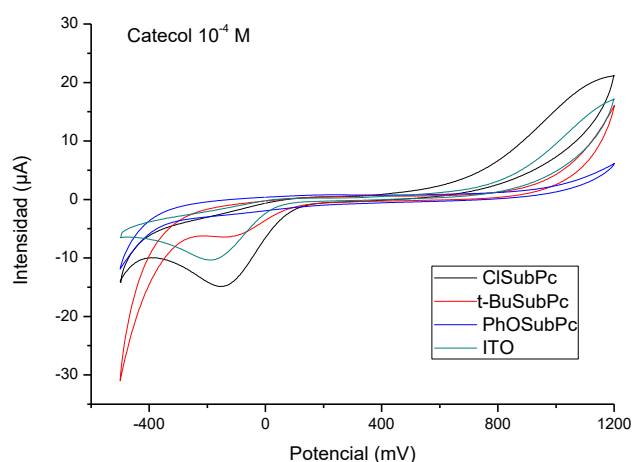


Figura 29. Voltamograma de los sensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc, PhOSubPc y t-BuSubPc y del sensor sin modificar ITO en 40 mL de catecol 10^{-4} M.

Al estar ya en un medio con analito, el proceso electroquímico propio de cada subftalocianina ya no se observa (no se ven sus picos anódicos y catódicos). Esto puede explicarse por el hecho de que el ligando situado en posición axial de la subftalocianina puede ser desplazado por los fenoles presentes en el medio electrolítico [17,36]. Por otro lado, la subftalocianina que mejor muestra el proceso de electrólisis del analito, en este caso catecol, es ClSubPc ya que las intensidades de los picos anódicos y catódicos son mayores que con respecto al sensor sin modificar de ITO.

Por tanto, el efecto electrocatalítico sólo se observa en ClSubPc, ya que en el caso de t-BuSubPc y PhOSubPc (que poseen grupos dadores de electrones), no se observa este efecto. De hecho, PhOSubPc llega a bloquear completamente la transferencia de electrones del catecol al WE. Como se verá a continuación, este comportamiento observado, es similar a cuando los electrodos se sumergen en hidroquinona tal y como se muestra en la figura 30:

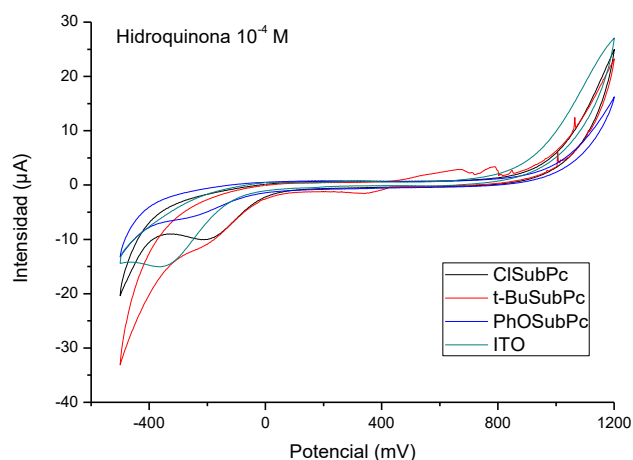


Figura 30. Voltamograma de los sensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc, PhOSubPc y t-BuSubPc y del sensor sin modificar ITO en 40 mL de hidroquinona 10^{-4} M.

Nuevamente, se puede observar que PhOSubPc llega a bloquear la transferencia de electrones de la hidroquinona al WE como ya ocurría en la detección de catecol 10^{-4} M, aunque t-BuSubPc en este caso no se comporta como bloqueante.

Como conclusión general, se puede decir que los sensores modificados con subftalocianinas, sin actuar éstas como mediadores electrónicos (como en el caso de los biosensores que se verá más adelante), no presentan grandes ventajas electrocatalíticas hacia la detección de catecol e hidroquinona con respecto al sensor sin modificar de ITO, pudiéndose comportar incluso como bloqueantes del proceso electroquímico como ocurre con PhOSubPc.

Tras un estudio previo del comportamiento electroquímico de las subftalocianinas depositadas sobre el sensor hacia la detección de catecol e hidroquinona y conocer cómo influyen los sustituyentes periféricos en el valor de los potenciales catódicos y anódicos, incrementando el potencial de oxidación cuando los sustituyentes son aceptores de electrones (cuestan más oxidarlos, caso de ClSubPc), así como incrementando el potencial de reducción cuando los sustituyentes son dadores (cuestan más reducirlos, caso de t-BuSubPc). Se va a estudiar la capacidad mediadora electrónica de las subftalocianinas cuando se encuentran en el biosensor. Luego, se calcularán los límites de detección y finalmente se realizarán los estudios de variación de la velocidad de barrido.

3.2.1.- Subftalocianinas como mediadores electrónicos en el biosensor:

Una forma de mejorar la detección de compuestos fenólicos es usando biosensores. En este trabajo se emplean fenol oxidasas (tirosinasa y lacasa) con subftalocianinas actuando como mediadores electrónicos.

La tirosinasa catalizará la oxidación de monofenoles y *p*- y *o*- difenoles a la correspondiente benzoquinona, mientras que la lacasa también catalizará la oxidación de monofenoles y *p*- y *o*- difenoles sustituidos formando radicales que se convierten en benzoquinonas en la segunda etapa de la oxidación [36].

Las propiedades mediadoras electrónicas de las subftalocianinas se evaluaron analizando la reacción electroquímica de los biosensores modificados con subftalocianinas y sin modificar en presencia de catecol e hidroquinona, respectivamente.

Como se podrá ver, las respuestas electroquímicas se caracterizaron por presentar un pico intenso en torno a -0.3 V que corresponde a la reducción enzimática electroquímica de la benzoquinona a su precursor. Al ser este pico el más relevante, todos los estudios que sucederán se centrarán en la onda catódica.

En la figura 31, se puede observar el comportamiento electroquímico de cada biosensor en presencia de catecol 10^{-4} M.

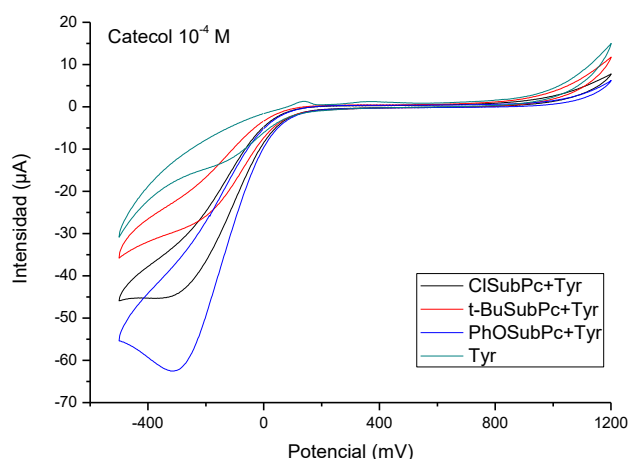


Figura 31. Voltamograma de los biosensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc-Tyr, PhOSubPc-Tyr y t-BuSubPc-Tyr y del biosensor sin modificar Tyr en 40 mL de catecol 10^{-4} M.

Se puede ver en dicha figura, que en todos los biosensores modificados con subftalocianinas, éstas actúan indudablemente como mediadores electrónicos y la intensidad de las señales asociadas con la reducción enzimática entre -0.2 V y -0.3 V aumenta claramente de acuerdo con el siguiente orden: *t*-BuSubPc-Tyr < ClSubPc-Tyr < PhOSubPc-Tyr. En esta figura, se incluye también un electrodo de control ITO con Tyr, el cual presenta el menor valor de intensidad si se compara con los biosensores modificados.

