



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

**Sensores y biosensores
nanoestructurados basados en
nanoarcilla para la detección de catecol**

Autora:

Izcara Sanz, Isabel

Tutoras:

**Rodríguez Méndez, María Luz
García Hernández, Celia**

**Departamento de Química Física y
Química Inorgánica**

Valladolid, Julio 2019.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera aprovechar la oportunidad para agradecer a todos aquellos que han permitido que este proyecto sea posible.

En primer lugar, a la profesora María Luz Rodríguez Méndez, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi TFG en su equipo de investigación, enseñándome en qué consiste este mundo y haciendo de este trabajo un atractivo aprendizaje.

También me gustaría dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, que me han acogido y ayudado siempre que lo he necesitado haciendo que estos meses de trabajo haya sido un proceso agradable y me haya sentido una compañera más. Pero especialmente, quiero agradecer a Celia por enseñarme con todo su cariño, por su paciencia, su atención y sobre todo por su interés y dedicación. Espero que tengas una vida llena de éxitos, te lo mereces.

Por otro lado, quiero agradecer a mis amigas de clase Raquel, Fani, Iria e Iciar, que han sido un apoyo enorme en épocas de máxima desesperación, sobre todo Iciar que tenía la mala suerte de aguantarme también en casa. Os deseo lo mejor en vuestra recta final, pronto todas seremos ingenieras. También quiero agradecer a todas mis amigas de Aranda, Valladolid y Baños por darme ánimos y apoyarme siempre que lo he necesitado.

A mi compañero de viaje, Pablo, que ha sido mi gran apoyo diario en los momentos más difíciles, y que me ha enseñado que la vida es mejor compartirla.

Por último, quiero dar las gracias a las personas que han hecho posible que pueda estar presentando este trabajo, mi familia. Gracias a mis padres por su esfuerzo y trabajo constante que han realizado durante toda su vida para que yo haya podido forjarme como persona y darme una educación completa. Para mí, sois el mejor ejemplo a seguir. A mi hermana, que siempre está a mi lado para darme el consejo que necesito, espero verte triunfar como te mereces. Os quiero mucho.

Muchas gracias.



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xv
LISTA DE ECUACIONES.....	xvii
CAPÍTULO 1: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. FUNDAMENTOS DE LA ELECTROQUÍMICA	3
2.1.1. Clasificación de los sensores	4
2.1.2. Sensores electroquímicos	5
2.1.3. Técnicas electroquímicas de análisis.....	6
2.1.3.1. Potenciometría.....	6
2.1.3.2. Amperometría	7
2.1.3.3. Impedimetría	8
2.1.3.4. Voltametría	9
2.1.4. Detección analítica mediante técnicas electroquímicas	15
2.2. TÉCNICAS PARA LA PREPARACIÓN DE SENSORES NANOESTRUCTURADOS.....	17
2.2.1. Drop-Casting.....	17
2.2.2. Spin-Coating	18
2.2.3. Electrodeposición.....	19
2.2.4. Langmuir-Blodgett	19
2.2.5. Self Assembled Monolayers (SAMs)	21
2.2.6. Layer by Layer (LbL).....	22
2.3. MATERIALES DE INTERÉS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE SENSORES NANOESTRUCTURADOS	23
2.3.1. Sensores basados en ftalocianina	24
2.3.2. Nanoarcillas y su aplicación en los sensores electroquímicos ..	28
2.3.3. Sensores electroquímicos basados en enzimas: biosensores.....	32



2.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS.....	36
2.4.1. Espectroscopía UV-Vis.....	36
2.4.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) .	37
CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	41
3.1. REACTIVOS Y MATERIALES	41
3.1.1. Reactivos.....	41
3.1.2. Materiales	42
3.2. EQUIPOS	42
3.3. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	42
3.3.1. Preparación de las disoluciones necesarias para el multiensamblado del sensor	43
3.3.2. Preparación de sensores nanoestructurados mediante la técnica Layer by Layer.....	45
3.3.3. Obtención del biosensor: inmovilización de la enzima.....	50
3.3.4. Caracterización de las películas LbL	51
3.3.3.1. Espectroscopía UV-Vis.....	51
3.3.3.2. Espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier (FT/IR)	51
3.3.5. Comportamiento electroquímico de los sensores	52
3.3.4.1. Voltamperometría cíclica	53
3.3.4.2. Comportamiento dinámico de los sensores.....	53
3.3.4.3. Estudio de los límites de detección	54
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS LbL SOBRE ITO	57
4.1.1. Sensores nanoestructurados fabricados mediante la técnica LbL	57
4.1.2. Caracterización de los sensores LbL nanoestructurados por espectroscopía UV-Vis.....	58
4.1.3. Caracterización de los sensores LbL nanoestructurados por espectroscopía FTIR.....	62
4.2. MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS	66



4.2.1. Respuesta voltamétrica de los sensores no enzimáticos LbL frente a catecol	66
4.2.1.1. Estudio de la reproducibilidad	72
4.2.1.2. Estudio de la repetitividad	75
4.2.1.3. Estudio de los límites de detección de los sensores	78
4.2.1.4. Comportamiento dinámico de los sensores	83
4.2.2. Respuesta voltamétrica del biosensor frente al catecol	89
4.2.2.1. Estudio de la actividad enzimática	89
4.2.2.2. Estudio de la reproducibilidad	91
4.2.2.3. Estudio de la repetitividad	93
4.2.2.4. Estudio de los límites de detección	94
4.2.2.5. Comportamiento dinámico del biosensor	97
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	103
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	107



RESUMEN

En el presente TFG se han desarrollado nuevos sensores y biosensores nanoestructurados basados en la técnica de Layer by Layer (LbL) para la detección de catecol, un componente fenólico de interés para la industria alimentaria. Para la fabricación de las películas LbL se utilizaron una nanoarcilla de aluminosilicato, polietilenimina y ftalocianina de cobre, que es un material sensible con propiedades electrocatalíticas. La nanoarcilla se ha utilizado con el objetivo de mejorar la adhesión entre las películas. Se ha comparado la respuesta electroquímica de los sensores, con y sin nanoarcilla en su estructura, con el fin de estudiar si la presencia de este material mejora la fijación de la ftalocianina de cobre en las películas LbL. Además, a partir de los sensores LbL fabricados se ha desarrollado un biosensor basado en una enzima oxidorreductasa para mejorar la respuesta electroquímica de los sensores LbL.

Los sensores exhibieron excelentes prestaciones frente a catecol con LDDs de $0,987 \mu\text{M}$ para el sensor LbL con presencia nanoarcilla y de $1,16 \mu\text{M}$ para el sensor LbL sin nanoarcilla. Para el biosensor LbL con nanoarcilla desarrollado se obtuvo un LDD de $0,938 \mu\text{A}$, similar al obtenido con respecto a su análogo no enzimático.

Los sensores LbL se caracterizaron mediante técnicas de espectroscopía UV-Vis y FTIR. La técnica electroquímica de voltametría cíclica se ha aplicado para estudiar la reproducibilidad, repetitividad, límites de detección y comportamiento dinámico de los sensores y el biosensor desarrollados.

PALABRAS CLAVE

Sensor nanoestructurado, Layer by Layer, nanoarcilla, metalftalocianina, biosensor.



ABSTRACT

The present project has developed new nanostructured sensors and biosensors based in the Layer by Layer (LbL) technique for the catechol detection, a phenolic compound of interest in the food industry. LbL films were fabricated by using polyethylenimine as positive layer, copper phthalocynine (an electrocatalytic material) and a nanoclay (used to improve the adhesion between layers) both as negative layers. Moreover, two different sequences were used in the fabrication of the LbL structure in order to compare if the presence of the nanoclay might improve the sensor performance. Moreover, a biosensor has also been developed by using an oxidoreductase enzyme to improve the electrochemical response of the LbL sensors.

Sensors showed excellent LDDs for catechol detection with values of 0,987 μM for LbL sensors based on HNT and 1,46 μM for sensors without containing HNT. The LDD obtained for the biosensors was 0,938 μM , similar to its counterpart without HNT.

Sensors were characterized by UV-Vis and FTIR techniques. Cyclic voltammetry was applied to study the reproducibility, limits of detection and dynamic behavior of the sensors and biosensor as-fabricated.

KEY WORDS

Nanostructured sensor, Layer by Layer, nanoclay, metalphthalocyanine, biosensor.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Celda electroquímica de tres electrodos.

Figura 2. Componentes de un sensor.

Figura 3. a) Evolución del voltaje frente al tiempo en un barrido lineal y b) voltamograma obtenido en una voltametría de barrido lineal.

Figura 4. Evolución del voltaje frente al tiempo en la voltametría de impulso diferencial.

Figura 5. Evolución del voltaje frente al tiempo en la voltametría de onda cuadrada.

Figura 6. Evolución del voltaje frente al tiempo en la voltametría de onda triangular.

Figura 7. Gráfico de intensidad-voltaje de un voltamperograma cíclico.

Figura 8. Representación esquemática de la técnica Drop-Casting.

Figura 9. Representación esquemática de la técnica Spin-Coating

Figura 10. Representación esquemática de la técnica de electrodeposición.

Figura 11. Representación de una molécula anfipática ordenada en monocapa en la interfase aire-agua.

Figura 12. Esquema de la preparación de películas Langmuir-Blodgett.

Figura 13. Representación esquemática del método SAMs.

Figura 14. Representación esquemática de la deposición de capas por la técnica LbL

Figura 15. a) Molécula de ftalocianina libre y b) anión ftalocianinato.

Figura 16. a) Metaloftalocianina, b) metalnaftalocianina, c) bisftalocianina de lantánico y d) Ftalocianina-porfirina heterolúptica.

Figura 17. Espectro UV-Visible de una metalftalocianina de cobre.

Figura 18. Ftalocianina de cobre sulfonada

Figura 19. a) Estructura tetraédrica y octaédrica. b) Estructura cristalina de una nanoarcilla. Empaquetamiento de una lámina.



Figura 20. Estructura del nanotubo de Halloysita.

Figura 21. Estructura cristalina de la Halloysita.

Figura 22. Esquema de reacción de la energía libre empleada por un sensor con enzima y sin ella.

Figura 23. Esquema del proceso catalítico de una enzima.

Figura 24. Linealización de Lineweaver-Bruk.

Figura 25. Estructura de la enzima tirosinasa.

Figura 26. Reacción de oxidación del catecol.

Figura 27. Disolución de HNT, PEI y ftalocianina de cobre tetrasulfonada.

Figura 28. a) Acondicionamiento del sustrato ITO en el ultrasonidos. b) Comprobación de la cara conductora del ITO con un multímetro.

Figura 29. Representación esquemática del proceso de Layer by Layer.

Figura 30. a) Programación de la secuencia de LbL mediante el software ND-R Procedure. b) Equipo ND-R 11/2 Rotary Dip Coater.

Figura 31. Sensor nanoestructurado en sustrato ITO preparado con la técnica Layer by Layer.

Figura 32. Representación esquemática del proceso de Layer by Layer.

Figura 33. a) Programación de la secuencia LbL mediante el Software ND-R Procedure. b) Equipo ND-R 11/2 Rotary Dip Coater. Secuencia (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 34. Sensor nanoestructurado en sustrato ITO preparado con la técnica Layer by Layer.

Figura 35. Espectrofotómetro UV-Vis modelo UV-2600.

Figura 36. Espectrofotómetro FT/IR modelo 6600.

Figura 37. Proceso redox del catecol.

Figura 38. Celda electroquímica de tres electrodos.

Figura 39. Espectro UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de los materiales CuPc^{S03-}, HNT y PEI.



Figura 40. a) Espectro UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de la película de LbL (PEI/CuPc^{S03-}) con diferente número de capas. a.1) Ampliación del pico correspondiente a una longitud de onda de 620 nm.

Figura 41. Ajuste lineal entre el número creciente de capas y la absorbancia de banda Q situada a 620 nm para (PEI/CuPc^{S03-}).

Figura 42. a) Espectro UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de la película de LbL (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-}) con diferente número de capas. a.1) Ampliación del pico correspondiente a una longitud de onda de 620 nm.

Figura 43. Ajuste lineal entre el número creciente de capas y la absorbancia de banda Q situada a 620 nm para (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-}).

Figura 44. Espectro UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de las películas de LbL para (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀ y (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 45. Espectro FTIR de los materiales utilizados para la fabricación del sensor.

Figura 46. Espectro FTIR de los materiales depositados para la fabricación del sensor: a) PEI b) CuPc^{S03-} y c) HNT

Figura 47. Espectro comparativo FTIR de los materiales PEI y CuPc^{S03-} con la secuencia LbL (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 48. Espectro comparativo FTIR de los materiales PEI, HNT y CuPc^{S03-} con la secuencia LbL (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 49. Respuesta voltamétrica de los sensores (PEI/CuPc^{S03-})₁₀ y (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀ en (KCl 0,1 M).

Figura 50. Representación voltamétrica de un sustrato de ITO sin modificar en catecol 10⁻³ M.

Figura 51. Voltametría cíclica entre el potencial -1000 mV y 1200 mV de las secuencias (PEI/CuPc^{S03-})_n.

Figura 52. Voltametría cíclica entre el potencial -1,0 V y 1,2 V de las secuencias (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})_n

Figura 53. Representación voltamétrica entre las secuencias: a) (PEI/CuPc^{S03-})₁ y (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁. b) (PEI/CuPc^{S03-})₅ y (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₅. c) (PEI/CuPc^{S03-})₁₀ y (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.



Figura 54. a) Voltamogramas de 3 sensores (PEI/CuPc^{S03-})₁₀. preparados con las mismas condiciones para el estudio de la reproducibilidad a.1) Detalle del pico catódico.

Figura 55. a) Voltamogramas de 3 sensores (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀ preparados con las mismas condiciones para el estudio de la reproducibilidad. a.1) Detalle del pico catódico.

Figura 56. a) Representación voltamétrica de 5 ciclos para el estudio de la repetitividad del sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀. a.1) Ampliación del pico catódico.

Figura 57. a) Representación voltamétrica de 5 ciclos para el estudio de la repetitividad del sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀. a.1) Ampliación del pico catódico.

Figura 58. Representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 59. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 60. Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 61. Representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 62. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 63. Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 64. Representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 65. Ampliación del pico catódico de la Figura 64.

Figura 66. Representación de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 67. Representación de la intensidad de corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10⁻³ M para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.



Figura 68. Representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 69. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 70. Representación de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 71. Representación de la intensidad de corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 72. Respuesta voltamétrica de un biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR en el electrolito de trabajo KCl 0,1 M.

Figura 73. Comparación de la respuesta voltamétrica de un biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR en catecol 10^{-3} M frente al electrolito KCl 0,1 M.

Figura 74. Comparación de la respuesta voltamétrica de un biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀ con enzima TYR frente al sensor no enzimático en catecol 10^{-3} M.

Figura 75. a) Representación voltamétrica de 3 biosensores para el estudio de la reproducibilidad de (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR a.1) Detalle del pico catódico.

Figura 76. a) Representación voltamétrica de 5 ciclos para el estudio de la repetitividad de (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR. a.1) Ampliación del pico catódico.

Figura 77. Representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR.

Figura 78. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR.

Figura 79. Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Figura 80. Representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol 10^{-3} M para el biosensor enzimático.



Figura 81. Representación de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el biosensor enzimático.

Figura 82. Representación de la intensidad de corriente en función de la raíz de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el biosensor enzimático.



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Picos anódicos obtenidos para la secuencia (PEI/CuPc^{S03-})_n.

Tabla 2. Picos catódicos obtenidos para la secuencia (PEI/CuPc^{S03-})_n.

Tabla 3. Picos anódicos obtenidos para la secuencia (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})_n.

Tabla 4. Picos catódicos obtenidos para la secuencia (PEI/CuPc^{S03-})_n.

Tabla 5. Picos catódicos y anódicos obtenidos para los tres sensores (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Tabla 6. Picos catódicos y anódicos obtenidos para los tres sensores (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Tabla 7. Intensidad de los picos catódicos y anódicos obtenidos para los cinco ciclos de (PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Tabla 8. Intensidades de los picos catódicos y anódicos obtenidos para los cinco ciclos de (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀.

Tabla 9. Adiciones realizadas de catecol y concentración en la celda electroquímica.

Tabla 10. Parámetros analíticos de sensores nanoestructurados frente al catecol.

Tabla 11. Intensidades de pico anódico frente a la velocidad de barrido utilizada en un sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀ en catecol 10⁻³ M.

Tabla 12. Intensidades de pico anódico frente a la velocidad de barrido utilizada en un sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀ en catecol 10⁻³ M.

Tabla 13. Intensidades de los picos catódico y anódico obtenidas para los tres biosensores (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR.

Tabla 14. Intensidades del pico catódico y anódico obtenidos en los 5 ciclos en catecol 10⁻³ M.

Tabla 15. Parámetros analíticos de biosensores frente al catecol.

Tabla 16. Intensidades correspondientes al pico anódico para su estudio dinámico.



LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. – Potencial de equilibrio para el caso de una disolución ideal.

Ecuación 2 – Potencial de equilibrio para el caso de una disolución no ideal.

Ecuación 3 – Intensidad de corriente en función de la concentración de analito.

Ecuación 4 – Conductividad.

Ecuación 5 – Conductividad específica.

Ecuación 6 – Conductancia equivalente.

Ecuación 7 – Potencial normal de reducción para un sistema reversible.

Ecuación 8 – Diferencia de potencial entre los picos catódico y anódico de un sistema reversible.

Ecuación 9 – Ecuación de Randles-Sevcik para procesos reversibles.

Ecuación 10 – Ecuación de Randles-Sevcik para procesos irreversibles.

Ecuación 11 – Límite de detección.

Ecuación 12 – Ley de Lambert-Beer.

Ecuación 13 – Ecuación de Michaelis-Menten para un único sustrato.

Ecuación 14 – Linealización de Lineweaver-Burk aplicada a la ecuación de Michaelis-Menten.

Ecuación 15 – Ecuación Henderson-Hasselbalch.

Ecuación 16 – Límite de detección.

Ecuación 17 – Límite de detección

Ecuación 18 - Límite de detección del sensor (PEI/CuPC^{S03-})₁₀ en función de la concentración en catecol 10⁻³ M.

Ecuación 19 - Límite de detección del sensor (PEI/HNT/PEI/CuPC^{S03-})₁₀ en función de la concentración en catecol 10⁻³ M.

Ecuación 20 - Límite de detección del biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPC^{S03-})₁₀/TYR en función de la concentración en catecol 10⁻³ M.

CAPÍTULO 1

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



CAPÍTULO 1: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 1: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El sector de la industria se encuentra en plena **revolución industrial 4.0**, también denominada revolución inteligente o tecnológica, que se basa en introducir las nuevas tecnologías para controlar cualquier proceso de producción desde su inicio hasta que es recibido por el consumidor, lo que conlleva un nuevo modelo de organización y de control de la cadena de ciclo de vida de un producto.

La industria agroalimentaria es una rama del sector industrial importante, que también está viviendo su “*Food industry 4.0*”, siendo imprescindible para poder dotar a las materias primas primarias el valor añadido necesario. La industria alimentaria en la **Unión Europea** tiene un papel importante en la economía, llegando a facturar más de 1.109.000 millones de euros y cuenta con 294.000 empresas. El sector agroalimentario español es líder en producción ocupando el quinto puesto del ranking europeo con un 8,7% [1].

La última Estadística Estructural de Empresas del INE (Instituto Nacional de Estadística), confiere al sector alimentario y de bebidas en **España** como la primera rama del sector industrial con 31.342 empresas lo que representa el 24,8% del sector industrial. Castilla y León es la comunidad líder en la producción agroalimentaria con la mitad de producción nacional de cereal, azúcar, patata y vino [1].

El objetivo principal de la industria 4.0 se centra en desarrollar sistemas para una toma de decisiones más rápida, inteligente y competitiva a través de una adecuada digitalización con un análisis de una gran cantidad de datos. La industria agroalimentaria tiene que asegurar, a través de análisis y normas legisladas, un control en la calidad de los alimentos muy estricto, lo que traducido en el análisis de los alimentos requiere desarrollar pruebas de detección más fiables que puedan complementarse con los nuevos sistemas de tratamiento de datos inteligente que eso conlleva.

La elaboración de sensores más selectivos y eficaces es uno de los objetivos del Grupo UvaSens, creado en 1992 en la Escuela de Ingenierías Industriales de Valladolid por la Profesora María Luz Rodríguez Méndez, que ha enfocado su línea de investigación en la mejora de métodos de determinación analítica y en la creación de nuevos sensores nanoestructurados más precisos, reproducibles y fiables que permitan adaptarse a los diversos cambios del desarrollo industrial.