Por otro lado, el efecto mediador electrónico más fuerte se observa claramente en PhOSubPc-Tyr (pasando desde -15 μ A con un biosensor de tirosinasa sin mediador electrónico a -65 μ A usando un biosensor de tirosinasa con PhOSubPc).

De acuerdo con esto, se puede concluir que las propiedades mediadoras electrónicas no están relacionadas con las propiedades dadoras oceptoras de los sustituyentes periféricos, sino que más bien, parecen estar vinculadas a interacciones π - π debidas a los grupos fenoxi, que facilitan la interacción entre el sitio activo de la enzima, la subftalocianina y los anillos aromáticos del fenol. Se han descrito ya efectos similares en los biosensores de bisftalocianina-Tyr [8,11,37].

Como se representa en la figura 32, las propiedades mediadoras electrónicas de las subftalocianinas en biosensores modificados con lacasa y expuestas a hidroquinona fueron similares a los observados en catecol. El efecto electrocatalítico más fuerte corresponde nuevamente al biosensor de PhOSubPc-Lac, donde se ha conseguido en este caso un aumento de intensidad del 40 %.

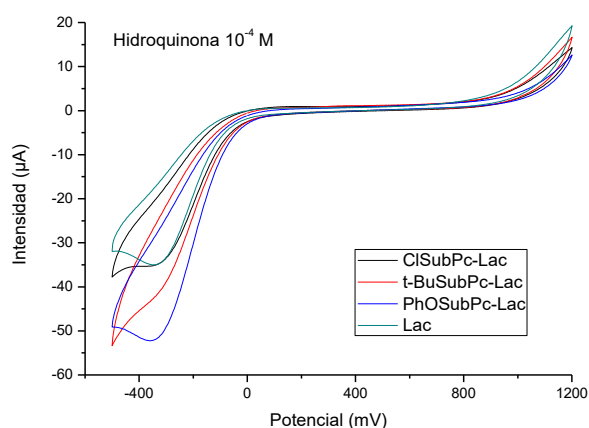


Figura 32. Voltamograma de los biosensores modificados con las subftalocianinas: ClSubPc-Lac, PhOSubPc-Lac y *t*-BuSubPc-Lac y del biosensor sin modificar Lac en 40 mL de hidroquinona 10^{-4} M.

Por último y con objeto de manifestar de modo gráfico (figura 33) la ventaja en el uso de biosensores, en este caso de tirosinasa, se muestra la comparación del sensor de PhOSubPc con respecto al biosensor de PhOSubPc-Tyr en catecol 10^{-4} M.

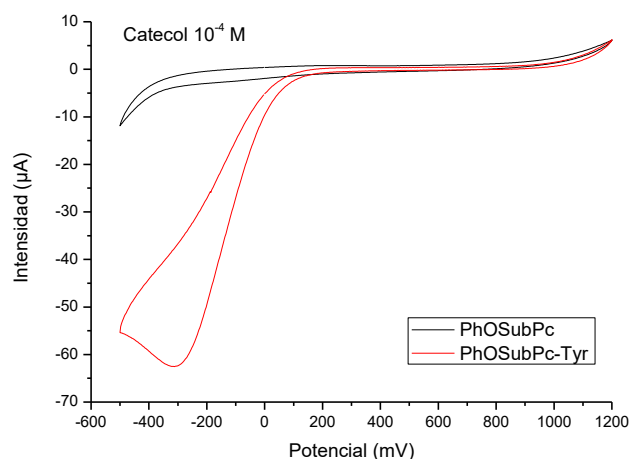


Figura 33. Voltamograma de PhOSubPc y PhOSubPc-Tyr en catecol 10^{-4} M a una velocidad de $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Como se observa, se puede concluir que las subftalocianinas actúan como mediadores electrónicos en biosensores catalizando el proceso electrolítico del catecol e hidroquinona, facilitando la recuperación de la enzima, obteniéndose grandes incrementos en los valores de intensidad, así como en la estabilidad y reproducibilidad de los ciclos.

Otro estudio que se puede llevar a cabo es el cálculo de los límites de detección para detectar la mínima concentración de analito (catecol e hidroquinona) que es capaz de detectar dichos sensores y biosensores y que se va a mostrar a continuación.

Para explicar todo el proceso que se va a desarrollar a continuación, se va a tomar como ejemplo un sensor modificado. Dicho proceso se debe de repetir de la misma manera para el resto de sensores y biosensores.



3.2.2.- Estudio de los límites de detección:

En este apartado se va a realizar el cálculo de los límites de detección de los sensores hacia catecol e hidroquinona respectivamente.

Para obtener los límites de detección, primero se debe obtener el voltamograma de la respuesta electroquímica propia de cada subftalocianina en PBS que es el blanco, ya que después se necesitarán los valores de intensidad en el blanco para los cálculos. En todos los casos se trabajará en el pico catódico por ser el que tiene una mejor respuesta.

El procedimiento consiste por tanto en ir añadiendo cantidades conocidas de disolución de catecol o hidroquinona 10^{-4} M al blanco para ir aumentando la concentración del catecol o hidroquinona en el medio electrolítico. El rango de concentraciones irá desde $5 \cdot 10^{-7}$ M a $1.8 \cdot 10^{-5}$ M.

Por otro lado, para calcular los límites de detección, también se precisa tener calculadas las concentraciones de catecol o hidroquinona 10^{-4} M que se van añadiendo al blanco con respecto a los 40 mL ya presentes en la celda electrolítica, obteniéndose los resultados de la tabla 1.

Adición nº	Volumen añadido de fenol (μ L)	Volumen final de fenol (μ L)	Concentración final (M)
1	200	200	$5.0 \cdot 10^{-7}$
2	500	700	$1.7 \cdot 10^{-6}$
3	300	1000	$2.4 \cdot 10^{-6}$
4	500	1500	$3.6 \cdot 10^{-6}$
5	500	2000	$4.8 \cdot 10^{-6}$
6	1000	3000	$7.0 \cdot 10^{-6}$
7	3000	6000	$1.3 \cdot 10^{-5}$
8	1500	7500	$1.6 \cdot 10^{-5}$
9	1500	9000	$1.8 \cdot 10^{-5}$

Tabla 1. Concentraciones de disolución de fenol seleccionadas para el estudio de los límites de detección.

Una vez establecidos los volúmenes a añadir de catecol o hidroquinona en cada adición, se comienzan las mediciones por VC. En la figura 34, se muestra el voltamograma del sensor CSubPc en las nueve adiciones que se han llevado a cabo, representados por su último ciclo, debido a que en este ciclo, el sensor es más estable. CSubPc, se toma como representativo para explicar los cálculos correspondientes y se aplicarán de la misma manera para el resto de sensores incluyendo PhOSubPc, ya que aunque se haya observado un comportamiento bloqueante, se quiere comprobar si dicho comportamiento se obtiene de igual manera modificando la concentración de analito en el medio electrolítico.

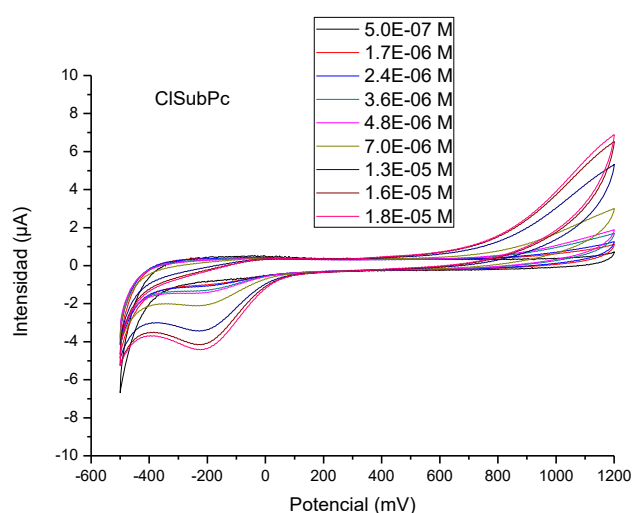


Figura 34. Voltamograma de CSubPc inmerso en catecol aumentando la concentración de $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ a $1.8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en 40 mL de PBS.

Se puede observar que al aumentar la concentración de catecol, aumenta la intensidad de los picos catódicos y anódicos (se va a trabajar en el pico catódico y el aumento de intensidad se va a observar en todos los sensores).

Para los límites de detección, se emplea, tal y como se explicó, la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3 \cdot SD}{m}$$

Ecuación 3. Límite de detección.



Siendo SD la desviación típica de la intensidad de corriente para los cinco últimos ciclos del sensor en el blanco en el pico catódico y m el valor de la pendiente de la recta de calibración intensidad frente a concentración medida en el último ciclo para el pico catódico. En el caso de CSubPc, se toma el pico catódico en torno a -0.2 V. Para calcular SD , se emplean los siguientes valores de intensidad:

Límite onda catódica del blanco (CSubPc)	
Ciclo nº	Intensidad (μA)
6	-1.37
7	-1.20
8	-1.11
9	-1.05
10	-1.02
SD	0.14

Tabla 2. Cálculo de la desviación típica de la respuesta del sensor CSubPc en PBS 0.01 M pH 7 para el estudio de los límites de detección.

La recta de calibración para las concentraciones elegidas de las adiciones de analito en el último ciclo de cada medición en CSubPc es:

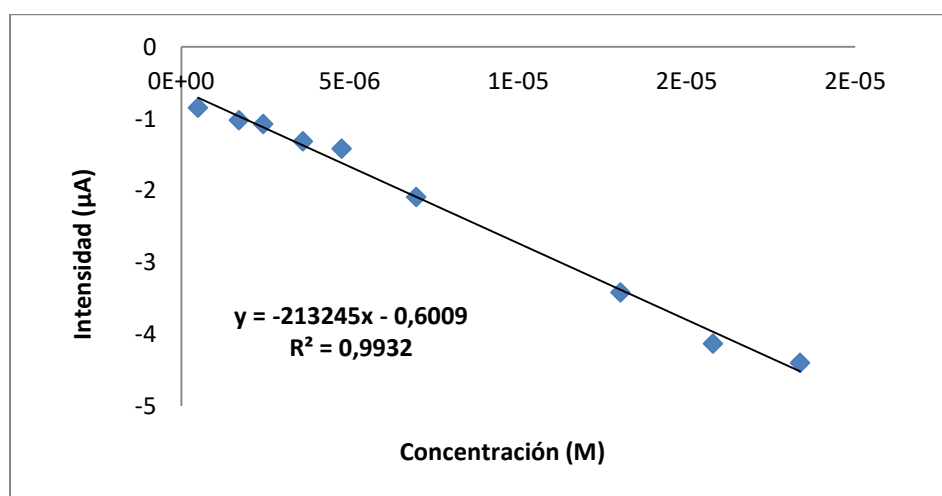


Figura 35. Ajuste lineal de la gráfica intensidad frente a concentración para el estudio del límite de detección de onda catódica del sensor CSubPc.

Luego, para el caso de CSubPc, el LD de onda catódica (en catecol) tiene un valor de $1.95 \cdot 10^{-6}$ M.

En el caso de los biosensores, si determinamos el límite de detección de onda catódica, como por ejemplo en PhOSubPc-Tyr, se puede observar la siguiente respuesta en la figura 36, donde nuevamente la intensidad de los picos catódicos y anódicos aumentan conforme aumenta la concentración de fenol en el medio, y al igual que en caso de los sensores, este comportamiento se repite en todos los biosensores empleados.

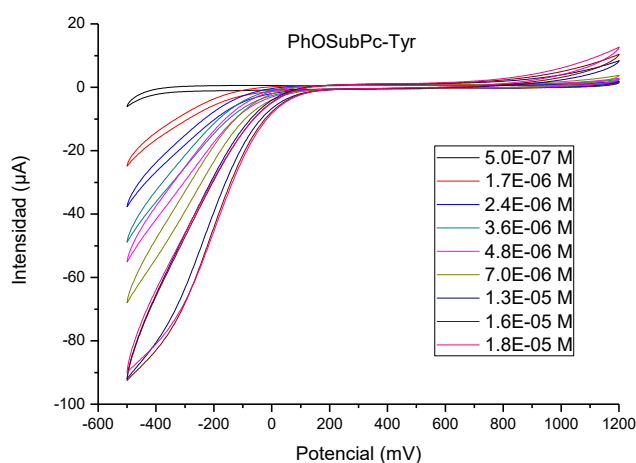


Figura 36. Voltamograma de PhOSubPc-Tyr inmerso en catecol aumentando la concentración de $5 \cdot 10^{-7}$ M a $1.8 \cdot 10^{-5}$ M en 40 mL de PBS.

La modificación en la forma del pico catódico con respecto a PhOSubPc-Tyr de la figura 31 inmerso en catecol 10^{-4} M, se debe al cambio de concentración de analito en el medio, ya que si se compara la respuesta del biosensor modificado PhOSubPc-Tyr con respecto al biosensor sin modificar Tyr (figura 37), se observa que la forma del pico catódico es similar, existiendo un desplazamiento leve de potencial del pico catódico, así como un incremento en el valor de intensidad debido a la propia mediación electrónica de la subftalocianina.

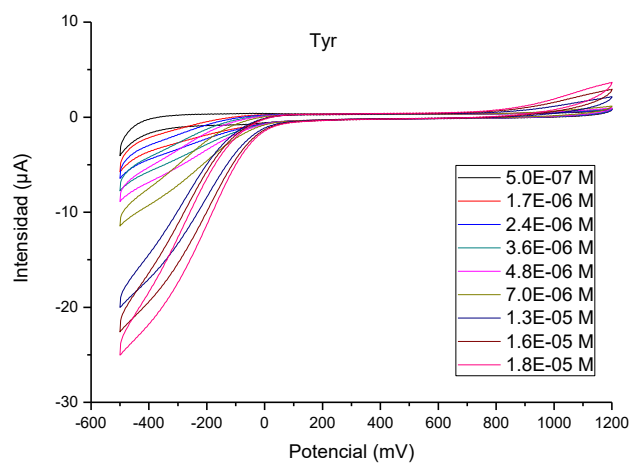


Figura 37. Voltamograma de Tyr inmerso en catecol aumentando la concentración de $5 \cdot 10^{-7} M$ a $1.8 \cdot 10^{-5} M$ en 40 mL de PBS.

En las tablas 3 y 4, se muestran los límites de detección de onda catódica calculados para todos los sensores y biosensores tanto en catecol como en hidroquinona, así como el rango lineal (intervalo de adiciones donde la representación intensidad frente a concentración se aproxima a una recta), su ajuste (R^2) y la sensibilidad del sensor (pendiente de la recta obtenida en la representación intensidad frente a concentración) que indica cómo de sensible es un sensor o biosensor en la detección del fenol en el medio electrolítico.