Este Trabajo de Fin de Grado se ha basado en desarrollar un nuevo sensor electroquímico y nanoestructurado mediante la técnica de multiensamblado de capas Layer by Layer, usando nanoarcilla, un nanomaterial de bajo coste y muy accesible, como componente novedoso y principal, entre otros. Además, con el propósito de mejorar la especificidad del sensor nanoestructurado, se ha



CAPÍTULO 1: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

inmovilizado una enzima oxidorreductasa que es capaz de detectar mejor los fenoles de interés en la industria alimentaria.

Los objetivos de este trabajo de investigación son:

- ❖ Desarrollar películas nanoestructuradas a través de la técnica Layer by Layer (LbL) con compuestos que actúan como mediadores electrónicos como la ftalocianina de cobre sulfonada y con materiales nanoestructurados, como la nanoarcilla, que aumentan la superficie activa y, así mejorar la transferencia electrónica en la nanoestructura.
- ❖ Caracterizar el sensor nanoestructurado a través de dos técnicas espectroscópicas: espectroscopia UV-Vis y espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).
- ❖ Estudiar el comportamiento electroquímico de los sensores mediante la técnica de voltametría cíclica.
- ❖ Calcular los límites de detección de los sensores nanoestructurados frente a un polifenol de interés en la alimentación como es el catecol.
- ❖ Estudiar el comportamiento dinámico de los sensores nanoestructurados.
- ❖ Mejorar la especificidad del sensor desarrollando biosensores enzimáticos basados en tirosinasa, desarrollando métodos que mejoren la inmovilización de la enzima en la superficie nanoestructurada.
- ❖ Estudiar el comportamiento electroquímico del biosensor, incluyendo su límite de detección y comportamiento dinámico, de la misma forma que en el caso del sensor no enzimático.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

2.1. FUNDAMENTOS DE LA ELECTROQUÍMICA

Los métodos electroquímicos se suelen aplicar a mediciones analíticas donde el analito forma parte de un sistema de reacción que intercambia energía en forma de corriente eléctrica, por consiguiente, debe ser parte de una reacción de reducción y oxidación, lo que implica un proceso de transferencia de electrones que sufre el analito por la aplicación de un potencial [2].

Las reacciones redox tienen lugar en celdas electroquímicas con la presencia de dos electrodos en su forma más simple, aunque es habitual la utilización de tres electrodos: uno de referencia, otro de trabajo y un contraelectrodo. Los electrodos están sumergidos en una disolución electrolítica que contiene la muestra de analito. En la *Figura 1* se muestra un esquema de un conjunto electroquímico:

Electrodo de trabajo (WE): en este electrodo se desarrolla la reacción redox a través del intercambio de electrones entre el electrodo y la disolución. En este TFG se ha trabajado con un ITO (cristal con película delgada de óxido de estaño e indio) como material soporte [2].

Contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE): se encarga de estabilizar el sistema al pasar por él la corriente que proviene del electrodo de trabajo, cerrando así el circuito eléctrico. Generalmente, se utiliza un hilo de platino como contraelectrodo [2].

Electrodo de referencia (ER): se emplea para medir la corriente del electrodo de trabajo. Para ello, su composición ha de ser constante y conocida, no debe pasar ninguna corriente a través de él y debe de ser altamente estable. Algunos ejemplos de electrodos de referencia son: electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), electrodo estándar de hidrógeno (SHE), electrodo reversible de hidrógeno (RHE) o electrodo de calomelanos (SCE) [3].

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Potenciostato: se encuentra externamente conectado a los tres electrodos y es el encargado de medir la corriente resultante, además de controlar la corriente que pasa por el electrodo de trabajo.

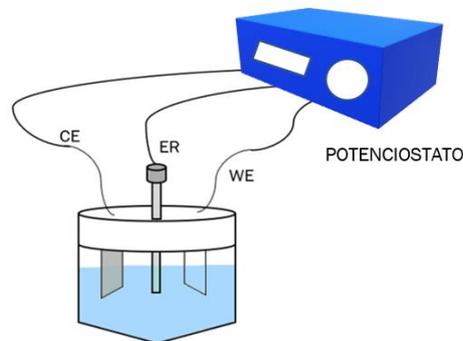


Figura 1. Celda electroquímica de tres electrodos.

2.1.1. Clasificación de los sensores

Se define como sensor aquel dispositivo capaz de transformar una información externa de carácter físico, químico o biológico en una señal interpretable y cuantificable generalmente en forma eléctrica [3-5]. Un sensor consta de tres elementos básicos: un *receptor*, un *transductor* y un *amplificador*. El receptor es el encargado de ponerse en contacto e interactuar con el analito, generando una señal de carácter primario. La señal primaria es recibida por el transductor que realiza una conversión de dicha señal primaria a una secundaria que puede ser de tipo eléctrica, óptica y/o térmica, entre otras. El amplificador modifica la señal para que sea aprovechable y pueda ser interpretada por el usuario [6]. (Figura 2).

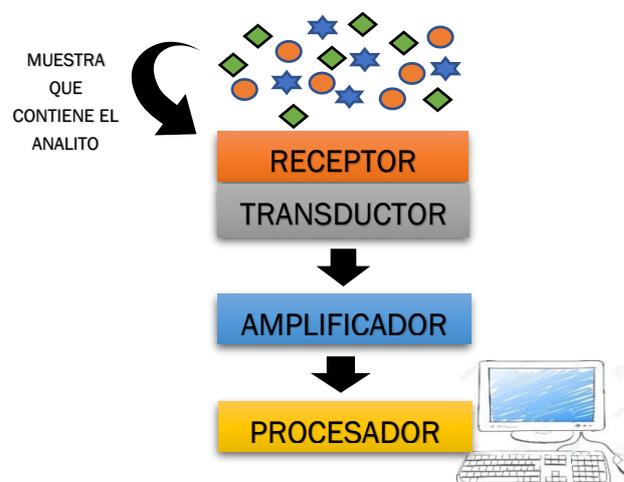


Figura 2. Componentes de un sensor.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

La clasificación general de los sensores, según el tipo de señal primaria que reciben es [5,6]:

- ❖ Sensores físicos: dispositivos capaces de convertir una señal física (temperatura, velocidad, fuerza, presión) en una magnitud eléctrica.
- ❖ Sensores químicos: dispositivos capaces de responder al analito de una forma selectiva ante cambios de tipo químico (concentración o pH) y convertir la señal primaria en magnitud eléctrica.
- ❖ Biosensor: dispositivos de carácter químico compuestos por algún material biológico o bioquímico, capaces de responder al analito y convertir la señal en una magnitud eléctrica.

En función de la señal primaria que se procesa en el transductor, se clasifican como:

- ❖ Electroquímicos: transforman la señal electroquímica en señal eléctrica.
- ❖ Ópticos: transforman una señal óptica (absorbancia, reflectancia, etc.) en una señal eléctrica.
- ❖ Magnéticos: dispositivos basados en el cambio de las propiedades magnéticas del analito.
- ❖ Gravimétricos: transforman el cambio de masa entre analito y receptor a una señal eléctrica.
- ❖ Térmicos: basados en la transformación de la variación de la temperatura en una señal eléctrica.
- ❖ Resistivos: transforman la variación de la conductividad eléctrica entre el analito y el receptor en una señal eléctrica.

2.1.2. Sensores electroquímicos

Se denomina sensor electroquímico al dispositivo capaz de responder a cambios de potencial y/o eléctricos ante la presencia de una especie química con la que interactúa.

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizaron sensores de este tipo que presentan una serie de ventajas frente a otros: permiten el estudio de



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

volúmenes de muestra pequeños y una respuesta de señal inmediata y, además, son muy útiles para control continuo de procesos, ya que proporcionan medidas específicas con una instrumentación sencilla y económica. Al mismo tiempo, los equipos de medida suelen ser potenciostatos o potenciómetros que no son equipos muy sofisticados y complejos de usar [2].

Existe una variedad amplia de sensores electroquímicos por lo que se establece una clasificación debido a su principio de operación: potenciométricos, amperométricos, voltamétricos e impedimétricos.

2.1.3. Técnicas electroquímicas de análisis

2.1.3.1. Potenciometría

La función básica de la técnica potenciométrica es determinar la concentración de una sustancia electroactiva o de una disolución. Para ello, se mide la diferencia de potencial entre dos electrodos, uno de referencia y otro de trabajo, siendo la diferencia de corriente entre ambos prácticamente nula [6].

Los sensores potenciométricos se caracterizan por medir el potencial generado entre los dos electrodos citados anteriormente, ambos contenidos en una disolución donde se produce un intercambio de electrones de manera espontánea, sin aporte energético externo. El electrodo de trabajo o indicador es sensible a la concentración de determinados iones presentes en el analito que se encuentra en la disolución. En cambio, el electrodo de referencia, sirve para poder conocer el potencial medido por la diferencia entre ambos electrodos [7].

La diferencia de potencial generado entre los dos electrodos es función de la concentración del analito y se relaciona a través de la ecuación de Nernst. Para el caso de una disolución ideal, el potencial de equilibrio, E , viene dado por:

$$E = E_o + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln\left(\frac{C_1}{C_2}\right)$$

Ecuación 1. – Potencial de equilibrio para el caso de una disolución ideal.

Siendo:



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

E = potencial de equilibrio.

E_0 = potencial en condiciones estándar.

R = constante de los gases ideales.

T = temperatura.

n = mol de electrones que participan en la reacción.

F = constante de Faraday (aproximadamente 96.500 C/mol)

C_1 = concentración de la especie que se oxida.

C_2 = concentración de la especie que se reduce.

Para el caso de una disolución no ideal, la concentración, C_i , se sustituye por la actividad, a_i , a través del coeficiente de actividad α :

$$a = \alpha \cdot C_i$$

$$E = E_0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln \left(\frac{\alpha_1}{\alpha_2}\right)$$

Ecuación 2 – Potencial de equilibrio para el caso de una disolución no ideal.

2.1.3.2. Amperometría

La técnica amperométrica se basa en la medida de la intensidad de corriente que atraviesa una celda electroquímica donde están presentes un sistema de tres electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el contraelectrodo, que es el encargado de cerrar el circuito eléctrico.

La técnica amperométrica es un caso particular de la técnica voltamperométrica, y se basa en la aplicación de un potencial constante entre los electrodos para poder cuantificar la intensidad de corriente resultante de la oxidación y reducción de la especie química. La intensidad es función del potencial aplicado y de la concentración del analito problema de acuerdo con la Ley de Faraday en su forma diferencial [8]:

$$I = nF \frac{dC}{dt}$$

Ecuación 3 – Intensidad de corriente en función de la concentración de analito.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Donde:

I = intensidad de corriente.

n = número de moles por molécula implicados en la reacción.

F = constante de Faraday (aproximadamente 96.500 C/mol).

$\frac{dC}{dt}$ = velocidad de oxidación y reducción del analito.

2.1.3.3. Impedimetría

La técnica impedimétrica o conductimétrica se basa en determinar la capacidad que tiene un analito de medir el paso de corriente eléctrica entre los electrodos de trabajo y de referencia de una celda electroquímica.

Las disoluciones formadas con electrolitos conducen la corriente eléctrica debido al movimiento de los iones presentes. La conductividad es proporcional a la velocidad con la que se desplazan al aplicar un potencial.

La conductividad (L) es el parámetro inverso a la resistencia que sigue la Ley de Ohm, siendo su expresión:

$$L = \frac{1}{R}$$

Ecuación 4 – Conductividad.

Siendo R el valor de la resistencia.

Para el análisis de disoluciones, se define la conductividad específica (L), expresando los parámetros anteriores en centímetros:

$$L = k \cdot \frac{A}{l}$$

Ecuación 5 – Conductividad específica.

Donde:

k = conductancia de un cubo de líquido de volumen 1 cm³ (Ω⁻¹·cm⁻¹).

A = área transversal del electrodo.

l = distancia entre los dos electrodos.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Para tener en cuenta la concentración iónica de las especies y el número de equivalentes (cantidad de sustancia que se deposita o desprende durante 1 s con una corriente de 1 A), se define la **conductividad equivalente** (Λ) como la conductancia de un equivalente electroquímico de soluto contenido entre electrodos separados 1 cm:

$$\Lambda = \frac{1000}{N} \cdot K$$

Ecuación 6 – Conductancia equivalente.

Siendo:

N = número de equivalentes.

K = conductividad específica.

2.1.3.4. Voltametría

La **voltamperometría** o **voltametría** se basa en la medida de la corriente en función del potencial aplicado en una celda electroquímica mientras se produce la oxidación y reducción de la especie electroactiva del analito.

Este método de análisis tiene una serie de ventajas que hace que sea uno de los métodos más utilizados y de gran valor analítico; no se precisa de una separación previa de los componentes contenidos en la disolución. Además, permite trabajar con concentraciones reducidas de analito con tiempos de análisis muy cortos. También se puede utilizar para especies que pueden variar su número de oxidación.

El proceso se realiza variando el potencial aplicado entre dos límites de voltaje, uno inferior y otro superior, obteniéndose la intensidad de corriente del analito para cada potencial. La información se registra a través de un **voltamperograma** o **voltamograma**, gráfico que representa la intensidad en función del voltaje aplicado.

Un sistema voltamétrico está formado por tres electrodos (electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia) introducidos en una celda electroquímica donde se encuentra la disolución que contiene al analito en un medio iónico.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Según la forma de aplicar el voltaje se pueden encontrar diferentes técnicas: voltamperometría de barrido lineal, pulso diferencial, onda cuadrada y/u onda triangular, entre otras.

Voltametría de barrido lineal

La voltametría de barrido lineal es el método voltamétrico más sencillo. Consiste en aumentar o disminuir el potencial del electrodo de trabajo de una forma lineal. Los parámetros más importantes del voltamograma correspondiente a la voltametría de barrido lineal son el potencial de pico (E_p) y la intensidad de pico (I_p).

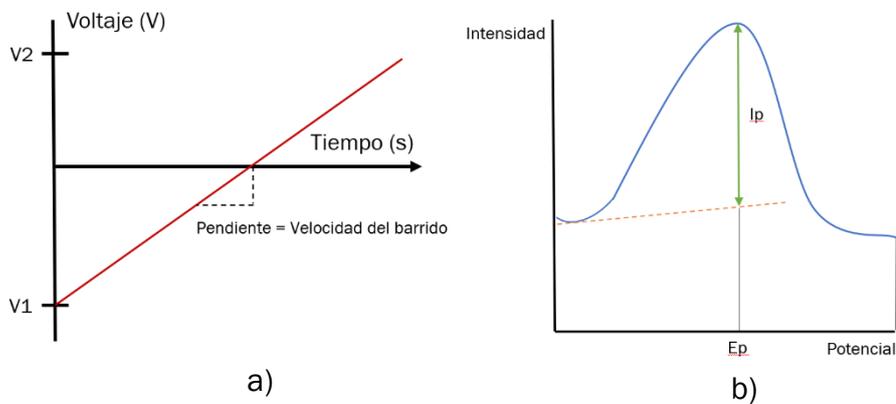


Figura 3. a) Evolución del voltaje frente al tiempo en un barrido lineal y b) voltamograma obtenido en una voltametría de barrido lineal.

Voltametría de pulso diferencial

La voltamperometría de pulso diferencial se caracteriza por las modificaciones del potencial base en forma de impulsos. La amplitud de dichos impulsos permanece constante respecto al potencial base. En este caso se mide la intensidad justo antes y después del salto, y se toma la diferencia. Esto permite diferenciar mejor los picos, llegando a valores del límite de detección aún más bajos [9].

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

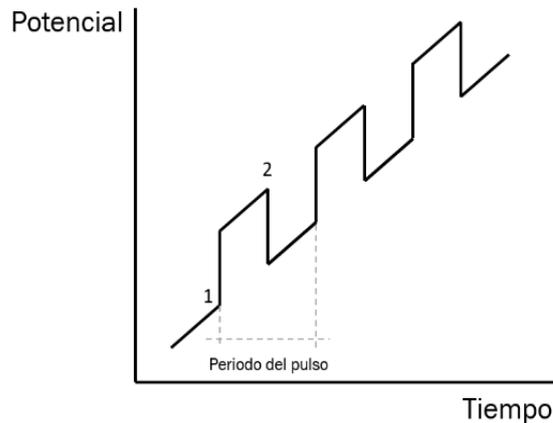


Figura 4. Evolución del voltaje frente al tiempo en la voltametría de impulso diferencial.

Voltametría de onda cuadrada

La voltametría de onda cuadrada se basa en aplicar un potencial escalonado en el que se superponen pulsos de potencial cuadrado. Para cada escalón de potencial, se aplican dos pulsos sucesivos y de igual duración y amplitud, pero en direcciones opuestas.

La diferencia entre la intensidad del pulso en una dirección con respecto al inverso justo después de cada salto, es la magnitud medida [10].

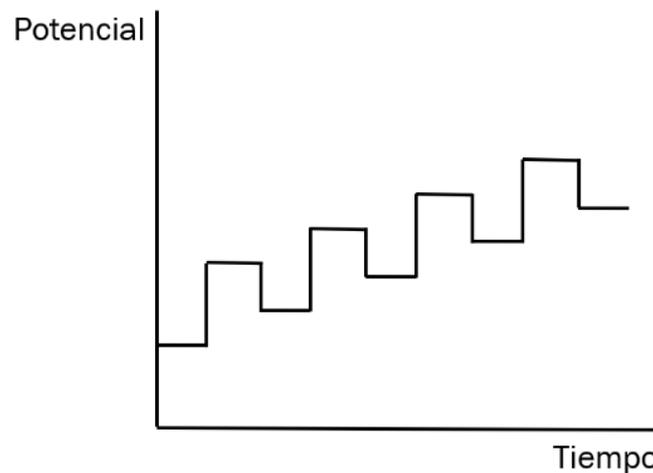


Figura 5. Evolución del voltaje frente al tiempo en la voltametría de onda cuadrada.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Voltametría triangular

Esta técnica se basa en aplicar un barrido de potencial tanto en dirección directa como en dirección inversa al electrodo de trabajo, dando lugar a una señal de potencial triangular.

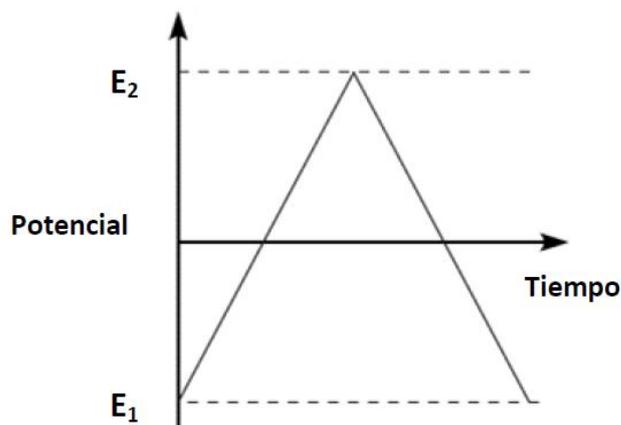


Figura 6. Evolución del voltaje frente al tiempo en la voltametría de onda triangular.

El valor inicial de potencial (E_1) toma un valor de intensidad prácticamente nula, lo que permite que el analito inicialmente no se encuentre ni reducido ni oxidado. A continuación, se aplica un barrido de potencial a velocidad constante hasta que el valor del límite E_2 . En este punto se cambia la dirección de barrido hasta el valor de potencial vuelve a ser el inicial. El intervalo de potencial escogido suele ser aquel que permite la oxidación y reducción de la especie en estudio.

Dentro de esta técnica electroquímica, la voltametría cíclica es la técnica que utiliza un barrido de potencial lineal de forma cíclica y que da lugar a la excitación de onda triangular.

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

La respuesta a la señal triangular de excitación de potencial se denomina **voltamperograma o voltamograma cíclico**, donde se representa la intensidad frente al potencial de barrido tal y como se observa en la **Figura 7** [11] :

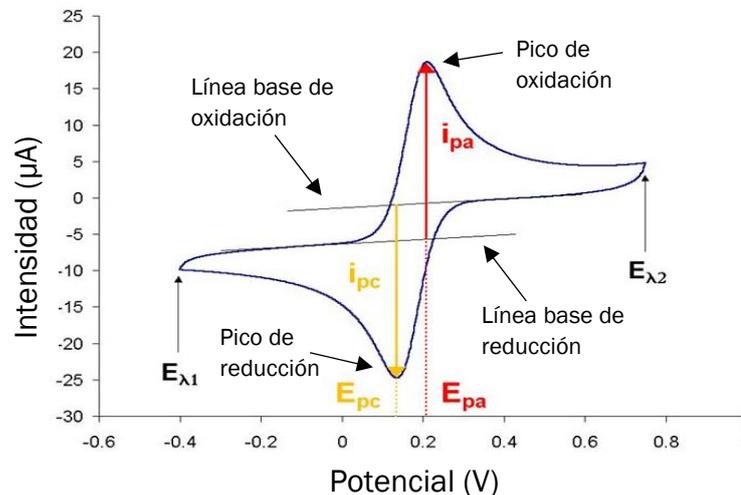


Figura 7. Gráfico de intensidad-voltaje de un voltamperograma cíclico [11].

Los parámetros de la **Figura 7** se definen como:

E_{pc} = potencial de pico catódico.

E_{pa} = potencial de pico anódico.

i_{pc} = intensidad de corriente del pico catódico.

i_{pa} = intensidad de corriente del pico anódico.

$E_{\lambda 1}$ = límite inferior del potencial de barrido aplicado.

$E_{\lambda 2}$ = límite superior del potencial de barrido aplicado.

En esta técnica el barrido de potencial se puede aplicar tanto en sentido anódico como catódico. Cuando se aplica en sentido anódico, se obtiene que al aumentar el potencial, la intensidad aumenta hasta que se alcanza la oxidación completa en la superficie del electrodo de trabajo, lo que se corresponde con un pico anódico. Si se sigue aumentando el potencial, la intensidad disminuye debido a que ya se ha oxidado toda la sustancia. Una vez llegado al límite superior de potencial aplicado, el potencial empieza a disminuir, y las especies que se encontraban oxidadas se reducen hasta alcanzar el punto catódico, correspondiente a la reducción completa de la especie.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Se entiende como proceso redox **reversible** a aquel sistema que tras ser sometido a un barrido de potencial se mantiene constante, ampliándose los valores de concentración en las superficies de los electrodos a través de la ecuación de Nernst (**Ecuación 8**), tanto para los valores de oxidación como reducción.

Para determinar si un sistema es reversible, se puede realizar el cociente entre las intensidades de corrientes entre el pico catódico y el anódico, siempre y cuando los coeficientes de difusión sean próximos entre ellos. Si es reversible el valor del cociente será la unidad, $i_{pc}/i_{pa} \approx 1$.

Experimentalmente, se considera que un proceso redox es química y electroquímicamente reversible cuando la diferencia entre el potencial del pico catódico (E_{pc}) y el pico anódico (E_{pa}) es 57 mV a 25°C (2,22 RT/F) y el ancho a la mitad del máximo en el escanea hacia adelante del pico es de 59 mV. Siendo F la constante de Faraday, T la temperatura y R la constante de los gases ideales [12].

El potencial de media onda ($E_{\frac{1}{2}}$) se aproxima al potencial normal (E^0) en sistemas reversibles:

$$E^0 \approx E_{\frac{1}{2}} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Ecuación 7 – Potencial normal de reducción para un sistema reversible.

Las reacciones que se dan en intervalos de tiempo muy cortos, como para poder conservar la reacción en la superficie del electrodo, se rigen por una ecuación en la que la diferencia entre los picos catódico y anódico permanece constante según:

$$\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = 2,303 \cdot \frac{RT}{nF}$$

Ecuación 8 – Diferencia de potencial entre los picos catódico y anódico de un sistema reversible.

En los procesos reversibles, se puede obtener información cuantitativa sobre la concentración y el coeficiente de difusión del analito a través de la ecuación de **Randles-Sevcik**, así en condiciones de temperatura a 25°C se tiene la **Ecuación 10**:

$$i_p = (2,65 \cdot 10^5) \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{D \cdot v}$$

Ecuación 9 – Ecuación de Randles-Sevcik para procesos reversibles.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Siendo:

i_p = intensidad de pico.

n = número de electrones transferidos entre los electrodos.

A = área superficial del electrodo.

C = concentración de analito.

D = coeficiente de difusión.

v = velocidad de barrido.

Si la reacción redox es **irreversible**, se establece que el potencial de pico es función de la velocidad de barrido. Para obtener la intensidad de pico, se usa la ecuación de Randles-Sevcik modificada para la correlación con términos cinéticos, obteniendo para 25°C [13]:

$$i_p = (2,65 \cdot 10^5) \cdot \alpha^{\frac{1}{2}} \cdot n \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{D \cdot v}$$

Ecuación 10 – Ecuación de Randles-Sevcik para procesos irreversibles.

Siendo:

α = coeficiente de transferencia electrónica.

Como conclusión, la voltamperometría cíclica permite estudiar procesos de oxidación y reducción de especies químicas y su mecanismo de reacción. Esta técnica se puede usar tanto para análisis cualitativos como cuantitativos, ya que la intensidad de los picos varía en función de la concentración de analito en la disolución iónica que está contenida en la celda (análisis cuantitativo), esto nos permite el estudio del límite de detección para cuantificar dicha concentración. La situación de dichos picos en un potencial determinado del barrido, nos indica si la muestra contiene cierta sustancia (análisis cualitativo). Además, si se varía la velocidad de barrido de potencial, se puede estudiar la cinética de las reacciones y también detectar la aparición de especies intermedias en el proceso redox.

2.1.4. Detección analítica mediante técnicas electroquímicas

Se define como **límite de detección** (LDD o LOD) a la concentración mínima de analito que puede ser detectada por un método analítico determinado, o bien



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

a la concentración mínima obtenida en la medida de una muestra que contiene al analito, y que se compara con la concentración obtenida en la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente [14].

Para el cálculo del LDD, se puede utilizar la técnica de regresión por mínimos cuadrados, donde se ajustan los puntos correspondientes a una recta de calibrado de tipo: $y = mx + n$. Con la ecuación de la recta, se pueden obtener la sensibilidad y el límite de detección, que son dos parámetros característicos de un sensor. Para la realización del calibrado se midió la intensidad de pico del último ciclo de cada voltamperograma realizado.

Para el cálculo de dicho límite se utilizó la siguiente expresión:

$$LDD = \frac{k \cdot \sigma}{m}$$

Ecuación 11 - Límite de detección.

Donde:

k = nivel de confianza (normalmente suele tomar el valor de 3 (99,86%))

σ = desviación típica del blanco.

m = pendiente de la recta de calibrado.

Se entiende como **sensibilidad** de un sensor el mínimo cambio de concentración del analito que produce una permuta medible por el sensor en la intensidad del pico de oxidación/reducción. La sensibilidad coincide con el valor de la pendiente de la recta de calibrado (m).

Las técnicas electroquímicas más utilizadas para medir LDD son la voltamperometría cíclica y el límite amperométrico. Generalmente, la última técnica permite obtener LDD más bajos gracias a que en el ensayo se eliminan corrientes de fondo no faradáticas. Si bien, con la voltametría cíclica se pueden obtener límites de detección en la oxidación y en la reducción en un mismo ensayo y en la técnica amperométrica se necesitarían dos ensayos. En definitiva, cada técnica presenta sus ventajas y sus inconvenientes en su aplicación para el estudio del LDD.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

2.2. TÉCNICAS PARA LA PREPARACIÓN DE SENSORES NANOESTRUCTURADOS

El comportamiento de los materiales de dimensiones de rango nanométrico (1-100 nm) se rige por las leyes de la mecánica cuántica. Dentro de los materiales nanoestructurados, una rama muy importante es la química supramolecular que estudia las interacciones entre moléculas. La manipulación de la materia a escala tan reducida, hace que se presenten fenómenos y características diferentes, lo que permite poder fabricar materiales, sistemas y aparatos novedosos con propiedades muy específicas [14,15].

La construcción y modificación de superficies ordenadas y compactas de compuestos sensibles ha sido el objetivo de estudio para los científicos en la última década. La incorporación de películas nanoestructuradas ordenadas sobre la superficie de un sustrato como soporte es, hoy en día, una técnica usada en aplicaciones para biomedicina, medioambiente y alimentación. Las superficies nanoestructuradas tienen una mayor relación superficie/volumen, lo que aumenta la sensibilidad de los sensores.

Para la formación de nanopelículas delgadas existen diferentes métodos como Langmuir-Blodgett, Spin-Coating, Dropcasting, Self Assembled Monolayers (SAM), Electroposición y Layer by Layer (LbL). Esta última técnica, Layer by Layer, ha sido la usada para la realización del sensor basado en nanoarcilla y ftalocianina de cobre que se desarrolla en el presente TFG.

2.2.1. Drop-Casting

La técnica **Drop-Casting** se basa en la formación de una película delgada sobre un sustrato sólido. Este método no permite que haya una homogeneidad en la monocapa ni un control del espesor de la película, pero es una técnica que precisa poco material.

La forma de operar es muy sencilla, se depositan diferentes gotas de la disolución del material que se quiere depositar sobre diferentes partes del sustrato sólido. La disolución se deja secar por evaporación del disolvente volátil, quedando una monocapa. (**Figura 8**)

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

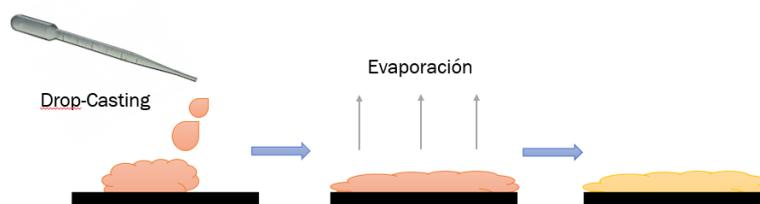


Figura 8. Representación esquemática de la técnica Drop-Casting.

2.2.2. Spin-Coating

El **Spin-Coating** es una técnica de revestimiento para la creación de una película delgada sobre un sustrato plano por el método de centrifugación. La ventaja de usar esta técnica frente a otras es la rapidez y sencillez del método, que permite que las películas se obtengan en un periodo corto de tiempo y con un bajo tiempo de secado [17]. En cambio, este tipo de técnica solo permite una disolución única y al tener un tiempo de secado rápido la película no cristaliza de la misma forma que otras técnicas de formación de películas, lo que puede provocar un rendimiento inferior [18].

La técnica consiste en depositar una pequeña cantidad de la disolución con un disolvente volátil en el centro del sustrato sólido. Posteriormente, se aplica una rotación que hace que la disolución se expanda por todo el sustrato gracias a la fuerza centrífuga y a la vez el disolvente se evapora por el aire que se crea por la rotación, creando así una monocapa. La película queda uniformemente depositada a través de la superficie del sustrato por la fuerza centrípeta y la tensión superficial de la disolución. (**Figura 9**)

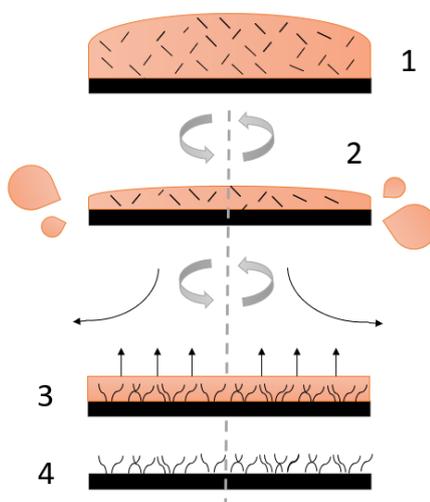


Figura 9. Representación esquemática de la técnica Spin-Coating.

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

2.2.3. Electrodeposición

La **electrodeposición** se basa en el fundamento de la electroquímica. Es un proceso en el que los cationes de una disolución electrolítica se reducen, depositándose en la superficie de un elemento conductor [19].

El ánodo, normalmente, está formado por el material que recubre el cátodo, que es donde se forma la película delgada y homogénea, al aplicar una corriente externa entre ánodo y cátodo. Los metales de recubrimiento más habituales son cobre, estaño, níquel y zinc [20].

Esta técnica de formación de películas delgadas es compleja ya que hay un gran número de factores y variables que influyen en el proceso. (*Figura 10*)

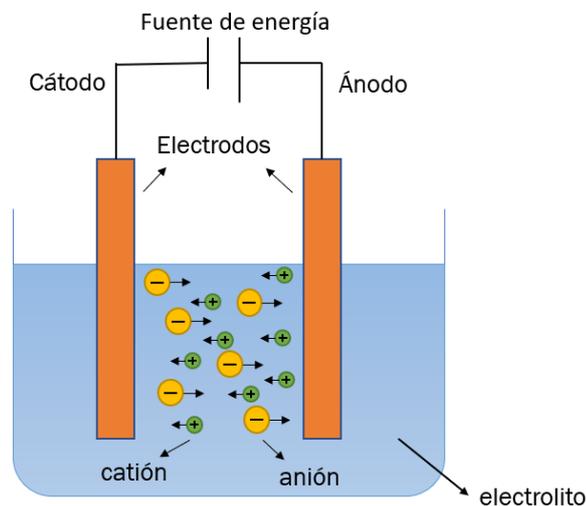


Figura 10. Representación esquemática de la técnica de electrodeposición.

2.2.4. Langmuir-Blodgett

La técnica de **Langmuir-Blodgett** es otra técnica de deposición que permite obtener capas delgadas y homogéneas. A través de ella se puede controlar el espesor de las películas a escala nanométrica [16,17].

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

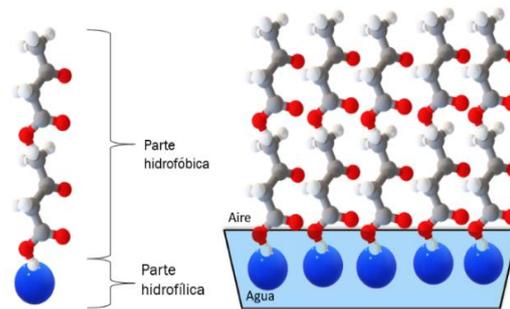


Figura 11. Representación de una molécula anfipática ordenada en monocapa en la interfase aire-agua.

Para la realización de esta técnica se precisa de una bañera construida con un material hidrofóbico y con una disolución acuosa en su interior. En la superficie de esta disolución acuosa se deposita una sustancia anfipática (molécula polar en un extremo y apolar en su extremo contrario) en un disolvente orgánico. Los grupos polares de la molécula anfipática se disponen en la superficie en contacto con la disolución acuosa, ordenándose las moléculas a lo largo de la superficie [22]. (**Figura 11**)

El disolvente orgánico se volatiliza y la sustancia anfipática queda extendida por toda la superficie acuosa. La bañera dispone de una barrera que comprime la molécula hacia el sustrato, haciendo que éstas se vayan ordenando debido a las fuerzas de Van der Waals que se producen entre ellas al estar más próximas entre sí. La presión superficial aumenta hasta obtenerse una monocapa ordenada en la superficie acuosa, momento en el cual se sumerge el sustrato sólido de forma perpendicular. Al subir el sustrato lentamente, se transfieren las moléculas ordenadas desde la superficie de la fase acuosa al sustrato sólido, manteniendo el orden. Si se repite el proceso de inmersión del sustrato, se forma un sistema de monocapas nanoestructuradas y homogéneas con un espesor determinado y controlado [18,19]. (**Figura 12**)

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

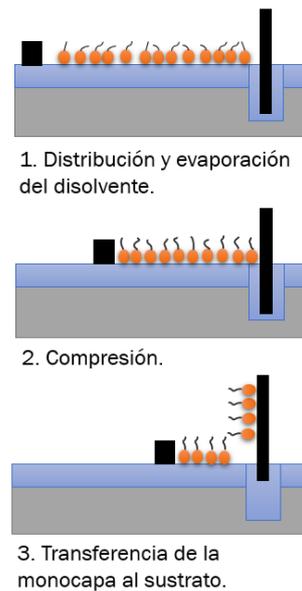


Figura 12. Esquema de la preparación de películas Langmuir-Blodgett.

2.2.5. Self Assembled Monolayers (SAMs)

La técnica de formación de películas **Self Assembled Monolayers (SAMs)**, monocapas autoensambladas, se basa en la adhesión de una molécula en una superficie de una forma altamente ordenada y con un empaquetamiento compacto como resultado de fuerzas electroestáticas, hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o enlaces π - π [16].

Básicamente, consiste en la unión del compuesto que se quiere depositar en la superficie del sustrato a través de reacciones molécula-sustrato. Para preparar películas con esta técnica, se dispone del compuesto activo en disolución y se pone en contacto con el sustrato por un cierto periodo, en el que las moléculas del compuesto se adhieren a la superficie del sustrato a través de enlaces y/o fuerzas de una manera ordenada y compacta. (**Figura 13**)

La monocapa formada por este método con espesores de 1-3 nm supone un método de formación de película elemental en la escala nanométrica [23].

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

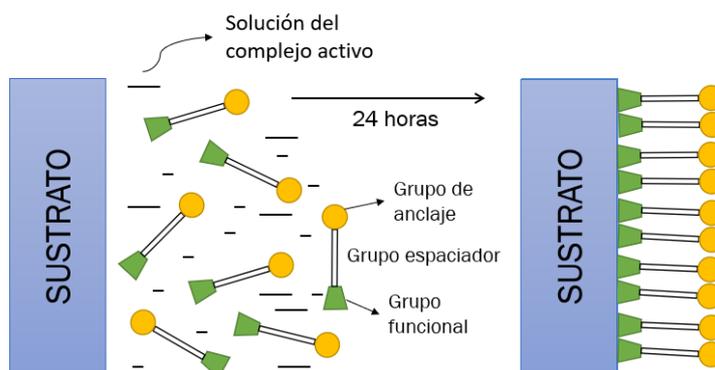


Figura 13. Representación esquemática del método SAMs.

2.2.6. Layer by Layer (LbL)

La técnica de autoensamblado **Layer by Layer** (LbL) es una variante de la técnica SAM. Se basa en la deposición sobre un sustrato sólido de películas nanoestructuradas. El autoensamblado se desarrolla con la inmersión de forma secuencial de un sustrato sólido en diferentes disoluciones en la que se alternan capas de iones de carga contraria. La adhesión de las películas se da dentro de la estructura por fuerzas electrostáticas y/o interacciones no electrostáticas débiles (puentes de hidrógeno e interacciones ligando-receptor) sobre un sustrato.

Entre inmersión positiva y negativa se efectúa un lavado con una disolución tampón para eliminar el exceso de material no adsorbido correctamente [24]. Con este método se puede obtener un sistema multicapa repitiéndose el procedimiento o secuencia las veces que se requiera. (Figura 14)

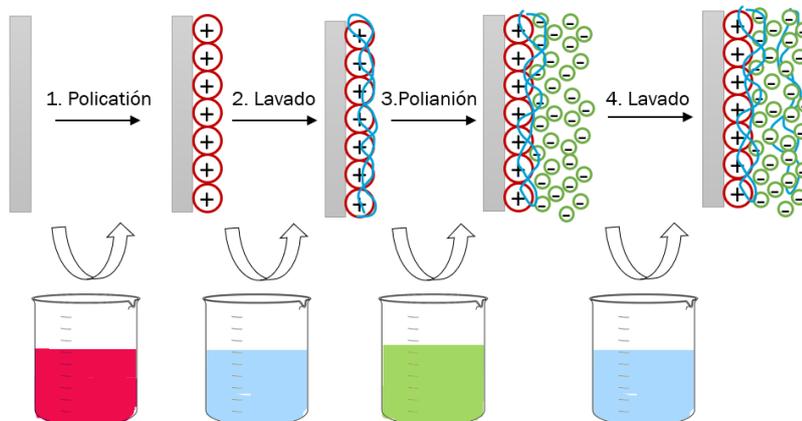


Figura 14. Representación esquemática de la deposición de capas por la técnica LbL.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Este método permite la deposición de diferentes materiales como polímeros conductores naturales o sintéticos, nanopartículas de tipo metálico o inorgánico, proteínas, membranas o enzimas utilizando cantidades pequeñas de disolución. Además, es un método rápido y fácil en el que se puede controlar con exactitud el grosor total de la película a escala nanométrica. Por último, esta técnica se puede aplicar a cualquier tipo de sustrato independientemente de su geometría y morfología [21].

Esta técnica ha sido la utilizada en el presente TFG para la formación de un sensor nanoestructurado multicapa debido a sus múltiples ventajas frente a otros métodos de formación de películas de tamaño nanométrico.

El crecimiento de las monocapas se puede caracterizar con diferentes técnicas como es la espectroscopía. La técnica espectrofotométrica de UV-Visible es una de las más utilizadas para monitorizar el crecimiento de películas LbL (véase 2.5.1.). Esta técnica relaciona la absorbancia con el número de capas que se han depositado a través de la Ley de Lambert-Beer, siendo la absorbancia directamente proporcional a la concentración, en este caso, al grosor en dichas capas, por lo que se puede obtener una información controlada de cada capa depositada.

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

Ecuación 12 – Ley de Lambert-Beer.

Siendo:

A = absorbancia.

ε = coeficiente de extinción molar.

C = concentración de la disolución.

l = paso óptico.

2.3. MATERIALES DE INTERÉS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE SENSORES NANOESTRUCTURADOS

Existen muchos materiales que han sido utilizados en la preparación de sensores nanoestructurados con las técnicas descritas anteriormente (polímeros conductores, nanopartículas, etc.), si bien, a continuación se describen con más detalle las ftalocianinas y las nanoarcillas, y su aplicación

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

en sensores, que son los materiales de interés que se han utilizado en este TFG.