Catecol				
Sensor	Rango lineal (M)	I (μA) vs. C (M)		LD _{catódico} (M)
		R ²	Sensibilidad (μA/M)	
Tyr	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.998	-9·10 ⁵	2.16·10 ⁻⁶
ClSubPc-Tyr	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.989	-1·10 ⁶	7.57·10 ⁻⁷
PhOSubPc-Tyr	5·10 ⁻⁷ 4·10 ⁻⁶	0.984	-1·10 ⁷	1.01·10 ⁻⁷
t-BuSubPc-Tyr	7·10 ⁻⁶ 2·10 ⁻⁵	0.995	-5·10 ⁵	2.10·10 ⁻⁷
ClSubPc	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.993	-2·10 ⁵	1.95·10 ⁻⁶
PhOSubPc	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.984	-5·10 ⁴	1.86·10 ⁻⁶
t-BuSubPc	4·10 ⁻⁶ 2·10 ⁻⁵	0.996	-2·10 ⁵	1.29·10 ⁻⁶

Tabla 3. Límites de detección catódica, rango lineal y sensibilidad obtenidos para la detección de catecol en todos los sensores y biosensores.

Hidroquinona				
Sensor	Rango lineal (M)	I (μA) vs. C (M)		LD _{catódico} (M)
		R ²	Sensibilidad (μA/M)	
Lac	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.998	-4·10 ⁵	1.66·10 ⁻⁶
ClSubPc-Lac	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.994	-6·10 ⁵	1.69·10 ⁻⁷
PhOSubPc-Lac	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.976	-4·10 ⁵	1.55·10 ⁻⁷
t-BuSubPc-Lac	5·10 ⁻⁶ 2·10 ⁻⁵	0.999	-4·10 ⁵	4.85·10 ⁻⁷
ClSubPc	5·10 ⁻⁶ 2·10 ⁻⁵	0.997	-2·10 ⁵	1.57·10 ⁻⁶
PhOSubPc	5·10 ⁻⁷ 2·10 ⁻⁵	0.980	-2·10 ⁴	1.63·10 ⁻⁶
t-BuSubPc	4·10 ⁻⁶ 2·10 ⁻⁵	0.998	-2·10 ⁵	1.44·10 ⁻⁶

Tabla 4. Límites de detección catódica, rango lineal y sensibilidad obtenidos para la detección de hidroquinona en todos los sensores y biosensores.



En vista a la tabla 3 y tabla 4, se puede observar que los biosensores sin subftalocianina, alcanzan unos límites de detección del orden 10^{-6} M, mientras que cuando se miden biosensores modificados con subftalocianina, se hace patente el comportamiento como mediador electrónico, reduciéndose el valor de los límites de detección en un orden de magnitud hasta alcanzar un valor en torno a 10^{-7} M. Además, se puede destacar el fuerte comportamiento como mediador electrónico de la subftalocianina de grupos fenólicos presente en el biosensor de tirosinasa, alcanzándose el mínimo valor de límite de detección y la mayor sensibilidad con respecto al resto de casos estudiados.

Finalmente, se puede ver que los límites de detección del sensor con subftalocianina, se encuentran en el mismo orden de magnitud que el biosensor sin subftalocianina. Esto se debe al comportamiento poco electrocatalítico e incluso bloqueante (caso de PhOSubPc) de éstos en el proceso electrolítico del catecol y de la hidroquinona. Situación que cambia radicalmente al modificar los biosensores con las subftalocianinas, pasando a tener comportamiento como mediador electrónico y donde cuyo potencial catódico nuevamente aumenta conforme la subftalocianina posee un comportamiento dador de electrones, lo que como ya se sabe dificulta la reducción.

3.2.3.- Estudio de las velocidades de barrido:

Con el fin de obtener información sobre el mecanismo de reacción que rige el proceso electrolítico, se obtuvieron voltamogramas a velocidades de barrido crecientes desde 0.1 a 1.1 Vs^{-1} en disoluciones 10^{-4} M de catecol e hidroquinona (en PBS 0.01 M y pH 7).

Todos los cálculos de este apartado, se explicarán tomando como ejemplo el caso de *t*-BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10^{-4} M en su pico catódico, que se sitúa en torno a -0.3 V.

Para obtener la información del mecanismo que rige el proceso, primeramente, se va a emplear un método que estudia la correlaciones lineales de la respuesta de intensidad en el pico catódico frente a la velocidad de barrido y frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, para determinar cuál es el mecanismo limitante, si se debe a la transferencia de electrones del analito al WE o a la difusión de iones del analito a la superficie del WE respectivamente. Para ello se hace necesario registrar la intensidad correspondiente al pico catódico del catecol o hidroquinona en su mayor valor, que será en el ciclo décimo (último ciclo) de cada velocidad de barrido, así como calcular la raíz cuadrada de cada velocidad de barrido para realizar dos representaciones gráficas.

En la figura 38, se puede ver en el voltamograma, cómo el pico catódico correspondiente a reducción de la hidroquinona, aumenta su intensidad conforme aumenta la velocidad de barrido y los potenciales se desplazan a valores más negativos. Este comportamiento, ocurrirá de igual manera en el resto de biosensores estudiados.

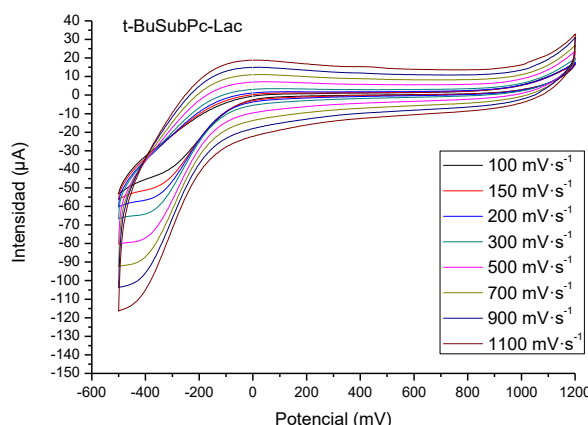


Figura 38. Voltamograma del biosensor *t-BuSubPc-Lac* inmerso en 40 mL de hidroquinona 10^{-4} M a distintas velocidades de barrido.

En la tabla 5, se muestran los valores de intensidad catódicos registrados en el último ciclo para cada velocidad de barrido:

Velocidad ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)	Velocidad ^{1/2} ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) ^{1/2}	Intensidad (μA)
25	5.00	-42.41
50	7.07	-49.53
75	8.67	-55.15
100	10.00	-63.39
125	11.18	-77.58
150	12.25	-89.84
175	13.23	-101.29
200	14.14	-113.89

Tabla 5. Valores obtenidos de las intensidades catódicas correspondientes a cada velocidad de barrido del biosensor *t-BuSubPc-Lac* inmerso en hidroquinona 10^{-4} M.

Luego, a partir de los valores de la tabla 5, se establecen las dos representaciones gráficas comentadas anteriormente de intensidad frente a velocidad de barrido e intensidad frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido:

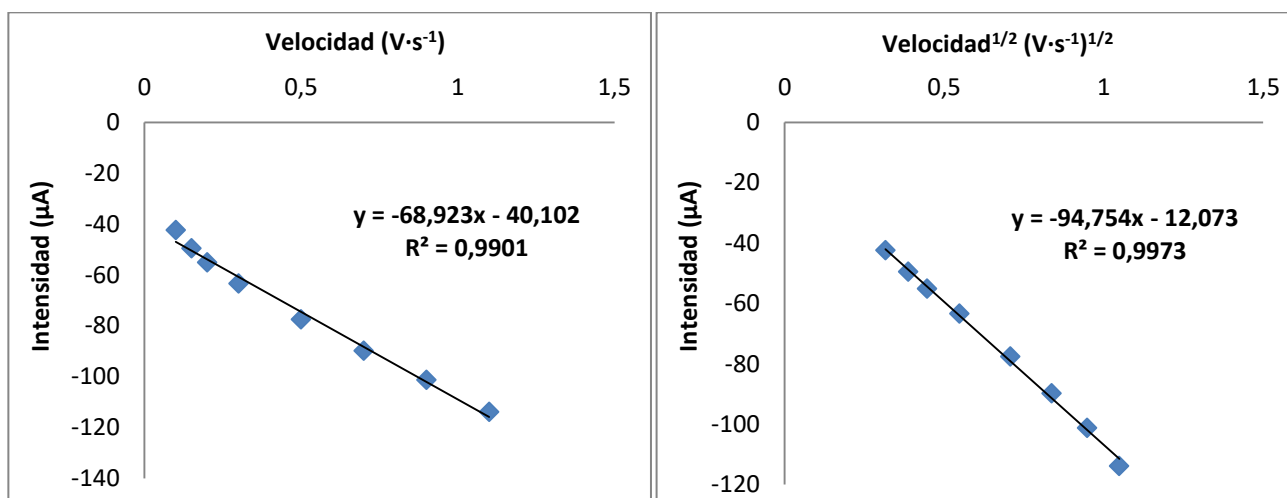


Figura 39. Representaciones de izquierda a derecha: intensidad frente a la velocidad de barrido e intensidad frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, para el pico catódico del biosensor *t*-BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10^{-4} M.