2.3.1. Sensores basados en ftalocianina

La **ftalocianina (PC)** es una molécula orgánica, con una configuración espacial plana y formada por un ciclo simétrico de cuatro grupos isoindol (molécula de pirrol fusionada con un benceno), que se unen entre ellos a través de la sustitución por nitrógeno de los hidrógenos de los anillos de pirrol.

La **Figura 15**, muestra una molécula de ftalocianina en su forma más sencilla, aunque lo más habitual es encontrarse la molécula coordinada con un ion metálico, entre otros ligandos, debido a su sistema bidimensional con 18 electrones deslocalizados tipo π , que pueden sufrir diversas modificaciones dentro del propio ciclo como en el contorno de la molécula.

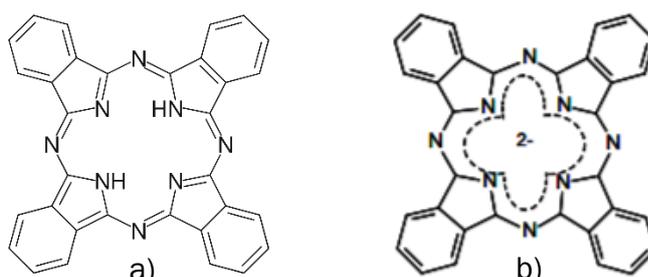


Figura 15. a) Molécula de ftalocianina libre y b) anión ftalocianinato.

La **metalftalocianina (MPc)** consiste en una ftalocianina con la unión en su centro molecular de un ion metálico con número de oxidación +2, como por ejemplo la ftalocianina de cobre, usada para el presente TFG. Con ciertos iones como el ion Pb^{2+} , se puede producir una deformación en el anillo de la molécula debido a que su radio atómico es demasiado grande. Para iones con número de oxidación +1, el acoplamiento central para los dos átomos de nitrógeno no es bueno, lo que provoca una desestabilización en las fuerzas intermoleculares que son las responsables de la insolubilidad [25].

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Las **metalnaftalocianinas** se caracterizan por tener una estructura más extendida en la periferia. Otra configuración se basa en la unión de dos ftalocianinas a través de un ión lantanoide dando lugar a la denominada **bisftalocianina de lantánido**. Por último, también se puede conseguir la unión de una ftalocianina con diferentes ligandos tetrapirrólicos a través de un ión lantánido, son las denominadas **ftalocianina-porfirina heterolítica**. (*Figura 16*)

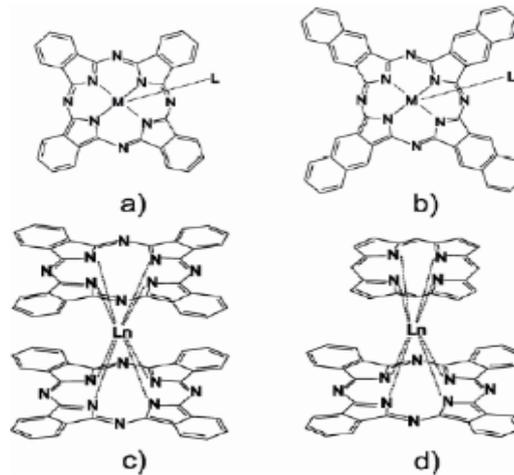


Figura 16. a) Metalftalocianina, b) metalnaftalocianina, c) bisftalocianina de lantánido y d) Ftalocianina-porfirina heterolítica.

Las propiedades más importantes de las metalftalocianinas son:

Propiedades físicas:

- ❖ Eléctricas: las metalftalocianinas tienen un comportamiento semiconductor de tipo p. Además de su átomo metálico en el centro de la molécula, sus 18 electrones tipo π deslocalizados forman una nube electrónica sobre los átomos de C y N (carbono y nitrógeno) que confieren interesantes propiedades eléctricas. [26].
- ❖ Ópticas: las ftalocianinas tienen la capacidad de absorber en las regiones del espectro UV-Visible en el rango entre 400-700 nm, abarcando una gama de colores absorbidas entre el verde y azul-verdoso. La intensidad de color que se produce en las diferentes metalftalocianinas decrece si se produce un estado de agregación [25]. (*Figura 17*)

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Esta propiedad se debe al sistema conjugado $\pi \rightarrow \pi^*$ que poseen sus enlaces. Por ejemplo, en la metalftalocianina de cobre se pueden observar dos bandas de absorción en el espectro en dos zonas diferentes, una en torno a los 300-400 nm, banda B (o banda de Soret), y otra sobre los 620-700 nm denominada banda Q [26].

- ❖ Estabilidad térmica: las ftalocianinas metálicas no se descomponen en un

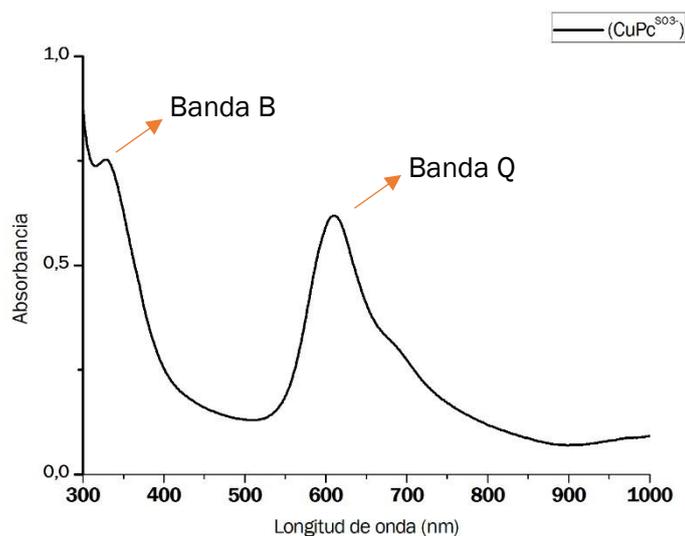


Figura 17. Espectro UV-Visible de una metalftalocianina de cobre.

medio de vacío por debajo de temperaturas de 500°C, presentando gran estabilidad y resistencia térmica [27]. Por ejemplo, la metalftalocianina de cobre puede sublimarse sin descomponerse hasta temperaturas de 500-580°C a atmósfera inerte y a presión normal. Si la metalftalocianina de cobre se encuentra a vacío, aguanta temperaturas más elevadas, (hasta 900°C), pero en presencia de aire y en una atmósfera pura se descompone en torno a los 400°C [25].

- ❖ Solubilidad: la solubilidad en las ftalocianinas generalmente es muy baja en disolventes como agua, alcohol y cetonas, pero en disolventes orgánicos como cloroformo si son altamente solubles. Si se trata de metalftalocianinas, la propiedad depende en gran medida del átomo metálico central. No se disuelven en disoluciones de pH altamente ácido, como por ejemplo en ácido sulfúrico concentrado. En disolventes inorgánicos tienen mejor solubilidad, como por ejemplo la ftalocianina de cobre puede solubilizarse en amoníaco. Esta propiedad se puede mejorar con una oxidación reversible con peróxidos, por ejemplo, la metalftalocianina de cobre sulfonada (CuPc^{SO3-}) se disuelve en agua ya que los grupos sulfónicos les confieren la propiedad de disolverse en disolventes orgánicos [25].

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Propiedades químicas:

- ❖ Electroquímicas: la oxidación de las metalftalocianinas puede llevarse a cabo en la periferia de la estructura o por un cambio en el estado de oxidación del átomo central. El anillo de Pc en estado neutro posee dos cargas negativas, Pc (2-), con lo que le confiere la propiedad de oxidarse a estados de Pc (1-) y Pc (0) y reducirse a conformaciones de Pc (3-), Pc (4-), Pc (5-) y Pc (6-). En las metalftalocianinas el potencial redox se observa cuando el átomo metálico sufre una reducción u oxidación a potenciales comparables a los que se producen en el anillo de ftalocianina, esta propiedad dota a las MPc de especial interés para el desarrollo de sensores electroquímicos.
- ❖ Catalíticas: la propiedad catalítica de las metalftalocianinas depende del ion metálico del centro de la molécula que puede cambiar el estado de oxidación durante el proceso catalítico. Es por ello que las metalftalocianinas se utilizan como catalizadores homogéneos y heterogéneos para diferentes reacciones químicas [28].

En este TFG se ha empleado la **ftalocianina de cobre sulfonada (CuPc^{S03-})** que es una metalftalocianina con un átomo de cobre en su centro molecular que actúa como ion complejante con una sal sulfónica, que permite su solubilidad en agua. (**Figura 18**)

En definitiva, las ftalocianinas metálicas o metalftalocianinas tienen importantes propiedades físicas, químicas y electroquímicas que hacen que su utilización sea clave para el futuro industrial debido a su compatibilidad con la microelectrónica para el desarrollo de sensores [26].

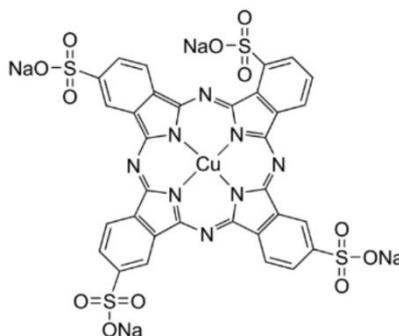


Figura 18. Ftalocianina de cobre sulfonada.

El **Grupo UVaSens** ha desarrollado múltiples investigaciones basadas en la incorporación de ftalocianinas metálicas en sensores nanoestructurados, basados en películas LbL [29–31] y/o películas de Langmuir-Blodgett [32], [33], así como en sensores no nanoestructurados, siendo pionero con su

trabajo de investigación en el que se mezclaron las metalftalocianinas con una pasta de carbono conductora para fabricar un sensor no nanoestructurado [34,35]. Además, este grupo es experto en el desarrollo de lenguas electrónicas basadas en redes de sensores y/o biosensores, muchas de las cuales incluyen sensores basados en ftalocianinas metálicas [36–38].

2.3.2. Nanoarcillas y su aplicación en los sensores electroquímicos

Se define como arcilla a la sedimentación de rocas compuestas por varios minerales, principalmente silicatos hidratados de aluminio, hierro y/o magnesio con diversas impurezas.

Existen seis grupos de silicatos arcillosos diferentes según su composición de átomos de silicio y oxígeno presentes, entre los que destacan los ortosilicatos, sorosilicatos, ciclosilicatos, inosilicatos y filosilicatos.

Los minerales compuestos por arcilla tienen una estructura laminar formada por grupos de sílice tetraédricos y grupos octaédricos de alúmina, ambos grupos enlazados a través de los oxígenos. Cuando el mineral presenta una capa formada por un grupo tetraédrico y otro octaédrico se denomina empaquetamiento bilaminar y si el empaquetamiento se da con una estructura octaédrica entre dos tetraédricas es trilaminar [39,40]. Las fuerzas que se encargan de la unión entre estructuras son fuerzas más débiles que las fuerzas intermoleculares entre los iones de la estructura cristalina de sílice o alúmina [41]. (Figura 19)

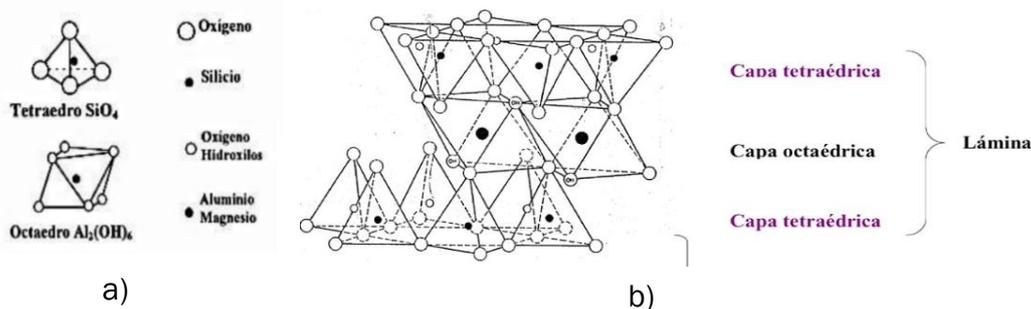


Figura 19. a) Estructura tetraédrica y octaédrica [40]. b) Estructura cristalina de una nanoarcilla. Empaquetamiento de una lámina.[40].

Los cationes Si^{4+} y Al^{3+} pueden ser intercambiados por otros iones con radio atómico parecido, de tal modo que la estructura se mantenga estable, lo que proporciona a la arcilla unas propiedades que la hacen un material muy atractivo para la industria. En el intercambio iónico la atracción entre las



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

partículas catiónicas se reduce produciéndose un cambio en la distancia de 3,5 Å de su estructura original a 20 Å. Este intercambio superficial con iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y otros, provoca una densidad de carga negativa y una expansión en la distancia interlaminar de la arcilla. Esta característica permite que las nanoarcillas puedan ser combinadas con diferentes materiales para múltiples aplicaciones de interés industrial.[39,42].

Si se define en términos de tamaño de partícula, las arcillas, están formadas por partículas de tamaño 1-3 micrómetros de dicho mineral que contienen poros nanométricos.

Las propiedades físico-químicas más importantes de las nanoarcillas son:

- ❖ Plasticidad: se consigue con la adición de agua a la arcilla, sin adición en exceso, ya que podría provocar la precipitación en forma de gránulos al producirse un exceso de separación entre las láminas de la estructura. Las moléculas de agua recubren la parte exterior de las láminas de la estructura, produciéndose un efecto de deslizamiento entre ellas al ser aplicada una fuerza lo que permite modelar este material a escala macro.
- ❖ Superficie específica: es la suma de la superficie externa e interna de las partículas que la forman por unidad de masa (m^2/g). Esta propiedad en las arcillas es muy elevada, lo que la convierte en un material muy importante para ciertos usos en la industria como, por ejemplo, el desarrollo de sensores con interacciones sólido-líquido. Cuanta mayor superficie de interacción exista, mayor sensibilidad ofrecerá el sensor. Algunos ejemplos de la superficie específica en diferentes tipos de arcillas son: en arcillas bilaminares, entre 15 m^2/g y 60 m^2/g , en cambio, para las nanoarcillas con estructura trilaminar aumenta hasta los 200 m^2/g [41].
- ❖ Capacidad de adsorción: las arcillas tienen la capacidad de adsorber agua o diferentes moléculas orgánicas entre las láminas de su estructura, propiedad íntimamente relacionada con la porosidad, produciéndose interacciones químicas entre el adsorbato y la arcilla.
- ❖ Intercambio iónico: una de la característica más importante y fundamental es el intercambio iónico descrito anteriormente. Los iones en la superficie de la estructura, en el interior o en los espacios interlaminares, son capaces de ser intercambiados por otros con un radio atómico parecido. Con lo que se puede definir la capacidad de intercambio catiónico como la suma de todos los cationes que puede absorber dicho mineral en su matriz o como la suma de todas las cargas negativas que posee. Estos defectos negativos del mineral se pueden deber a sustituciones isomórficas en la estructura,

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

por disociación de los grupos hidroxilos o por enlaces insaturados en los bordes y en la superficie externa.

Para el desarrollo de este TFG se usó la nanoarcilla denominada **Halloysita (HNT)** perteneciente a la familia de los filosilicatos que presenta la siguiente estructura química $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. (**Figura 20**)

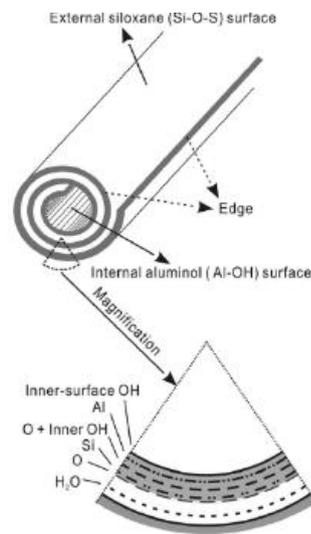


Figura 20. Estructura del nanotubo de Halloysita [42].

La morfología de las nanopartículas es tubular. Las monocapas de silicatos se encuentran separadas por moléculas de agua, lo que la confiere la característica de ser una estructura hidratada. (**Figura 21**)

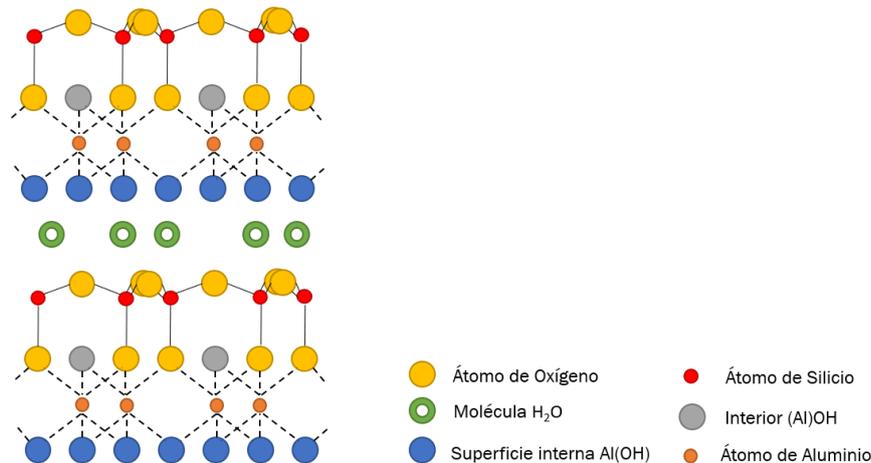


Figura 21. Estructura cristalina de la Halloysita.

La estructura de los nanotubos de halloysita consiste en cilindros huecos formados por dos monocapas de arcillas enrolladas entre sí. La parte exterior



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

está formada por un grupo siloxano (Si-O-Si) y la interna por grupos aluminol (Al-OH). La longitud de los nanotubos varía entre 0,02 μm a 30 μm , el diámetro interno entre 10 nm y 100 nm y el externo de 30 nm a 130 nm. La distancia entre las dos monocapas es de 10 Å, pero si se produce una deshidratación, la molécula puede llegar a un espacio intersticial de 7 Å [42].

La particularidad que define a los nanotubos de halloysita es su diámetro interno, capaz de atrapar moléculas para su posterior liberación, como se ha demostrado para fármacos o para nanoreactivos [43]. La relación superficie/volumen y su estructura hueca permite la combinación de los nanotubos con una matriz polimérica o la inmovilización de enzimas de gran tamaño para la realización de biosensores [42].

Los nanocompuestos de arcilla fueron **objeto de interés** en el campo industrial desde su aparición en 1950 [44]. En 1990, Toyota desarrolló un nuevo grupo de compuestos, una modificación en la estructura de la arcilla con polímeros que revolucionó su utilización, debido a que sus propiedades como resistencia al calor, módulo elástico, viscosidad y/o propiedades absorbentes, entre otras, son mejores que las de otros materiales conocidos hasta la época [45].

Debido a su poder absorbente y su superficie específica elevada, el uso de nanoestructuras arcillosas ha sido recientemente motivo de estudio para la creación de electrodos y sensores de bajo coste económico, de desarrollo rápido y con una sensibilidad superior para el control en industrias farmacéuticas [24], alimentarias y también para su uso ambiental en prevención de contaminantes [44]. En 2012, se desarrolló un biosensor para la detección del pesticida glifosato usando nanoarcilla modificada para la inmovilización de la enzima [46]. También se ha conseguido testar el ácido úrico, ascórbico, oxálico y colesterol con un sensor no enzimático de películas delgadas creado con la mezcla de dos tipos de arcilla, laponita y montmorillonita en dispersión [47]. En otro trabajo de investigación se desarrolló un sensor óptico de luminiscencia compuesto por Eu^{3+} entre las capas de la nanoarcilla para distinguir surfactantes catiónicos [48].

La última investigación publicada en 2018 por M. Ferreira y su grupo de investigación desarrolló un sensor rápido, fiable y sensible para la detección de dopamina. En este trabajo se usó la técnica de LbL de autoensamblado de películas para la elaboración de sensores electroquímicos. El sensor se basa en la arcilla montmorillonita de sodio (Na^+ MMT) y ftalocionina de níquel sulfonada (NiTsPc) como disoluciones aniónicas y polietilenimina (PEI) como polimerización [24].

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

2.3.3. Sensores electroquímicos basados en enzimas: biosensores

Los **biosensores** se definen como sensores que contienen agentes biológicos como puede ser ADN, anticuerpos, enzimas, células, tejidos o microorganismos. Este tipo de sensores resultan más específicos en la detección de un componente biológico concreto, ya que tiene una mayor especificidad funcional enzima/sustrato, aumentando su sensibilidad por la sustancia biológica de interés, lo que los hace muy selectivos [49].

Las enzimas son proteínas de procedencia biológica que catalizan reacciones con gran selectividad y con una velocidad de reacción mayor que sin complejo enzimático, lo que provoca que la energía de activación disminuya aumentando la velocidad de reacción sin alterar el equilibrio químico [50]. (*Figura 22*)

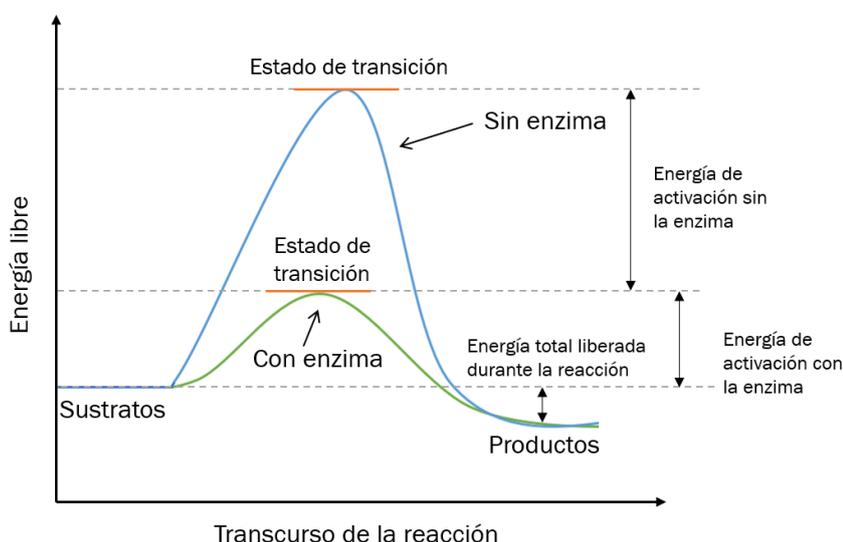


Figura 22. Esquema de reacción de la energía libre empleada por un sensor con enzima y sin ella.

Se denomina sustrato (S) a aquel compuesto que es catalizado por una enzima (E), siendo capaz de formar enlaces entre ambos y, a continuación, el complejo enzima-sustrato es capaz de sufrir una transformación para dar lugar a los productos (P) y a la enzima, que es capaz de recuperarse. Los grupos funcionales de la enzima forman enlaces fijos en el espacio que reaccionan con sustratos específicos que encajen en dicho espacio físico, denominado sitio activo, con lo que se consigue una especificidad geométrica que permite que el sustrato captado por la enzima sea específico. (*Figura 23*)



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

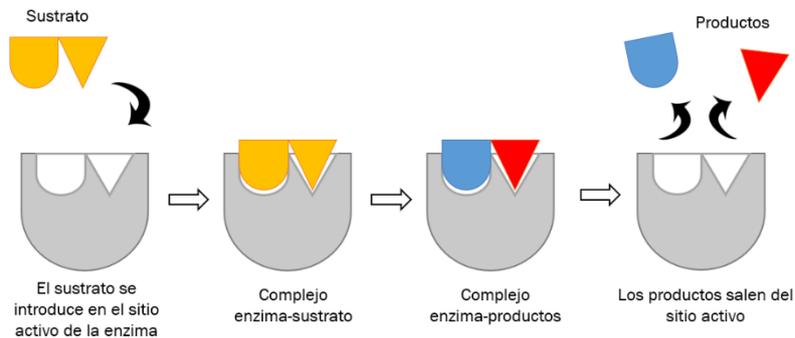


Figura 23. Esquema del proceso catalítico de una enzima.

Existen varios modelos que describen este proceso, como el modelo llave-cerradura propuesto por Emil Fischer en 1894, que fue adaptado posteriormente por Daniel Koshland para explicar la transición que sufrían las enzimas en el proceso [51].

La ecuación de **Michaelis-Menten** representa el estado estacionario de una reacción catalizada por una enzima sobre un único sustrato:

$$v = \frac{Vmax \cdot [S]}{Km + [S]}$$

Ecuación 13. – Ecuación de Michaelis-Menten para un único sustrato.

Siendo:

v = velocidad de reacción por unidad de peso de enzima.

$Vmax$ = velocidad máxima de reacción.

$[S]$ = concentración de sustrato en el medio.

Km = constante de Michaelis-Menten. Se define como la concentración donde la velocidad de reacción enzimática es la mitad de la velocidad máxima.

La forma linealizada de la expresión anterior, conocida como linealización de Lineweaver-Burk, se aplica al estudio de la cinética que se produce en la reacción con la enzima:

$$\frac{1}{v} = \frac{Km}{Vmax \cdot [S]} + \frac{1}{vmax}$$

Ecuación 14. – Linealización de Lineweaver-Burk aplicada a la ecuación de Michaelis-Menten.



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

La representación lineal de la velocidad de catalización de la enzima se muestra en la siguiente figura:

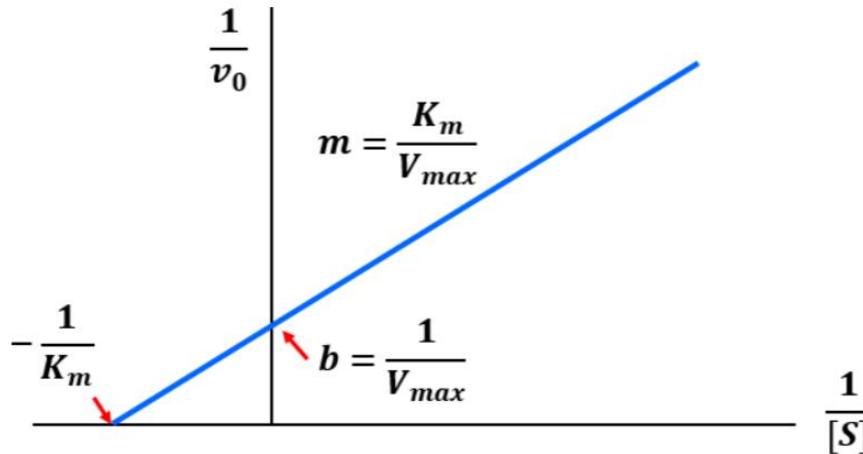


Figura 24. Linealización de Lineweaver-Burk.

Las enzimas se clasifican según las reacciones que catalizan:

- ❖ Oxidorreductasas: son las enzimas encargadas de catalizar las reacciones de oxidación- reducción modificando el estado de oxidación de uno o más átomos de una molécula.
- ❖ Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis, que se producen cuando se rompe un enlace por exceso de agua para obtener un grupo (-OH).
- ❖ Transferasas: son las encargadas de catalizar los grupos funcionales de una molécula donadora a una aceptora.
- ❖ Isomerasas: son capaces de catalizar la transformación de un isómero en otro. Un isómero es un compuesto químico con la misma composición molecular, pero con una configuración diferente.
- ❖ Ligasas: catalizan la formación de enlaces covalentes entre sustratos.
- ❖ Liasas: catalizan la ruptura de un enlace para la formación de un enlace doble.

En la preparación de biosensores se han desarrollado muchas técnicas de inmovilización de la enzima sobre el material sensible de interés en el sensor, sin que se pierda la actividad catalítica enzimática.

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

En los procesos físicos se incluye la inmovilización por la inclusión en geles o membranas. En cambio, la inmovilización química puede ser por la unión a través de enlaces covalentes, por adsorción o por un entrecruzamiento (cross-linking o reticulado). Actualmente, el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído, obteniéndose un entramado cristalino. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos que permiten el paso del sustrato hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción.

Las técnicas para llevar a cabo la deposición de la enzima son las ya mencionadas (véase 2.2.), siendo la más usada, la técnica de Drop-Casting.

Para el presente Trabajo de Fin de Grado, se ha usado la enzima oxidoreductasa tirosinasa (de la familia de las polifenol oxidasas) para la realización del biosensor, inmovilizando la enzima por entrecruzamiento con glutaraldehído sobre el sensor mediante la técnica Drop-Casting.

Esta macromolécula, de carácter proteico, tiene una estructura dividida en cuatro unidades polares e hidrofóbicas. Su centro activo no se encuentra impedido por ninguna de estas cuatro unidades. (*Figura 25*)

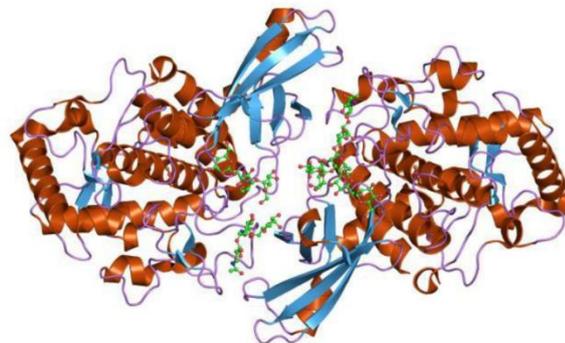


Figura 25. Estructura de la enzima tirosinasa.

La tirosinasa cataliza la oxidación de fenoles tales como catecol, tirosina y dopamina. En presencia de catecol, que es el caso de estudio de este trabajo, se oxida a benzoquinona empleando el oxígeno molecular. Los dos átomos de hidrógeno del catecol se combinan con el oxígeno para la formación de agua. (*Figura 26*)

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

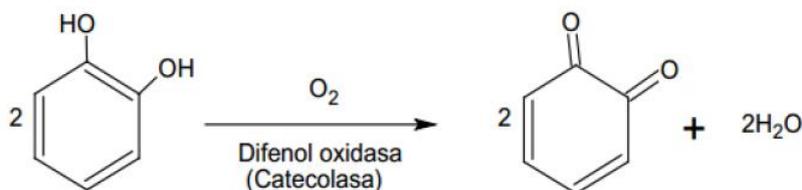


Figura 26. Reacción de oxidación del catecol.

2.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS

Existen muchas técnicas que se pueden emplear en la caracterización de películas nanoestructuradas (microscopía electrónica SEM, microscopía de campo próximo AFM, difracción de Rayos X, espectroscopía UV-Vis, etc.). A continuación, se detallan las técnicas de UV-Vis y espectroscopía infrarroja, que son las que se han utilizado para el presente TFG.

2.4.1. Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Se clasifican según la magnitud que se mide una vez que se ha producido la interacción muestra y radiación original (luz absorbida, emitida, dispersada o refractada) [52].

En la **espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)** se estudia la interacción en un rango de longitudes de onda entre los 200 nm a los 1000 nm. El equipo de trabajo está formado por una fuente de luz policromática que emite en todo el rango del ultravioleta-visible, un monocromador para seleccionar la longitud de onda que se requiere y un detector que recibe y cuantifique la señal que la muestra produce. La muestra debe estar soportada en un material transparente para que pueda absorber la radiación electromagnética. Esta absorción provoca la excitación de los electrones que emigran desde un nivel fundamental hacia un nivel de excitación. La señal de salida nos muestra la absorbancia de la muestra frente a la longitud de onda, lo que permite saber, de forma cualitativa, las sustancias que presenta la muestra según la longitud de onda en la que absorben la luz y, cuantitativamente, a través de la Ley de Lambert-Beer, conocer la concentración de analito [52,53].



CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Es una técnica rápida, muy sensible y precisa, lo que la convierte en una de las más usadas para análisis cualitativos y cuantitativos de sustancias tanto orgánicas como inorgánicas. Sin embargo, su selectividad es específica y puede no ser muy fiable en sistemas complejos orgánicos.

La técnica de espectroscopía UV-Vis fue usada para la caracterización del sensor de metalftalocianina de cobre ($\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$) en el crecimiento de las películas depositadas por LbL.

2.4.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La **espectroscopía FTIR** se basa en la absorción por parte de las moléculas de radiación infrarrojo. La región IR del espectro electromagnético abarca desde 12.800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , diferenciando tres zonas claras: infrarrojo cercano (NIR) de 12.800 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} , medio (MIR) 4.000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} y lejano (FIR) 400 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , siendo el infrarrojo medio el de mayor interés en las aplicaciones analíticas.

Se pueden emplear diferentes técnicas de muestreo básicos: en transmisión o en reflexión. En el método por transmisión, la muestra absorbe una cierta cantidad de energía de radiación que es registrada y comparada con una referencia. El método de reflexión, el haz de luz IR es reflejado por la muestra. Esta radiación reflejada es comparada con la radiación incidente que dará el espectro de la muestra. Gracias a nuevos avances en óptica y detectores, se ha desarrollado la técnica ATR (reflectancia total atenuada), en el que la radiación IR incide sobre un cristal con un índice de refracción muy alto en un determinado ángulo. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hasta la muestra en contacto con el cristal. En las regiones del espectro de infrarrojos en las que la muestra absorbe energía, la onda evanescente se atenúa. El haz atenuado vuelve al cristal, sale a continuación por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector en el espectrómetro de infrarrojos. El detector registra el haz de infrarrojos atenuado como una señal del interferograma, la cual se puede usar para generar un espectro de infrarrojos.

CAPÍTULO 3

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS Y MATERIALES

3.1.1. Reactivos

- ❖ Agua desionizada Mili-Q de conductividad 18,2 MΩ · cm.
- ❖ Hidrogenofosfato de sodio (Na₂HPO₄). Pureza mínima del 99%. Proveedor Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-80-7.
- ❖ Dihidrogenofosfato de sodio (NaH₂PO₄). Pureza mínima del 99%. Proveedor Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-79-4.
- ❖ Polietilenimina (H(NHCH₂CH₂)_n · NH₂). PEI. Peso molecular: 25000 g/mol. Proveedor Sigma-Aldrich, CAS Number: 9002-98-6.
- ❖ Ftalocianina de cobre tetrasulfonada (CuPc SO³) (C₃₂H₁₂CuN₈O₁₂S₄ · 4Na, contenido de tinte 85%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 123439-80-5).
- ❖ Halloysita nanoclay (Al₂Si₂O₅(OH)₄ · 2 H₂O). HNT. Proveedor Sigma-Aldrich, CAS Number: 1332-58-7.
- ❖ Acetona (C₃H₆O, pureza mínima 99%, QUALITY CHEMICALS, CAS Number: 67-64-1).
- ❖ Cloruro Potásico (KCl). Pureza mínima del 99%. Proveedor Sigma-Aldrich, CAS Number: 7447-40-7.
- ❖ Catecol (C₆H₆O₂, pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich).
- ❖ Tirosinasa (TYR) (Obtenida del hongo *Agaricus bisporus*, Actividad enzimática mínima 1000 U/mg. Sólido. Sigma-Aldrich, CAS Number: 9002-10-2)
- ❖ Glutaraldehído (C₅H₈O₂, 50% en disolución acuosa, Alta Aesar, CAS Number: 111-30-8).



3.1.2. Materiales

- ❖ Sustrato de ITO (óxido de estaño e indio).
- ❖ Celda electroquímica (50 mL).
- ❖ Contraelectrodo de platino (placa de 2 cm x 1 cm).
- ❖ Electrodo de referencia (Ag/AgCl, 3M).
- ❖ Laca de plata electrolube SCP.
- ❖ Sustrato de seleniuro de zinc (3 cm x 1,5 cm).

3.2. EQUIPOS

- ❖ ND-R 11/2 Rotary Coater (Nadetech Innovations, Noáin, Navarra, Spain).
- ❖ Multímetro digital 15XP Wavetec, (Meterman, USA).
- ❖ Ultrasonidos Vortex 3 (IKA, Staufen, Alemania).
- ❖ Espectrofotómetro UV-Vis modelo UV-2600 (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- ❖ pHmetro (Crison, Barcelona, España).
- ❖ Espectrofotómetro modelo FT/IR 6600 (Jasco Corporation, Tokio, Japón).
- ❖ Potenciostato/Galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, USA).
- ❖ Horno memmert (Schwabach, Alemania).

3.3. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Para la realización de los sensores nanoestructurados, se prepararon las disoluciones necesarias para el autoensamblaje de las películas delgadas a través de la técnica Layer by Layer. La formación de capas en el sensor se



evaluó a través de espectroscopía de absorción UV-Vis y de espectroscopía infrarroja FT-IR. Por último, se estudió el comportamiento electroquímico del sensor para la determinación de compuestos polifenólicos mediante técnicas electroquímicas. Para ello, se utilizó catecol como analito en los análisis, un di-fenol que se oxida a su forma o-quinona y que se encuentra en diferentes alimentos o bebidas como por ejemplo vinos.

Para la realización del biosensor, se depositó la enzima sobre el sensor nanoestructurado, y se realizó un entrecruzamiento por cross-linking con glutaraldehído para su inmovilización en la superficie.

3.3.1. Preparación de las disoluciones necesarias para el multiensamblado del sensor

La formación del multiensamblado de capas por la técnica Layer by Layer precisa de diferentes disoluciones para la construcción del sensor nanoestructurado. Parte de las disoluciones se realizaron a partir de una disolución madre y otras directamente con agua desionizada Mili-Q. Las disoluciones usadas para la deposición de capas sobre el sustrato ITO fueron las siguientes:

Disolución tampón fosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-})

Para la realización de la disolución amortiguadora con un $\text{pH}=7$ y una concentración de $0,01 \text{ M}$ se usaron las sales NaH_2PO_4 , y Na_2HPO_4 , se pesaron $0,7818 \text{ g}$ y $0,5393 \text{ g}$, respectivamente, y se enrasó en un matraz aforado de 1.000 mL con agua desionizada Mili-Q.

La disolución se preparó acorde con la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]}$$

Ecuación 15 – Ecuación Henderson-Hasselbalch.

Disolución de polietilamina (PEI)

Se realizó una disolución de PEI de concentración 1 g/L en tampón fosfato ($0,01 \text{ M}$; $\text{Ph} 7$). Se pesó $0,25 \text{ g}$ y se llevó a un matraz aforado de 250 mL con la disolución tampón fosfato hasta el enrase. Esta disolución actúa como policatión.

CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Disolución de nanoarcilla halloysita (HNT)

La disolución de la nanoarcilla de concentración 1 g/L se realizó con 0,1 g de este mineral y se llevó a un matraz aforado de 100 mL con agua desionizada Mili-Q. Para ello se introdujo previamente la nanoarcilla en el horno a 210°C durante 3 horas para secar la humedad de los espacios intramoleculares. Una vez seca se realizó la disolución con agua desionizada Mili-Q y se mezcló en el ultrasonidos durante 2 horas. La nanoarcilla halloysita se comporta como anión en la configuración del sensor.

Disolución de ftalocianina de cobre tetrasulfonada ($\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$)

Se preparó una disolución de ftalocianina de cobre tetrasulfonada de $5,08 \cdot 10^{-4}$ M en tampón fosfato (0,01 M, pH 7). Se pesó 0,025 g de $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ y se llevó a un matraz de 50 mL. Esta disolución actúa como anión para la preparación de películas.

Las tres disoluciones descritas anteriormente se han utilizado para preparar películas LbL sobre ITO y construir un sensor nanoestructurado de interés (**Figura 27**). Para ello, se han utilizado dos secuencias diferentes, una conteniendo HNT en la nanoestructura y otra sin HNT, con el fin de comparar los sensores y evaluar la capacidad electrocatalítica de la nanoarcilla y, por ende, una mejora en las prestaciones del sensor nanoestructurado. El uso de la nanoarcilla tiene como objetivo principal mejorar la adhesión de la $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ en la preparación del sensor por la técnica LbL, aumentando también las propiedades electrocatalíticas para obtener un sensor con una mejor transferencia de electrones al introducir la HNT, además, de que contribuiría a la inmovilización de la enzima ya que es un material poroso [42].



Figura 27. Disolución de HNT, PEI y ftalocianina de cobre tetrasulfonada.

CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.2. Preparación de sensores nanoestructurados mediante la técnica Layer by Layer

Para la construcción del sensor nanoestructurado en primer lugar, se realizó el acondicionamiento del sustrato de óxido de estaño e indio, ITO, limpiándolo según el siguiente protocolo: se introduce en un vaso de precipitados con jabón, agua desionizada Mili-Q y un disolvente orgánico (e.j. acetona) y se sometió a 10 minutos de ultrasonidos. Por último, se aclaró el ITO con agua desionizada Mili-Q y se secó sin aplicar mucha fuerza sobre el sustrato para no alterar la película conductora de óxido de estaño e indio que contiene en una de sus caras.

Las películas LbL se depositarán sobre esta capa conductora. Para saber cuál es la parte conductora del ITO se dispone de un multímetro digital (**Figura 28**).