En vista a ambas gráficas, se puede observar una relación lineal entre la intensidad del pico catódico y la velocidad de barrido, así como una relación lineal entre la intensidad del pico catódico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. La primera representación (figura 39, izquierda) indica la existencia de una etapa limitante de transferencia de electrones del analito al WE según la ecuación de Laviron ($I \propto v$) [38], mientras que la segunda representación gráfica (figura 39, derecha) indica la existencia de una etapa limitante en la difusión de iones del analito hasta la superficie del WE, siendo un proceso Nernstiano y cumpliéndose la ecuación de Randles-Sevcik ($I \propto v^{1/2}$) [38].

Luego en la figura 39, se observa que ambas gráficas presentan un elevado ajuste lineal, por lo que éste método para este caso de sensores y biosensores desarrollados, no permite discriminar entre las etapas de transferencia de electrones y de difusión de iones para concluir cuál es la etapa limitante del proceso, luego se hace necesario trabajar con otro método que muestre de forma más clara cuál es la etapa limitante del mecanismo de reacción electroquímico.

Así que el siguiente método a emplear consiste en una representación gráfica de la $I/(v^{1/2})$ frente a la velocidad de barrido (figura 40). Este método, al igual que el anterior, también permite distinguir entre los diferentes mecanismos que suceden en el WE [39]. Si un proceso es controlado por la difusión de iones del analito al electrodo de trabajo, la función $I/(v^{1/2})$ será independiente de la velocidad de barrido. En contraste, si el proceso está controlado por la transferencia de electrones, la función $I/(v^{1/2})$ aumentará conforme aumente la velocidad de barrido.

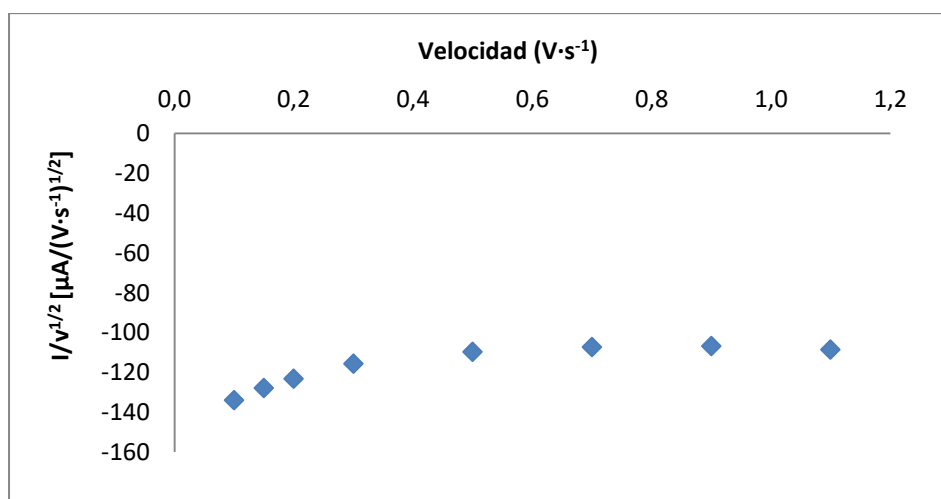


Figura 40. Representación de $I/(v^{1/2})$ frente a velocidad de barrido para el pico catódico del biosensor *t*-BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10^{-4} M.

En vista a la figura 40, se puede observar que a velocidades de barrido inferiores a $0.20 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$, la relación $I/(v^{1/2})$ aumenta linealmente con la velocidad de barrido, pero a velocidades superiores de $0.20 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$, existe una independencia con la velocidad de barrido. Este comportamiento también se observa en el resto de biosensores medidos. Este método ya permite que se pueda concluir que los procesos electroquímicos observados en los biosensores de SubPcs, están controlados por transferencia de electrones a bajas velocidades y por difusión de iones a altas velocidades.

Uno de los retos más importantes del trabajo en el grupo UVaSens, es sin duda elucidar el mecanismo de reacción y en concreto obtener la máxima información posible sobre la etapa de transferencia de electrones del analito al WE, esto hace que se profundice en su estudio, por lo que a partir de ahora se va a trabajar en la zona situada a velocidades inferiores de $0.2 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ donde se cumplirá, como ya se indicó, la ecuación de Lavirón y cuya expresión es la siguiente:

$$E_c = E^0 - \frac{2.3 \cdot R \cdot T}{\alpha \cdot n \cdot F} \cdot \log v$$

Ecuación 4. Ecuación de Lavirón.

donde: E_c potencial catódico, E^0 constante del potencial de equilibrio, α coeficiente de transferencia de carga, v velocidad de barrido ($V \cdot s^{-1}$), n número de electrones del proceso redox, R constante de los gases ideales ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T temperatura (298 K) y F constante de Faraday ($95484.56 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Como la etapa de interés en este caso es la transferencia de electrones del analito al WE, resulta lógico que se pretenda determinar el número de electrones (n) que se transfieren en el proceso. Para ello, se realizan los siguientes pasos que se explican a continuación:

Primero: con la ecuación de Lavirón (ecuación 4) se puede obtener $\alpha \cdot n$ para obtener dicho valor de $\alpha \cdot n$ se puede sustituir en la ecuación de Lavirón (en forma despejada, ecuación 5), el valor de la pendiente (m) de la gráfica que se muestra en la figura 41. Como el resto de datos son conocidos (R , T , F), se obtiene $\alpha \cdot n$ de la ecuación:

$$m = \frac{E_c - E_0}{\log v} = -\frac{2.3 \cdot R \cdot T}{\alpha \cdot n \cdot F}$$

Ecuación 5. Obtención de $\alpha \cdot n$ de la ecuación de Lavirón.

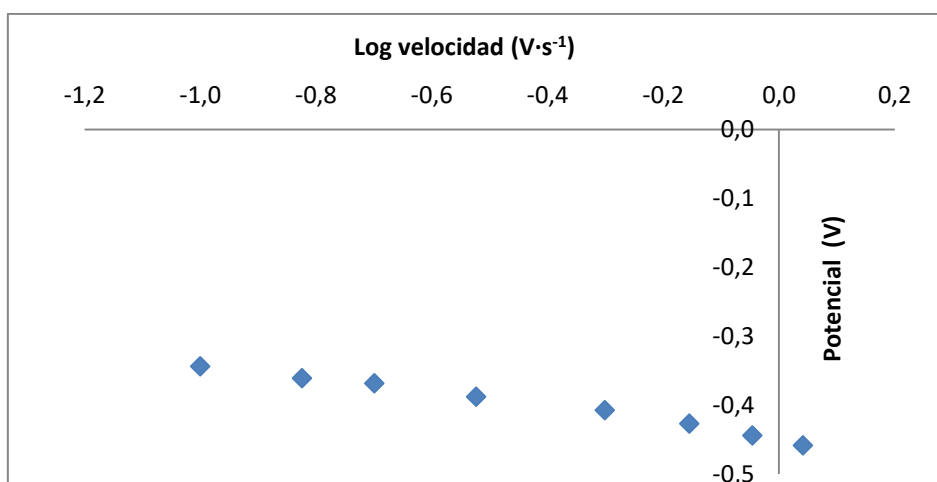


Figura 41. Representación del logaritmo de la velocidad frente al potencial para calcular $\alpha \cdot n$ de la ecuación de Lavirón.