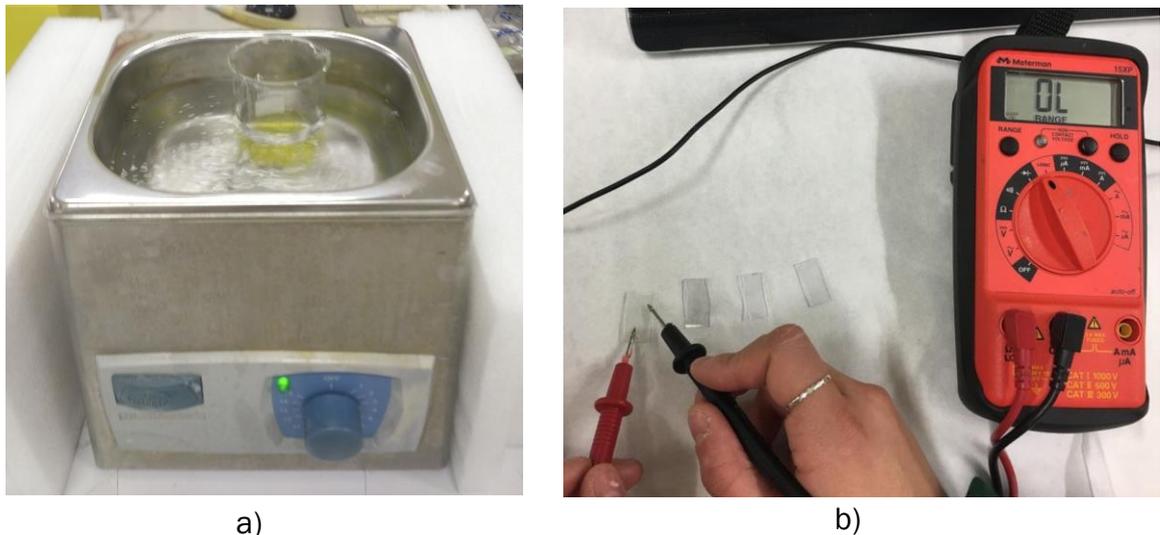


Figura 28. a) Acondicionamiento del sustrato ITO en el ultrasonidos. b) Comprobación de la cara conductora del ITO con un multímetro.

Tal y como se ha descrito, la construcción de la nanoestructura se realizó a través de la técnica Layer by Layer, utilizando un equipo ND-R Coater. El sistema de multiensamblado se basa en las fuerzas de adsorción electrostáticas o fuerzas débiles como Van der Waals, dipolo, etc. entre cargas opuestas de las diferentes películas que conforman la nanoestructura.

A través del software ND-R Coater del equipo, se programó la secuencia para la realización del sensor. Se realizaron dos secuencias tal y como se ha indicado anteriormente, $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$ y $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$ siendo n el número de secuencias completas. Entre cada inmersión se realiza un lavado



intermedio con agua desionizada Mili-Q para eliminar el exceso de aniones o cationes depositados en la película.

Los parámetros principales que han de programarse en el software del equipo y determinan el proceso de formación del sensor son los siguientes:

- ❖ Name: nombre de la inmersión.
- ❖ Beaker number: número de posición de la disolución.
- ❖ Dips: número de inmersiones en la disolución.
- ❖ Up position (mm): posición superior del portaplacas.
- ❖ Down position (mm): posición inferior del portaplacas.
- ❖ Immersion speed (mm/min): velocidad de inmersión en la disolución.
- ❖ Withdrawal speed (mm/min): velocidad de retirada de la disolución.
- ❖ Up waiting time (s): tiempo hasta el tiempo de espera.
- ❖ Down waiting time (s): tiempo de inmersión.
- ❖ Repeats: número de repeticiones de todo el proceso.

Una vez que se configuraron los parámetros se inicia el proceso poniendo especial atención al correcto funcionamiento de este.

Secuencia (PEI/CuPc^{S03-})_n

La formación del sensor se desarrolló con la siguiente secuencia:

- 1) Inmersión del ITO 180 segundos en la disolución de PEI, actuando como polimerización.
- 2) Lavado en agua desionizada Mili-Q 30 segundos.
- 3) Inmersión del ITO en una disolución de ftalocianina de cobre tetrasulfonada en un tiempo de 300 segundos que actúa como anión.
- 4) Lavado en agua desionizada Mili-Q 30 segundos.
- 5) Repetición de los pasos 1 a 4 “n” veces. En este trabajo se han preparado 10 bicapas (n=10).

CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En la **Figura 29** se representa a modo de esquema las etapas 1-4 del procedimiento de la técnica de Layer by Layer para la configuración $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$:

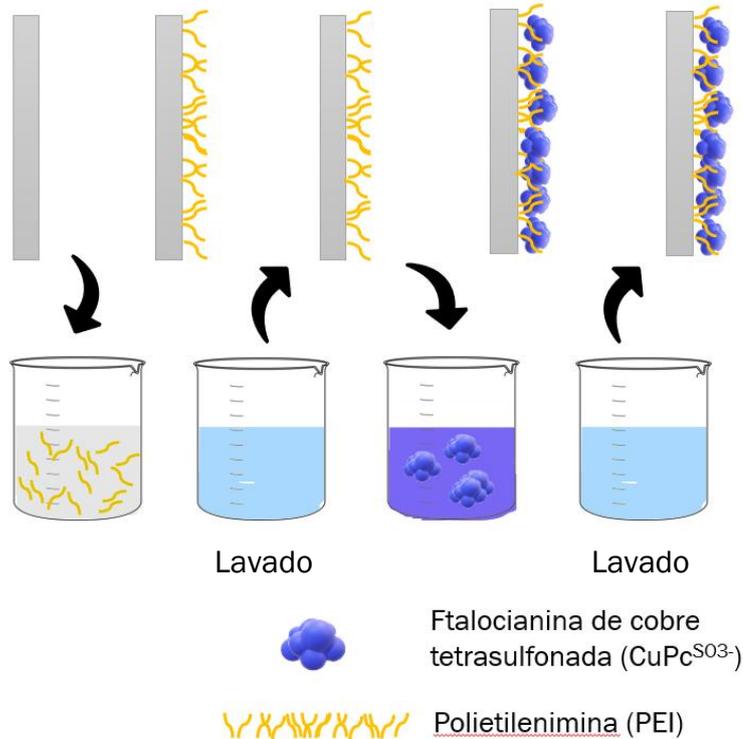


Figura 29. Representación esquemática del proceso de Layer by Layer.

Al finalizar la secuencia se dejó secar el sensor al aire al menos 180 segundos. El software y secuencia del equipo para la fabricación del ITO sin HNT se muestra en la siguiente figura. (**Figura 30**)

Repeats: 10 Safety height: 0 mm Subprocess: STOP RUN RESET

Angle (°)

Name	Beaker number	Dips	Up position (mm)	Down position (mm)	Immersion speed (mm/min)	Withdrawal speed (mm/min)	Up waiting time (s)	Down waiting time (s)
PEI	1	1	0	85	400	400	10	180
H2O des.	2	1	0	85	400	400	10	30
CuPc / AuNPs	3	1	0	85	400	400	10	300
H2O des.	4	1	0	85	400	400	180	30



a)

b)

Figura 30. a) Programación de la secuencia de LbL mediante el software ND-R Procedure. b) Equipo ND-R 11/2 Rotary Dip Coater.



En la siguiente imagen se muestra un sensor con la secuencia $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$.
(Figura 31)



Figura 31. Sensor nanoestructurado en sustrato ITO preparado con la técnica Layer by Layer.

Secuencia $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$

El sensor que se desarrolló con HNT se prepara siguiendo la secuencia:

- 1) Inmersión del ITO 180 segundos en la disolución de PEI, actuando como polícatión.
- 2) Lavado en agua desionizada Mili-Q 30 segundos.
- 3) Inmersión del ITO en la disolución de HNT un tiempo de 600 segundos. Esta disolución actúa como carga negativa.
- 4) Lavado en agua desionizada Mili-Q 30 segundos.
- 5) Inmersión del ITO 180 segundos en la disolución de PEI con carga positiva.
- 6) Lavado en agua desionizada Mili-Q 30 segundos.
- 7) Inmersión del ITO en una disolución de ftalocianina de cobre tetrasulfonada en un tiempo de 300 segundos que actúa como carga negativa.
- 8) Lavado en agua desionizada Mili-Q 30 segundos.
- 9) Repetición de los pasos 1 a 8 “n” veces. En este trabajo se han preparado 10 bicapas (n=10).

Las etapas del procedimiento de la técnica de Layer by Layer para la configuración $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$ se representan, de forma esquemática, en la **Figura 32**:

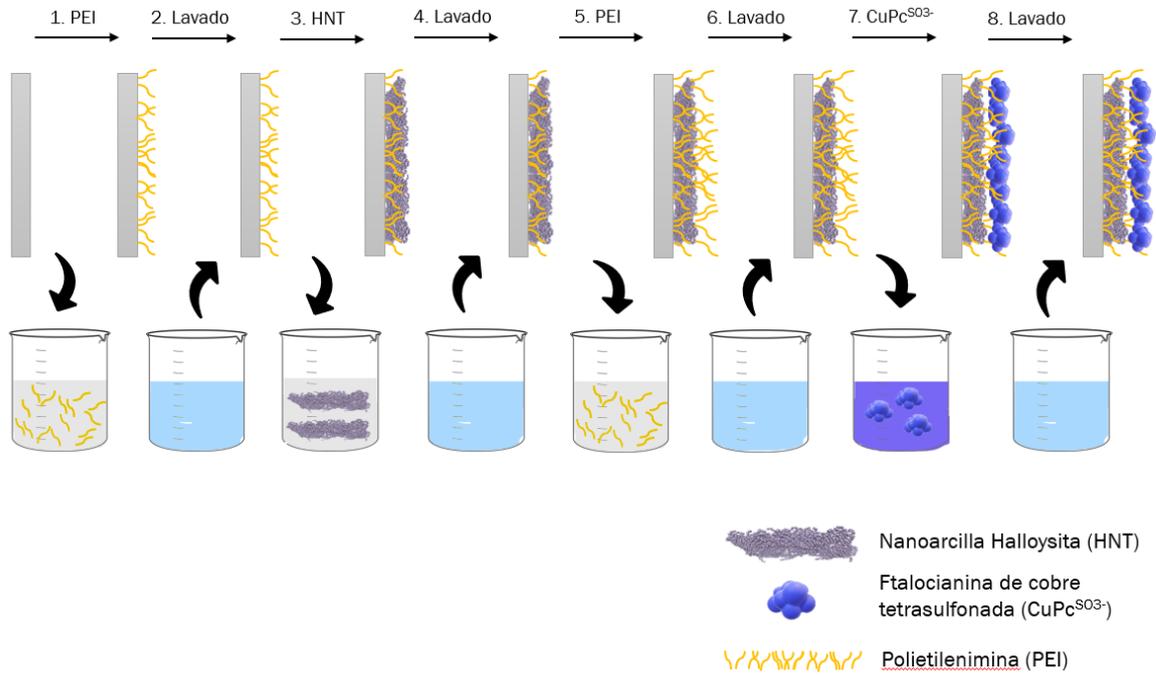


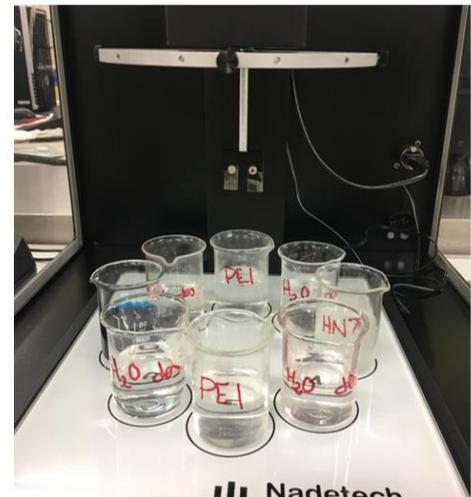
Figura 32. Representación esquemática del proceso de Layer by Layer.

Al finalizar la secuencia se dejó secar el sensor al aire al menos 180 segundos. El software y secuencia del equipo para la fabricación del ITO con HNT se muestra en la Figura 33:

Repeats: 10 | Safety height: 0 mm | Subprocess: | STOP | RUN | RESET

Angle (°)

	Name	Beaker number	Dips	Up position (mm)	Down position (mm)	Immersion speed (mm/min)	Withdrawal speed (mm/min)	Up waiting time (s)	Down waiting time (s)
M	PEI	1	1	0	85	400	400	10	180
M	H2O des.	2	1	0	85	400	400	10	30
M	HNT	3	1	0	85	400	400	10	600
M	H2O des.	4	1	0	85	400	400	10	30
M	PEI	5	1	0	85	400	400	10	180
M	H2O des.	6	1	0	85	400	400	10	30
M	CuPc / AuNPs	7	1	0	85	400	400	10	300
M	H2O des.	8	1	0	85	400	400	180	30
*	M								



a)

b)

Figura 33. a) Programación de la secuencia LbL mediante el Software ND-R Procedure. b) Equipo ND-R 11/2 Rotary Dip Coater. Secuencia (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.



En la **Figura 34** se muestra un sensor con la secuencia completa (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.



Figura 34. Sensor nanoestructurado en sustrato ITO preparado con la técnica Layer by Layer.

3.3.3. Obtención del biosensor: inmovilización de la enzima

Una vez elaborados los sensores mediante la técnica de Layer by Layer, se ha inmovilizado la enzima tirosinasa (TYR) para evaluar su comportamiento como biosensores.

Para la elaboración del biosensor, el primer paso es adecuar su pH. Para ello, se realiza una inmersión del sensor nanoestructurado en una disolución tampón de buffer fosfato 0,01 M a pH 7 durante el tiempo de 2 minutos con el fin de eliminar cualquier resto en exceso que pudiera quedar de la deposición de películas por LbL.

A continuación, una vez que el sensor se seca, se realizó una inmersión directa de 5 minutos en glutaraldehído al 2,5 % en volumen. Después el sensor se dejó secar al aire. El glutaraldehído actúa como “pegamento” para la formación de enlaces covalentes con la enzima dando lugar a entramado reticulado con canales microscópicos que permiten el paso del sustrato hacia la enzima. Para finalizar, se depositaron 50 μ L de la enzima por la técnica de drop-casting y se dejó secar.

Una vez seco y realizado el entrecruzamiento, se vuelve a sumergir en una disolución tampón de buffer fosfato 0,01 M a pH 7 durante un tiempo de 30 segundos para acondicionar el biosensor.

Para la preparación de enzima se usó una concentración de tirosinasa de 5 mg/mL en una disolución tampón de buffer fosfato 0,01 M a pH 7.

CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.4. Caracterización de las películas LbL

La caracterización de los sensores se ha llevado a cabo a través de las técnicas espectroscópicas UV-Vis y FT-IR con el fin de controlar una adhesión adecuada de las películas nanoestructuradas y monitorizar su crecimiento sobre el sustrato ITO.

3.3.3.1. Espectroscopía UV-Vis

Con el fin de estudiar si el crecimiento de las películas LbL era homogéneo, se registraron los espectros de absorción de 10 películas consecutivas, $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{1-10}$ y $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{1-10}$. La caracterización del sensor se realizó con el software *UV-Probe* sobre un sustrato de cuarzo. Antes de la adquisición de los espectros se realizó una línea base al aire entre 200-1000 nm. Posteriormente, se registraron los espectros en el mismo rango. (**Figura 35**)

Además, también se caracterizaron las disoluciones utilizadas para el crecimiento de las películas por separado.



Figura 35. Espectrofotómetro UV-Vis modelo UV-2600.

3.3.3.2. Espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier (FT/IR)

El estudio de la caracterización por espectroscopía infrarroja se llevó a cabo a través del software *Spectragryph 1.1*. Se usó como sustrato seleniuro de zinc, ZnSe, debido a que es transparente a la radiación IR. Se analizó un rango de longitud de onda entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} y



CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

300 escaneos en cada uno de los análisis realizados. Se registraron los espectros FTIR del crecimiento de las películas LbL y también los componentes PEI, HNT y $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ de forma individual realizando un drop-casting sobre el sustrato. (*Figura 36*)



Figura 36. Espectrofotómetro FT/IR modelo 6600.

3.3.5. Comportamiento electroquímico de los sensores

Para poder acondicionar los sensores antes de realizar medidas en analitos, el sensor se testó en una disolución acuosa de electrolito KCl (0,1 M).

En el presente trabajo se usó catecol como analito de estudio, componente importante en el proceso de oxidación-reducción de la fermentación del vino y es un responsable importante en las propiedades organolépticas. El catecol es uno de los tres isómeros del bencenodiol, concretamente el orto-dihidroxibenceno, y se oxida a su forma o-quinina (*Figura 37*). Se elaboró una disolución de concentración 10^{-3} M en KCl 0,1 M.

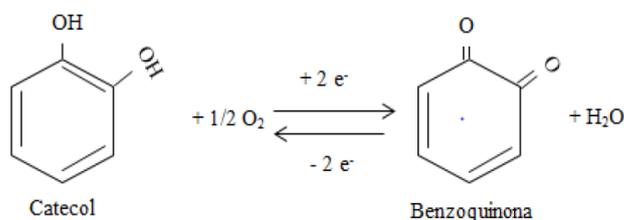


Figura 37. Proceso redox del catecol.

CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.4.1. Voltamperometría cíclica

Para establecer la sensibilidad del sensor y los límites de detección del analito, se ha utilizado la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica. Para ello, se dispuso de una celda electroquímica de tres electrodos de 50 mL. Se utilizó un electrodo de referencia Ag/AgCl, un contraelectrodo de placa de platino para cerrar el circuito eléctrico y, por último, un electrodo de trabajo, siendo el sensor nanoestructurado fabricado por la técnica Layer by Layer. (**Figura 38**)



Figura 38. Celda electroquímica de tres electrodos.

Para llevar a cabo los ensayos electroquímicos, primero se definieron los parámetros de operación de la voltametría cíclica. El potencial de ventana fijado fue desde -1,0 V hasta 1,2 V. La velocidad de barrido que se estableció fue 0,1 V/s. Por último, se fijó el número de ciclos, el potencial de partida y el tiempo de acondicionamiento; 20 ciclos, 0 V y 5 segundos, respectivamente.

3.3.4.2. Comportamiento dinámico de los sensores

Con el fin de estudiar la naturaleza del proceso de transferencia y evaluar el comportamiento dinámico de los electrodos, se registraron voltamogramas haciendo un barrido de velocidades entre 10 mV/s y 2000 mV/s en una disolución de catecol 10^{-3} M en KCl 0,1 M. Cuando la intensidad del pico estudiado (catódico, anódico o ambos) varía linealmente con la velocidad de barrido, se dice que el proceso está controlado por la transferencia de electrones del analito al electrodo de trabajo; mientras que, si varía linealmente



con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, será la difusión de iones del analito hacia la superficie del electrodo la etapa que controle el proceso de transferencia.

Para el estudio cinético, se introdujeron 50 mL de la disolución de catecol en una celda electroquímica con los tres electrodos de trabajo correspondientes: referencia, contraelectrodo y electrodo de trabajo. Se realizaron diferentes voltamogramas entre el potencial de ventana entre -1,0 V y 1,2 V realizando diferentes medidas con distintas velocidades de barrido comprendidas entre 10 mV/s y 2000 mV/s. Se fijaron 5 ciclos, el potencial inicial fue 0,0 V y un tiempo de acondicionamiento de 5 segundos. Para interpretar los resultados se selecciona el último ciclo de la voltimetría para cada medición.

3.3.4.3. Estudio de los límites de detección

Para llevar a cabo el análisis experimental para determinar el LDD del sensor en catecol, se parte de 50 mL de disolución KCl y se mide el blanco. Posteriormente, se realizan adiciones sucesivas de volúmenes de la disolución madre de catecol (10^{-3} M) y se registran los voltamogramas (10 repeticiones por cada adición). Se comenzó con adiciones de 100 μ L, llegando a un volumen final adicionado de 7500 μ L.

A medida que se realizan las adiciones se observa en los voltamogramas el pico de oxidación y de reducción del catecol y cómo éstos aumentan su intensidad a medida que aumenta la concentración analizada. Las intensidades máximas en ambos picos se representan frente a la concentración y se obtiene una recta lineal de calibrado. Después se calcula el límite de detección que es igual a 3 veces la desviación estándar del blanco dividido entre la pendiente, siendo la pendiente la sensibilidad del sensor.

$$LDD = \frac{3 \cdot \sigma}{m}$$

Ecuación 16 – Límite de detección.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo realizado se ha dividido en dos partes. En la primera parte se ha estudiado la forma de preparar sensores basándonos en películas LbL. Se han preparado dos sistemas, uno con nanoarcilla halloysita (HNT) y otro sin ella para seleccionar aquella que proporcione una mejor respuesta frente al analito de estudio, catecol. Se estudió la repetitividad, reproducibilidad, límite de detección y su comportamiento dinámico.

La segunda parte del trabajo consiste en el desarrollo de un biosensor a partir del sensor LbL fabricado mediante la inmovilización de la enzima tirosinasa sobre la superficie del sensor. Esta enzima es capaz de catalizar la oxidación-reducción de orto-difenoles como es el caso del catecol, el analito estudiado en este trabajo. Se evaluará el papel de la película LbL en el funcionamiento del enzima.

4.1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS LbL SOBRE ITO

4.1.1. Sensores nanoestructurados fabricados mediante la técnica LbL

Los sensores LbL fabricados se basan en dos configuraciones. La primera de ellas alterna un mediador electrónico, la ftalocianina de cobre sulfonada ($\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$) con una molécula cargada positivamente, el PEI, en una configuración $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_n$. Siendo n el número de veces que se repite la secuencia. El PEI, es un polímero que actúa como polielectrolito para la formación de las películas sobre el sustrato ITO. La segunda configuración contiene dos materiales sensibles, de nuevo, la ftalocianina de cobre sulfonada por sus propiedades mencionadas y, además, una nanoarcilla de halloysita (HNT) que se espera que actúe como fijador de la $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ en la estructura y mejore las prestaciones del sensor.

El estudio de estas dos configuraciones tiene como objetivo comprobar que el uso del nanomaterial HNT proporciona una mejor respuesta en la señal del sensor debido a una mejor adhesión de las películas sobre el sustrato.

El número de veces que se repite la secuencia puede jugar un papel importante en la respuesta electroquímica de los sensores. Para estudiar su efecto se



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

realizaron las configuraciones con diferentes números de secuencias. Los sensores preparados fueron:

- ❖ $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_1$, $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_5$ y $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_{10}$.
- ❖ $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_1$, $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_5$ y $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_{10}$

4.1.2. Caracterización de los sensores LbL nanoestructurados por espectroscopía UV-Vis

Para la evaluación del crecimiento de las películas delgadas por la técnica de Layer by Layer se ha utilizado la espectroscopía Ultravioleta-Visible.

En primer lugar, se caracterizaron los materiales que componen el sensor individualmente: PEI, HNT y $\text{CuPc}^{\text{S03-}}$. Después se registraron los espectros UV-Vis con número creciente de capas, desde $n=1$ hasta $n=10$, para cada sensor $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})$ y $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})$.

Los espectros de los materiales utilizados se muestran a continuación (**Figura 39**):

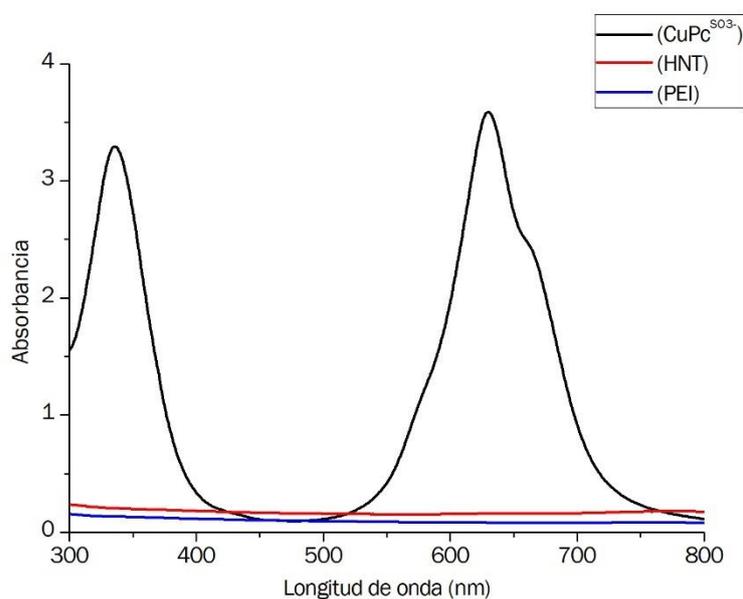


Figura 39. Espectro UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de los materiales $\text{CuPc}^{\text{S03-}}$, HNT y PEI.

Tal y como se esperaba, el polímero PEI y la nanoarcilla HNT no tiene picos de absorción en el rango analizado. Sin embargo, la ftalocianina de cobre presenta dos picos característicos, uno a 620 nm denominado banda Q y otro a 340 nm denominado banda B (véase 2.3.1.).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del sensor con secuencia $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$

A continuación, se realizó el espectro de la película $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$ capa a capa, desde $n=1$ hasta $n=10$, obteniendo lo que se muestra en la **Figura 40**. Se puede observar el pico correspondiente a la banda Q (620 nm), que es la responsable de la transición $\pi - \pi^*$ [54].

El estudio de la caracterización mostró un comportamiento lineal de la absorbancia al aumentar el número de capas depositadas sobre el sustrato. Si bien, se observó que la absorbancia de capa 10 disminuyó con respecto a la capa anterior, lo que puede ser debido a un desprendimiento o mala adhesión de la ftalocianina de cobre de la capa 9 a la capa 10. A pesar de ello, el coeficiente de regresión de la recta Absorbancia vs. Número de capas fue de 0,9308 (**Figura 41**).

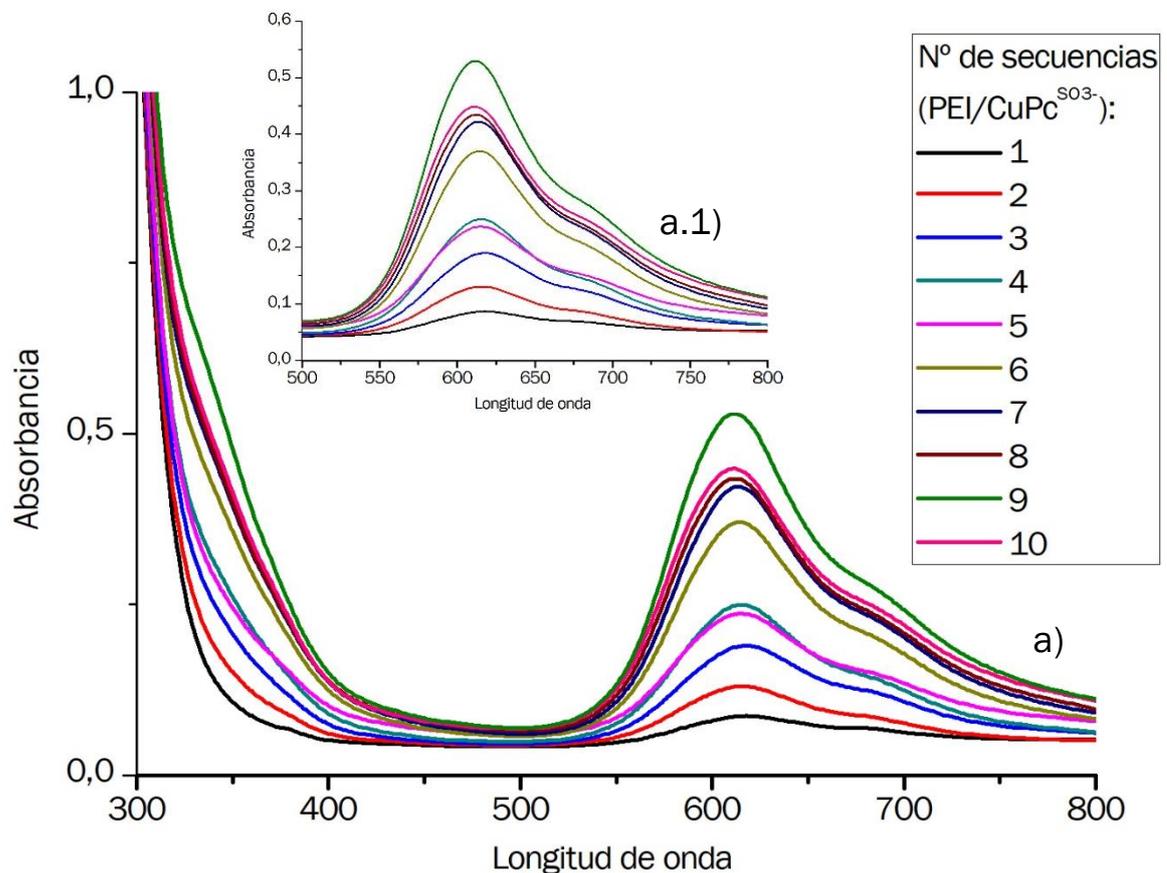


Figura 40. a) Espectros UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de películas $(PEI/CuPc^{SO_3^-})$ con diferente número de capas. a.1) Ampliación del pico correspondiente a una longitud de onda de 620 nm.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

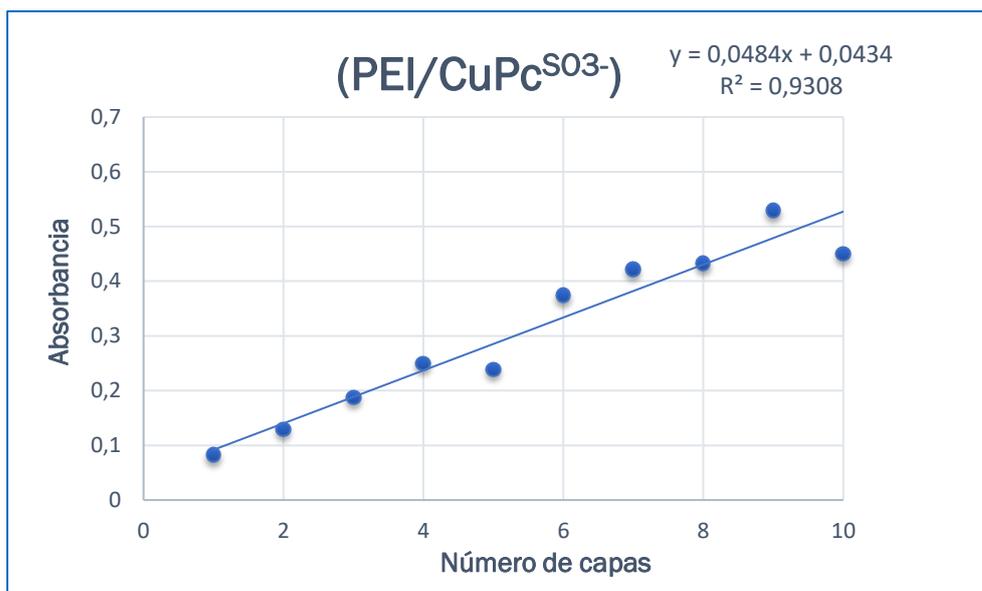


Figura 41. Ajuste lineal entre el número creciente de capas y la absorbancia de banda Q situada a 620 nm para $(PEI/CuPc^{SO_3^-})$.

Caracterización del sensor con secuencia $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})$

A continuación, se introdujo la HNT a la secuencia para estudiar su comportamiento. Al igual que en el caso anterior, se registraron los espectros UV-Vis de la secuencia $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$, desde $n=1$ hasta $n=10$, obteniendo lo mostrado en la **Figura 42**. Se observa un aumento de la absorbancia correspondiente a la banda Q en torno a una longitud de onda de 620 nm al igual que para $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_n$, ya que es debido a la presencia de $CuPc^{SO_3^-}$.

En este caso se observó que con 10 secuencias completas para el sensor $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})$ presenta una absorbancia mayor de la banda Q (abs. $\approx 0,65$) frente a la observada para la frecuencia $(PEI/CuPc^{SO_3^-})$ (abs. $\approx 0,55$), lo que se traduce en que la presencia de HNT facilita que la cantidad de $CuPc^{SO_3^-}$ depositada en las películas sea mayor.

Además, se observa la banda B o banda de Soret a una longitud de onda de 320 nm, correspondiente a la metalftalocianina de cobre. La aparición de la banda Soret en la secuencia realizada con nanoarcilla se debe a la mejor adhesión de la ftalocianina en la estructura LbL.

También se observó una mayor homogeneidad en el crecimiento de las capas que se produce por la mejor adhesión de la metalftalocianina, obteniéndose una relación lineal entre el número de capas y la absorbancia de $R^2=0,9988$, mejor que el obtenido sin HNT (**Figura 42**).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

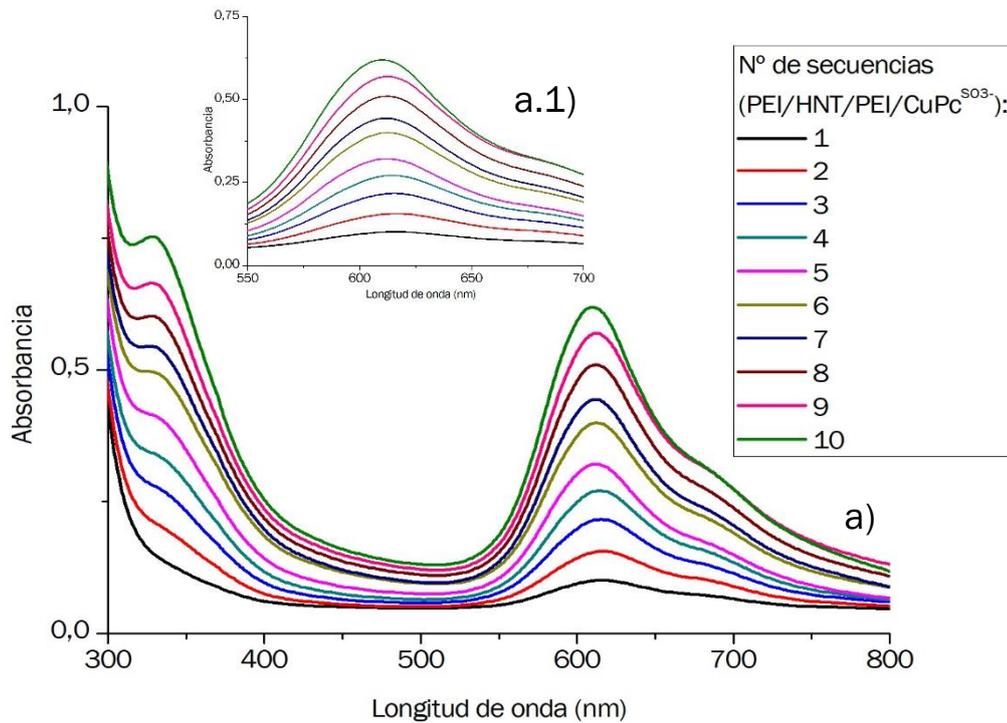


Figura 42. a) Espectros UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de películas LbL (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-}) con diferente número de capas. a.1) Ampliación del pico correspondiente a una longitud de onda de 620 nm.

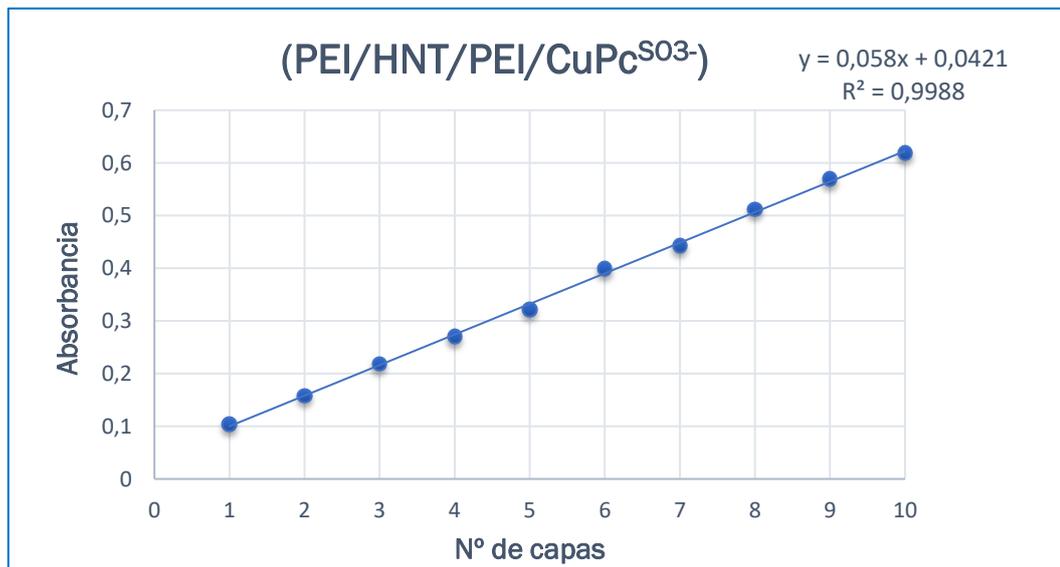


Figura 43. Ajuste lineal entre el número creciente de capas y la absorbancia de banda Q situada a 620 nm para (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-}).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

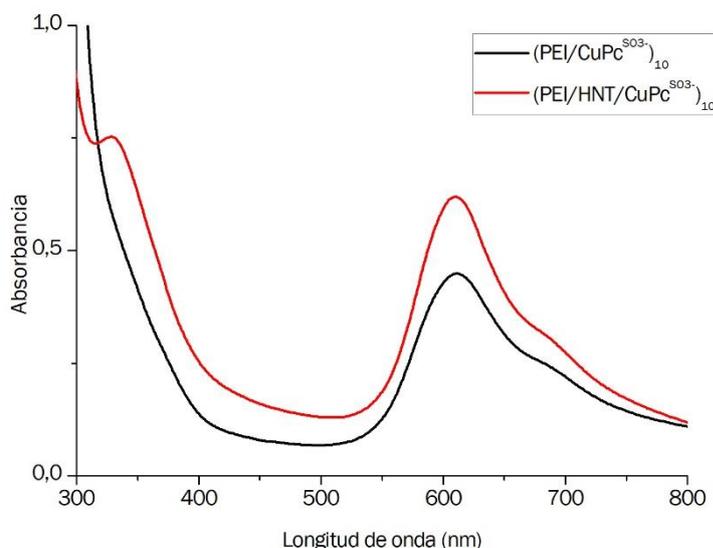


Figura 44. Espectro UV-Vis entre 300 nm y 800 nm de las películas de LbL para $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$ y $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$.

En forma de conclusión, se ha observado, que la adición de la nanoarcilla proporciona un sensor más uniforme y una mejora en la adhesión de las películas. La comparación de la última capa de cada sistema, con y sin HNT, se recoge en la **Figura 44**. Esto se debe a que la nanoarcilla es un material poroso que consigue que la adhesión de los materiales sea mayor. Un claro ejemplo de ello queda reflejado en la secuencia sin nanoarcilla de las capas 9 y 10, donde se produce una pérdida de absorbancia por desprendimiento de material o mala adhesión, hecho que no ha ocurrido con la presencia de HNT.

4.1.3. Caracterización de los sensores LbL nanoestructurados por espectroscopía FTIR

Mediante espectroscopía infrarroja se han registrado los espectros de las películas para monitorizar el crecimiento de estas. El principal objetivo de este análisis será identificar los grupos funcionales de la molécula para los que se observan diferentes bandas características y estudiar el aumento de la transmitancia al aumentar el espesor.

El espectro infrarrojo se realizó en películas depositadas sobre un sustrato de seleniuro de zinc (ZnSe) y se evaluó entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} . Primero, se han analizado los materiales individuales usados para el desarrollo del sensor (HNT, $CuPc^{SO_3^-}$ y PEI) utilizando el método de drop-cast para la deposición del material sobre el sustrato. También se analizaron las películas realizadas por LbL $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$ y $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la siguiente figura se muestran los espectros FTIR para los diferentes materiales, PEI, HNT y $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$.

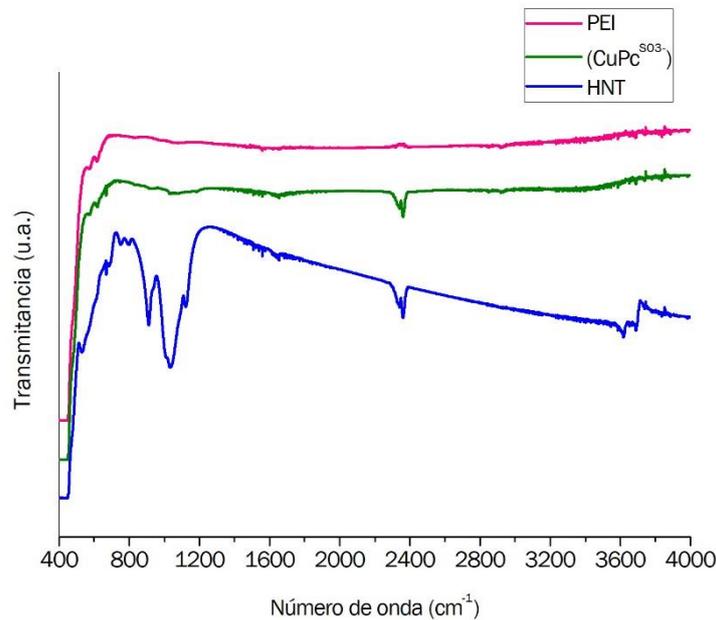


Figura 45. Espectro FTIR de los materiales utilizados para la fabricación del sensor.