Segundo: una vez obtenido $\alpha \cdot n$, con la ecuación de Butler-Volmer (ecuación 6) se puede obtener α :

$$\log I = \log I_0 - \frac{\alpha \cdot F}{2.3 \cdot R \cdot T} \cdot \eta$$

Ecuación 6. Ecuación de Butler-Volmer.

Para obtener el valor de α , se hace preciso representar la gráfica Tafel, que relaciona la velocidad de barrido con el sobrepotencial (η) que es la diferencia entre el potencial medido y el valor 0.054 V. La pendiente (m) de dicha gráfica, se empleará en la ecuación Butler-Volmer (ecuación 5) para así obtener α . Una vez que se obtiene α , con el valor de $\alpha \cdot n$ calculado de Lavirón, se obtiene n [40,41].

La gráfica Tafel (figura 42), representa por tanto el logaritmo de la intensidad frente al sobrepotencial (η) procedente de un voltamograma a 0.2 Vs⁻¹ (región de transferencia de electrones), y donde los valores de potencial escogidos deberán cumplir la condición de que su valor sea $> | 118 |$ mV. Para estos valores de potencial escogidos, se registrará su correspondiente valor de intensidad como se muestra en la figura 42 [41]:

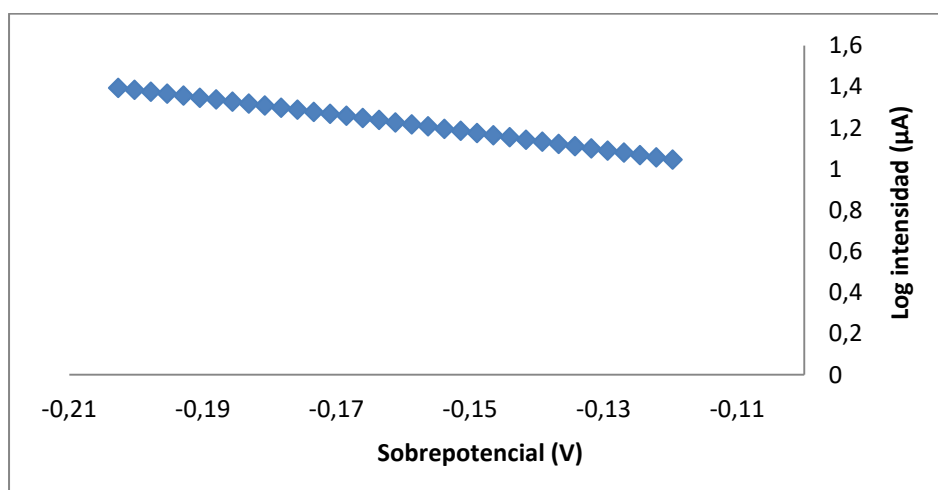


Figura 42. Gráfica Tafel: logaritmo de la intensidad frente al sobrepotencial para t-BuSubPc-Lac inmerso en hidroquinona 10⁻⁴ M.



Por tanto, con la pendiente (m) obtenida y usando la ecuación de Butler-Volmer (en forma despejada, ecuación 7), se obtiene α para que finalmente con los valores de $\alpha \cdot n$ de Lavirón, se obtenga el número de electrones involucrados en el proceso:

$$m = \frac{\log I}{\eta} - \frac{\alpha \cdot F}{2.3 \cdot R \cdot T}$$

Ecuación 7. Obtención de α de la ecuación de Butler-Volmer.

Todos los pasos explicados arriba, se aplicaron a todos los biosensores medidos tanto en catecol como en hidroquinona obteniéndose el siguiente resumen en las tablas 6 y 7 y que se muestran a continuación:

Catecol								
Biosensor	I (μA) vs. $v^{1/2}$ (Vs^{-1}) ^{1/2}		E _c (V) vs. Log v (Vs^{-1})			Log I (μA) vs. η (V)		
	m	R ²	m	R ²	$\alpha \cdot n$	m	R ²	n
ClSubPc-Tyr	-43.52	0.994	-0.15	0.999	0.40	-2.64	0.999	2.00
t-BuSubPc-Tyr	-39.97	0.983	-0.10	0.996	0.59	-4.17	0.999	2.40
PhOSubPc-Tyr	-47.78	0.914	-0.18	0.963	0.34	-2.53	0.995	2.24

Tabla 6. Relación con la velocidad de barrido en biosensores inmersos en catecol 10^{-4} M, calculado en el pico catódico.

Hidroquinona								
Biosensor	I (μA) vs. $v^{1/2}$ (Vs^{-1}) ^{1/2}		E _c (V) vs. Log v (Vs^{-1})			Log I (μA) vs. η (V)		
	m	R ²	m	R ²	$\alpha \cdot n$	m	R ²	n
ClSubPc-Lac	-81.46	0.998	-0.12	0.953	0.48	-3.56	0.984	2.19
t-BuSubPc-Lac	-94.75	0.997	-0.11	0.986	0.57	-4.21	0.999	2.28
PhOSubPc-Lac	-109.55	0.999	-0.13	0.983	0.46	-3.37	0.984	2.42

Tabla 7. Relación con la velocidad de barrido en biosensores inmersos en hidroquinona 10^{-4} M, calculado en el pico catódico.

A la vista de los resultados, podemos observar que los valores $\alpha \cdot n$ se encuentran entre 0.3 y 0.6, los cuales son comparables a otras subftalocianinas [8,12,37], y el número de electrones está en todos los casos cercano a 2, lo que concuerda con el mecanismo de oxidación-reducción del catecol e hidroquinona:

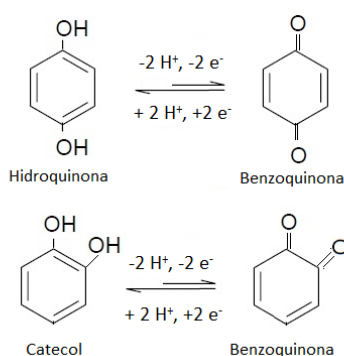


Figura 43. Proceso de oxidación-reducción del catecol y de la hidroquinona.

Para finalizar el estudio de las velocidades de barrido, se puede estimar además la concentración superficial de los materiales sensibles (Γ_c) que en este caso serán las enzimas (tirosinasa y lacasa) y las subftalocianinas [42]. Este dato indica la concentración de material sensible que está expuesto en el sensor para interactuar con el analito del medio.

Este valor se puede estimar a partir de la pendiente (m) obtenida de representar la intensidad de corriente en el último ciclo del voltamograma frente a la velocidad de barrido (figura 39, izquierda, para el ejemplo mostrado). Despejando dicha pendiente en la ecuación 8, sustituyendo el valor de la pendiente obtenido gráficamente e introduciendo el resto de valores, todos ellos conocidos (incluido el n calculado anteriormente) en la ecuación 8. Se puede obtener una estimación de la concentración superficial de los materiales sensibles para cada biosensor inmerso tanto en catecol como en hidroquinona.

$$I = \frac{n^2 \cdot F^2 \cdot v \cdot A \cdot \Gamma_c}{4 \cdot R \cdot T}$$

Ecuación 8. Ecuación para obtener la concentración superficial de los materiales sensibles.

donde: A área superficial del electrodo modificado sumergido (1 cm² estimado).



Biosensor	Γ_c (mol·cm ⁻²)	Biosensor	Γ_c (mol·cm ⁻²)
Tyr	4.26·10 ⁻⁶	Lac	9.80·10 ⁻⁶
CISubPc-Tyr	4.39·10 ⁻⁶	CISubPc-Lac	1.08·10 ⁻⁵
t-BuSubPc-Tyr	5.41·10 ⁻⁶	t-BuSubPc-Lac	1.41·10 ⁻⁵
PhOSubPc-Tyr	7.56·10 ⁻⁶	PhOSubPc-Lac	1.75·10 ⁻⁵

Tabla 8. Concentración superficial de los materiales sensibles en el electrodo de trabajo.

Como puede verse en la tabla 8, al modificar el biosensor con subftalocianina, la concentración de los materiales sensibles aumenta, lo que resulta lógico, Dicho valor aumenta principalmente en el biosensor modificado con PhOSubPc, generando más superficie lábil en el biosensor para interaccionar con el analito. Este resultado concuerda con el comportamiento electroquímico mostrado anteriormente, ya que el biosensor que mayor efecto electrocatalítico poseía, era el de PhOSubPc.

3.2.4.- Ensayos de reproducibilidad:

Para los ensayos de reproducibilidad, se trabaja con los biosensores modificados inmersos en catecol o hidroquinona 10⁻⁴ M, usando una velocidad de barrido de 0.1 Vs⁻¹.

En todos los casos medidos mediante CV, el primer ciclo de los diez que se realizan, es diferente al resto de ciclos y siempre es un ciclo que se descarta en todos los estudios a realizar. El resto de ciclos ya se asemejan, reflejándose una alta reproducibilidad, aunque aparece una ligera disminución de la intensidad conforme aumenta el número de ciclos. Esta disminución puede deberse a una deposición de residuos superficiales debido al producto de reacción.

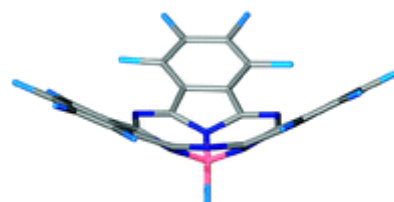
En la tabla 9, se muestra un resumen de los coeficientes de variación y de las desviaciones estándar (SD) de cada tipo de biosensor modificado en su pico catódico.



Catecol			
	CISubPc-Tyr	PhOSubPc-Tyr	t-BuSubPc-Tyr
SD	0.29	3.15	0.24
Coef. de variación (%)	0.64	4.58	0.91
Hidroquinona			
	CISubPc-Lac	PhOSubPc-Lac	t-BuSubPc-Lac
SD	0.45	1.04	0.24
Coef. de variación (%)	1.37	2.05	0.64

Tabla 9. Desviación estándar (SD) y coeficientes de variación en tanto por ciento, de los biosensores modificados inmersos en catecol e hidroquinona 10^{-4} M.

Como se observa, para los biosensores modificados con CISubPc y t-BuSubPc, se logra un coeficiente de variación menor del 2 % en catecol e hidroquinona, y menor del 5 % en los biosensores modificados con PhOSubPc.



Chapter 3. Conclusions

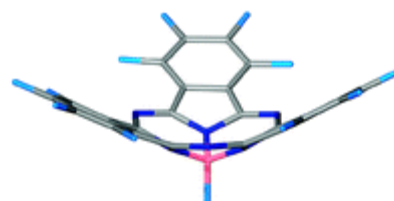




CONCLUSIONS

- 1) Hexa-chloro boron subphthalocyanine (ClSubPc), tri-*tert*-butyl boron subphthalocyanine (*t*-BuSubPc) and hexa-phenoxy boron subphthalocyanine (PhOSubPc) have been shown excellent electronic mediator properties towards phenol oxidases, promoting the transfer of electrons between oxidase and working electrode, besides facilitate the enzyme recovery.
- 2) Electronic mediator behavior could be related with π - π interactions between the subphthalocyanines and the active sites of the enzymes, similar to those already described between phthalocyanines and phenol oxidases.
- 3) Voltammetric electrochemical biosensors have been developed modifying conductive glasses with subphthalocyanines, these biosensors being able to detect catechol and hydroquinone. Biosensors have been shown:
 - a. Good electrocatalytic behavior.
 - b. High reproducibility, repeatability and stability.
 - c. Low limits of detection towards catechol and hydroquinone, at 10^{-7} M, with high sensitivity.
- 4) Depending on the peripheral group of the subphthalocyanine, the anodic and cathodic potentials move to a greater or lesser value depending on the donor or acceptor character of the peripheral groups.
- 5) Scan rate studies, have been confirmed the different behavior according to scan rate. At low scan rate ($< 0.2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$), dominates the electron transfer from phenol to working electrode and at high scan rate ($> 0.2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$), the process is governed by ion diffusion from phenol to working electrode.





Capítulo 4. Referencias



- [1] G.L. Hornyak, H.F. Tibbals, J. Dutta, J.J. Moore, *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*, CRC Press, 2008.
- [2] S.M. Lindsay, *Introduction to nanoscience*, Oxford University Press, 2010.
- [3] C.G. Claessens, D. Gonzalez-Rodriguez, M.S. Rodriguez-Morgade, A. Medina, T. Torres, Subphthalocyanines, Subporphyrazines, and Subporphyrins: Singular Nonplanar Aromatic Systems, *Chem. Rev.* 114 (2014) 2192–2277. doi:10.1021/cr400088w.
- [4] G. de la Torre, P. Vazquez, F. Agullo-Lopez, T. Torres, Role of Structural Factors in the Nonlinear Optical Properties of Phthalocyanines and Related Compounds, (2004). doi:10.1021/CR030206T.
- [5] A. Hassan, T. Basova, S. Tuncel, F. Yuksel, A.G. Gerek, V. Ahsen, Phthalocyanine films as active layers of optical sensors for pentachlorophenol and simazine detection, *Procedia Eng.* 25 (2011) 272–275. doi:10.1016/j.proeng.2011.12.067.
- [6] N. V. Tkachenko, A. Efimov, H. Lemmetyinen, Covalent phthalocyanine-fullerene dyads: synthesis, electron transfer in solutions and molecular films, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 15 (2011) 780–790. doi:10.1142/S1088424611003732.
- [7] N.B. McKeown, *Phthalocyanine materials : synthesis, structure, and function*, Cambridge University Press, 1998.
- [8] C. Medina-Plaza, L.N. Furini, C.J.L. Constantino, J.A. De Saja, M.L. Rodriguez-Mendez, Synergistic electrocatalytic effect of nanostructured mixed films formed by functionalised gold nanoparticles and bisphthalocyanines, (2014).
- [9] E.G.R. Fernandes, L.C. Brazaca, M.L. Rodriguez-Mendez, J.A. de Saja, V. Zucolotto, Immobilization of lutetium bisphthalocyanine in nanostructured biomimetic sensors using the LbL technique for phenol detection, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4715–4719. doi:10.1016/j.bios.2011.05.032.
- [10] J.H. Zagal, S. Griveau, J.F. Silva, T. Nyokong, F. Bedioui, Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions, *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 2755–2791. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.001.
- [11] M.L. Rodriguez-Mendez, M. Gay, J.A. de Saja, New insights into sensors based on radical bisphthalocyanines, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 13 (2009) 1159–1167. doi:10.1142/S1088424609001509.
- [12] C. Apetrei, P. Alessio, C.J.L. Constantino, J.A. de Saja, M.L. Rodriguez-Mendez, F.J. Pavinatto, E.G.R. Fernandes, V. Zucolotto, O.N. Oliveira, Biomimetic biosensor based on lipidic layers containing tyrosinase and lutetium bisphthalocyanine for the detection of antioxidants, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2513–2519. doi:10.1016/j.bios.2010.10.047.
- [13] H. Yin, Y. Zhou, S. Ai, Preparation and characteristic of cobalt phthalocyanine modified carbon paste electrode for bisphenol A detection, *J. Electroanal. Chem.* 626 (2009) 80–88. doi:10.1016/j.jelechem.2008.11.004.
- [14] H. Yin, Y. Zhou, J. Xu, S. Ai, L. Cui, L. Zhu, Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A, *Anal. Chim. Acta.* 659 (2010) 144–150. doi:10.1016/j.aca.2009.11.051.



- [15] T. V. Dubinina, M.M. Osipova, A. V. Zasedatelev, V.I. Krasovskii, N.E. Borisova, S.A. Trashin, L.G. Tomilova, N.S. Zefirov, Synthesis, optical and electrochemical properties of novel phenyl- and phenoxy-substituted subphthalocyanines, *Dye. Pigment.* 128 (2016) 141–148. doi:10.1016/j.dyepig.2016.01.023.
- [16] S. V Kudrevich, S. Gilbert, J.E. Van Lier, Syntheses of Trisulfonated Phthalocyanines and Their Derivatives Using Boron(III) Subphthalocyanines as Intermediates, (1996).
- [17] B. del Rey, T. Torres, Synthesis of Highly Conjugated Boron (III) Subphthalocyanines, *Tetrahedron Lett.* 38 (1997) 5351–5354.
- [18] C.A.G. Vidal, Chemical sensors, biosensors and thick-film technology, *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 225–231. doi:10.1016/0165-9936(95)91375-3.
- [19] F. Karim, A.N.M. Fakhruddin, Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review, *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.* 11 (2012) 261–274. doi:10.1007/s11157-012-9268-9.
- [20] A. Eremenko, A. Makower, W. Jin, P. Rüger, F. Scheller, Biosensor based on an enzyme modified electrode for highly-sensitive measurement of polyphenols., *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 717–22.
- [21] A. Gutes, F. Cespedes, S. Alegret, M. del Valle, Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1668–1673. doi:10.1016/j.bios.2004.07.026.
- [22] J. Cabaj, A. Jedrychowska, A. Swist, J. Soloduch, Tyrosinase Biosensor for Antioxidants Based on Semiconducting Polymer Support, *Electroanalysis.* 28 (2016) 1383–1390. doi:10.1002/elan.201500523.
- [23] E. Ochiai, *Química bioinorgánica : una introducción*, Reverte, 1985.
- [24] C. Apetrei, M.L. Rodríguez-Mendez, J.A. de Saja, Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds, *Electrochim. Acta.* 56 (2011) 8919–8925. doi:10.1016/j.electacta.2011.07.127.
- [25] J. Cabaj, J. Soloduch, Nano-Sized Elements in Electrochemical Biosensors, *Mater. Sci. Appl. Nano-Sized Elem. Electrochem. Biosensors. Mater. Sci. Appl.* 5 (2014) 752–766. doi:10.4236/msa.2014.510076.
- [26] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.* 60 (1983) 702. doi:10.1021/ed060p702.
- [27] V. Parra, A. Arrieta, J.A. Fernandez-Escudero, H. Garcia, C. Apetrei, M.L. Rodríguez-Mendez, J.A. de Saja, E-tongue based on a hybrid array of voltammetric sensors based on phthalocyanines, perylene derivatives and conducting polymers: Discrimination capability towards red wines elaborated with different varieties of grapes, *Sensors Actuators B Chem.* 115 (2006) 54–61. doi:10.1016/j.snb.2005.08.040.
- [28] M.L. Rodríguez-Mendez, V. Parra, C. Apetrei, S. Villanueva, M. Gay, N. Prieto, J. Martinez, J.A. de Saja, Electronic tongue based on voltammetric electrodes modified with materials showing complementary electroactive properties. Applications, *Microchim. Acta.* 163 (2008) 23–31. doi:10.1007/s00604-007-0907-8.



- [29] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sci.* 74 (2004) 2157–2184. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.047.
- [30] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933–956. doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- [31] M. Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral., M. Miguel, A. Aleixandre, *Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral.*, Jarpyo Editores, 2012.
- [32] S.M.S. Chauhan, P. Kumari, Synthesis of unsymmetrical benzoporphyrines in functional ionic liquids and formation of self-aggregates of zinc(II) pyridino[3,4]tribenzoporphyrines in solutions, *Tetrahedron.* 65 (2009) 2518–2524. doi:10.1016/j.tet.2009.01.046.
- [33] C. G. Claessens, D. Gonzalez-Rodriguez, T. Torres, *Subphthalocyanines: Singular Nonplanar Aromatic Compounds Synthesis, Reactivity, and Physical Properties*, (2002). doi:10.1021/CR0101454.
- [34] N. Kobayashi, T. Ishizaki, K. Ishii, H. Konami, Synthesis, Spectroscopy, and Molecular Orbital Calculations of Subazaporphyrins, Subphthalocyanines, Subnaphthalocyanines, and Compounds Derived Therefrom by Ring Expansion1, (1999). doi:10.1021/JA983325C.
- [35] V. V. Egorov, Theory of the J-band: From the Frenkel exciton to charge transfer, *Phys. Procedia.* 2 (2009) 223–326. doi:10.1016/j.phpro.2009.07.014.
- [36] A.Y. Tolbin, L.G. Tomilova, Subphthalocyanines and their analogues: methods for the synthesis and structure modification, *Russ. Chem. Rev.* 80 (2011) 531–551. doi:10.1070/RC2011v080n06ABEH004198.
- [37] F. Matemadombo, C. Apetrei, T. Nyokong, M.L. Rodriguez-Mendez, J.A. de Saja, Comparison of carbon screen-printed and disk electrodes in the detection of antioxidants using CoPc derivatives, *Sensors Actuators B Chem.* 166–167 (2012) 457–466. doi:10.1016/j.snb.2012.02.088.
- [38] C. Medina-Plaza, C. Garcia-Cabezón, C. Garcia-Hernandez, C. Bramorski, Y. Blanco-Val, F. Martín-Pedrosa, T. Kawai, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Mendez, Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir Blodgett films based on functionalized nanoparticles, *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015) 572–578. doi:10.1016/j.aca.2014.10.046.
- [39] Q. Li, X. Liu, Polarographic behaviour of antiepilepsirine and its application, *Anal. Chim. Acta.* 258 (1992) 171–175. doi:10.1016/0003-2670(92)85211-N.
- [40] A. Bard, L. Faulkner, *Fundamentals and applications*, *Electrochem. Methods.* (2001).
- [41] J. Zhang, J. Xu, Y. Wen, Z. Wang, H. Zhang, W. Ding, Voltammetric determination of phytoinhibitor maleic hydrazide using PEDOT:PSS composite electrode, *J. Electroanal. Chem.* 751 (2015) 65–74. doi:10.1016/j.jelechem.2015.05.032.
- [42] P. Rahimi, H.-A. Rafiee-Pour, H. Ghourchian, P. Norouzi, M.R. Ganjali, Ionic-liquid/NH₂-MWCNTs as a highly sensitive nano-composite for catalase direct electrochemistry, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1301–1306. doi:10.1016/j.bios.2009.10.020.