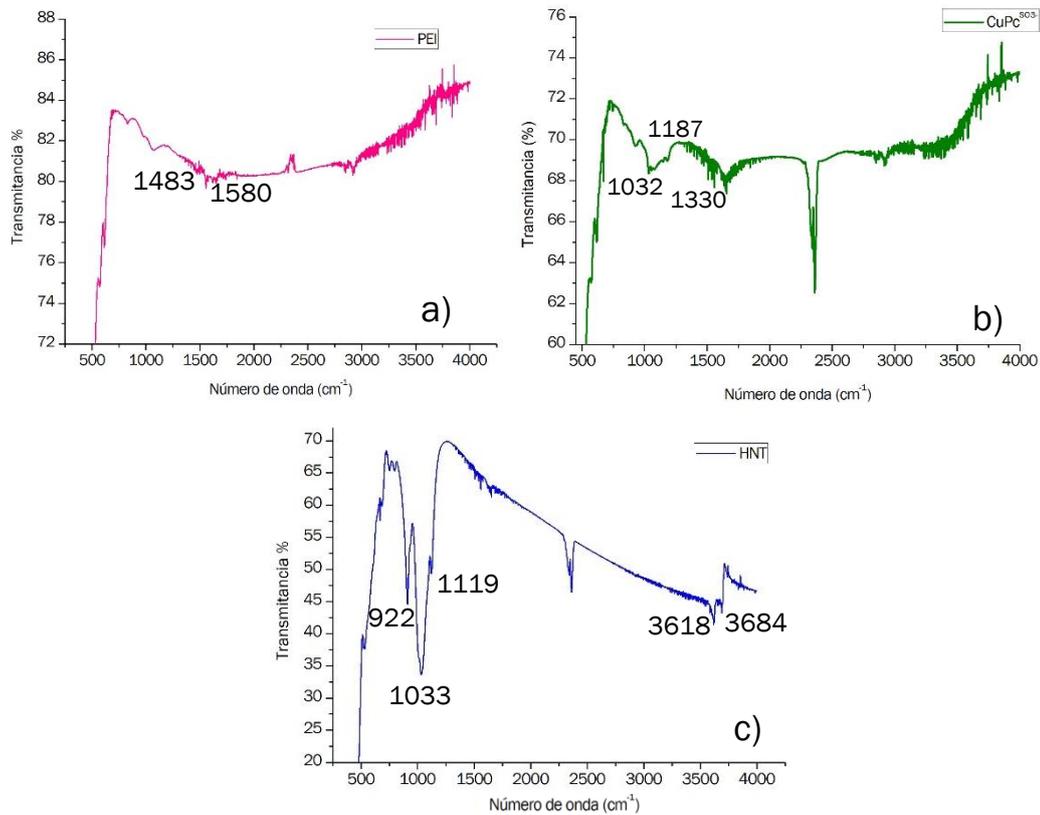


Figura 46. Espectro FTIR de los materiales depositados para la fabricación del sensor: a) PEI b) $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ y c) HNT.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la **Figura 46** el espectro correspondiente a la polietilenimina (PEI) contiene dos bandas características correspondientes a la vibración de flexión del grupo imina N-H a 1580 cm^{-1} y la que se corresponde a la vibración de flexión del enlace C-H a 1483 cm^{-1} [24].

Para el caso de la ftalocianina de cobre, **Figura 46**, se observan tres picos. El primero a una longitud de onda de 1032 cm^{-1} asociado a la vibración del enlace C-N del pirrol, en torno a 1187 cm^{-1} aparece el pico del grupo sulfónico, mientras que a 1330 cm^{-1} aparece la banda de deformación del enlace C-C del grupo isoindol [55].

Para finalizar, en el espectro infrarrojo de la nanoarcilla HNT podemos encontrar la vibración del grupo O-H intermolecular a 922 cm^{-1} [56]. El enlace correspondiente a la vibración de tensión del enlace Si-O [56] se produce a 1033 cm^{-1} y el de reflexión a 1119 cm^{-1} . Por último, se observaron los enlaces vibracionales de AL-O-Si y Si-O-Si [56] a 3619 cm^{-1} y 3684 cm^{-1} respectivamente.

Una vez caracterizadas las interacciones características en cada compuesto de forma individual, se estudiaron las películas LbL de las secuencias implementadas en los sensores $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$ y $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$ con el fin de corroborar la adhesión de las mismas por fuerzas electrostáticas.

Sensor con secuencia $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$

En la siguiente figura se comparan los espectros de los materiales PEI y $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ y $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$ (**Figura 47**).

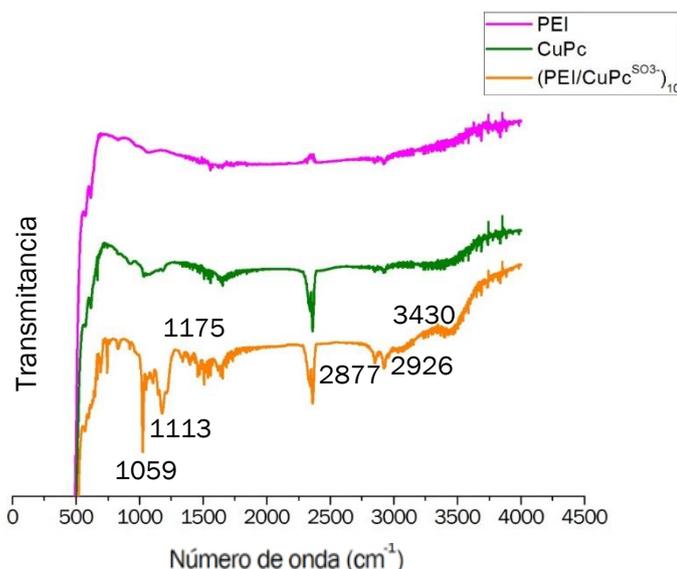


Figura 47. Espectro comparativo FTIR de los materiales PEI y $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ con la secuencia LbL $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el espectro de $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$ se observó la aparición de una banda a 3430 cm^{-1} producido por el grupo NH_3^+ procedente del PEI [24]. También aparecen dos bandas solapadas más atenuadas a 2926 cm^{-1} y 2877 cm^{-1} correspondientes a la vibración de tensión del enlace C-H y dos bandas fuertes correspondientes al enlace por tensión del S=O a 1059 cm^{-1} y 1113 cm^{-1} [24]. Por último, la banda correspondiente al grupo sulfónico aparece más atenuada y desplazada y a 1175 cm^{-1} con respecto a 1187 cm^{-1} . Estos cambios corroboran la formación de las películas y la correcta adherencia de los materiales mediante fuerzas electrostáticas.

Sensor con secuencia $(\text{PE}/\text{HNT}/\text{PE}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$

En la figura que se muestra a continuación (**Figura 48**), se observan los espectros infrarrojo de los materiales PEI, $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ y HNT junto con la secuencia $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})$:

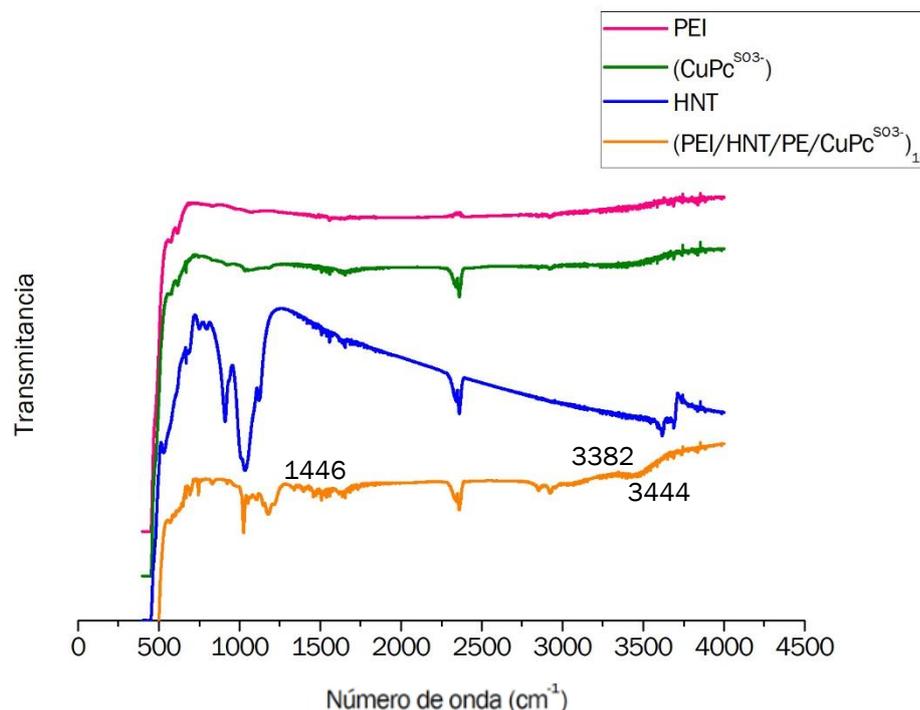


Figura 48. Espectro comparativo FTIR de los materiales PEI, HNT y $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ con la secuencia LbL $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$.

Como se observa en la figura, se producen dos picos por la tensión simétrica y asimétrica del enlace N-H por el PEI a 3382 cm^{-1} y 3444 cm^{-1} [24]. Además, hay un desplazamiento del enlace N-H por flexión del PEI que se desplaza hacia



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el rojo de 1580 a 1446 cm^{-1} lo que se atribuye a la formación de enlaces polares de la arcilla con la imina del PEI [24]. Se sigue observando en el espectro el enlace producido entre $\text{SO}_3^- \text{NH}_3$ entre el grupo de la imina del PEI y la ftalocianina de cobre lo que indica la unión supramolecular entre las diferentes capas de las películas LbL.

4.2. MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

En este apartado se presentarán los resultados obtenidos del análisis electroquímico de los sensores y el biosensor desarrollados. Esto incluye el estudio de su respuesta frente a catecol para caracterizar el cumplimiento electroquímico y evaluar el cumplimiento como sensores.

Para la representación de los voltamogramas se ha usado el software OriginPro v8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

4.2.1. Respuesta voltamétrica de los sensores no enzimáticos LbL frente a catecol

Para comenzar el estudio voltamétrico de los sensores, primero se realizó un acondicionamiento de los sensores para registrar su respuesta frente al electrolito utilizado (KCl $0,1\text{ M}$) para la disolución de catecol.

Para acondicionar el sensor se realizó una voltamperometría cíclica en KCl $0,1\text{ M}$ entre los potenciales de ventana $-1,0\text{ V}$ y $1,2\text{ V}$, realizando 10 ciclos en cada medida. En la **Figura 49**, se muestra el último ciclo del voltamograma realizado tras el acondicionamiento de los sensores $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$ y $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$.

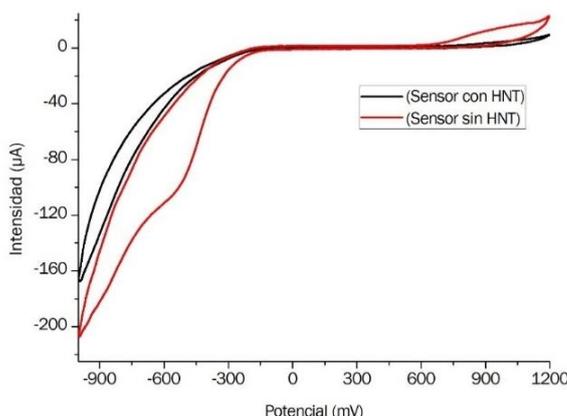


Figura 49. Respuesta voltamétrica de los sensores $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$ y $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$ en $(\text{KCl } 0,1\text{ M})$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la figura anterior, los sensores no presentan ningún pico característico de oxidación-reducción. Sí se observan unas bajadas alargadas de los voltamogramas a potenciales negativos que se deben a la descomposición del agua.

Para determinar la configuración del sensor que presente una mejor respuesta frente al analito (catecol 10^{-3} M), se testaron por electroquímica las dos estructuras diferentes estudiadas hasta el momento (con y sin HNT). También se ha analizado la respuesta de películas con diferente número de capas con el fin de evaluar si el número de inmersiones puede mejorar las propiedades electroquímicas del sensor, es decir, si a mayor número de películas de ftalocianina de cobre (que actúa como material electrocatalítico) y/o de nanoarcilla halloysita (que actúa fijando mejor la $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$) aumenta la transferencia electroquímica del sensor desarrollado.

Para comenzar se analizó un sustrato de ITO en una disolución de catecol 10^{-3} M en KCl 0,1 M, se estudió su voltamograma para poder compararlo con los de los ITOs modificados. Se eligió un potencial entre -1,0 V y 1,2 V y se realizaron 10 ciclos completos representando el último de estos. (**Figura 50**)

Al realizar la voltametría cíclica en catecol se produce la oxidación del analito a su forma quinoide (benzoquinona) y en el scan reverso la reducción a catecol.

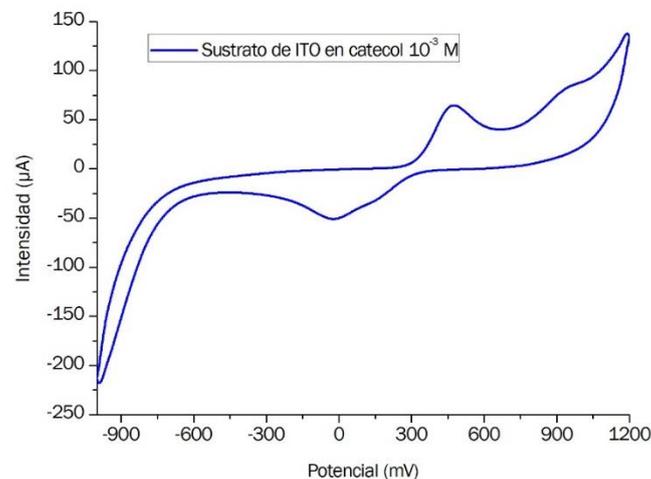


Figura 50. Representación voltamétrica de un sustrato de ITO sin modificar en catecol 10^{-3} M.

Como se observa en el voltamograma de la **Figura 50**, el ITO sin modificar presenta los picos correspondientes a la oxidación y reducción del catecol, con una intensidad para el pico catódico de $-50 \mu\text{A}$ a un potencial de -20 mV. Los picos anódicos que presenta aparecen a un potencial de oxidación de 450 mV y 920 mV con unas intensidades de $60 \mu\text{A}$ y $75 \mu\text{A}$ respectivamente.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensor con secuencia (PEI/CuPc^{SO3-})_n

Se estudiaron por voltametría cíclica las configuraciones (PEI/CuPc^{SO3-})₁, (PEI/CuPc^{SO3-})₅ y (PEI/CuPc^{SO3-})₁₀. El potencial de ventana empleado fue de -1,0 V a 1,2 V. Primero se realizaron 10 ciclos en KCl 0,1 M para acondicionar los sensores y obtener su respuesta electroquímica en el electrolito. A continuación, se volvieron a testar los mismos sensores en una disolución de catecol 10⁻³ M, realizando el mismo número de ciclos.

Para la representación de los voltamperogramas se ha seleccionado el último ciclo de cada medida como se observa en el siguiente gráfico comparativo:

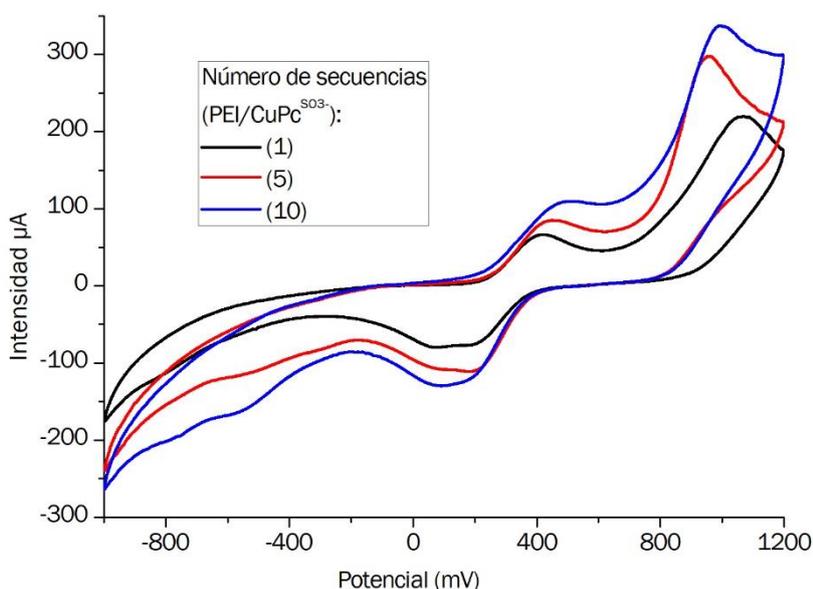


Figura 51. Voltametría cíclica entre el potencial -1000 mV y 1200 mV de las secuencias (PEI/CuPc^{SO3-})_n.

La intensidad de la señal en los picos de oxidación y reducción aumenta en presencia de las películas LbL (**Figura 51**). La modificación del ITO con metalftalocianina de cobre permite que se produzca una mejora en la transferencia electrónica.

A medida que aumenta el número de secuencias de 1 a 10, las intensidades de los picos, tanto anódicos como catódicos, aumentan progresivamente. Las intensidades de los picos aumentan considerablemente con respecto al sustrato de ITO limpio.

En las siguientes tablas se muestran las diferentes intensidades y potenciales de reducción correspondientes a los picos anódicos (oxidación) como catódicos (reducción):



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Picos anódicos obtenidos para la secuencia (PEI/CuPc^{S03-})_n.

Picos anódicos (oxidación)	Potencial (mV)	Intensidad (μA)
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₁	420	65
	1050	220
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₅	425	85
	950	300
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₁₀	500	110
	975	340

Tabla 12. Picos catódicos obtenidos para la secuencia (PEI/CuPc^{S03-})_n.

Picos catódicos (reducción)	Potencial (mV)	Intensidad (μA)
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₁	125	-75
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₅	140	-110
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₁₀	125	-130

Como conclusión, se ha confirmado que a mayor número de capas depositadas mayor es la intensidad sobre la respuesta voltamétrica a consecuencia de la mejora de transferencia de carga facilitada por las moléculas de CuPc^{S03-}.

La aparición de dos picos de oxidación está en controversia dependiendo de la bibliografía consultada. Según algunos autores, el pico a potenciales mayores se atribuye a la oxidación de catecol, mientras que el pico de oxidación a potenciales menores, se atribuyen a la formación del dímero de catecol, que polimeriza. Otros autores atribuyen los dos picos a la oxidación en dos pasos del catecol, con la pérdida del primer electrón a un potencial y la siguiente pérdida del segundo electrón a un potencial mayor [57].



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensor con secuencia (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})_n

Como en el caso anterior, se prepararon películas con las configuraciones (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁, (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₅ y (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀ con HNT. Al igual que para el sensor sin nanoarcilla, se estabilizó el sensor en KCl 0,1 M con 10 ciclos y con el mismo potencial de ventana, (-1,0 V a 1,2 V). Después se analizó en catecol 10⁻³ M durante 10 ciclos y se representó el último ciclo de cada sensor como se muestra en la **Figura 52**:

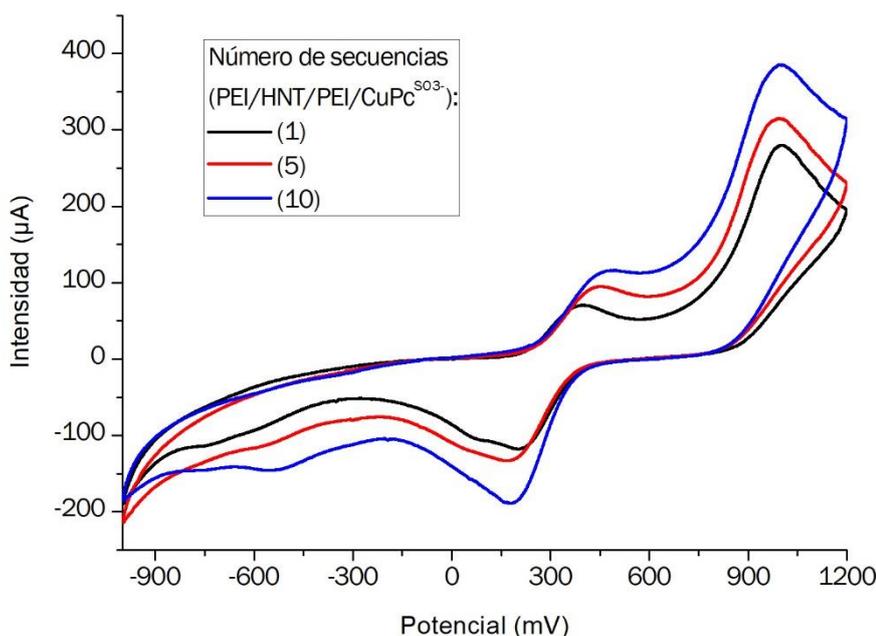


Figura 52. Voltametría cíclica entre el potencial -1,0 V y 1,2 V de las secuencias (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})_n

Como ocurre en el caso sin nanoarcilla, se estudia la respuesta del sustrato modificado y sin modificar. La intensidad de la señal en los picos de oxidación y reducción varía en presencia de la película y aumenta con cada capa añadida.

Al aumentar el número de capas depositadas en el ITO, la intensidad de los voltamogramas aumenta debido a una mejor transferencia electrónica facilitada por la metalftalocianina de cobre. En las siguientes tablas se muestran las diferentes intensidades y potenciales de reducción correspondientes a los picos anódicos (oxidación) como catódicos (reducción):



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Picos anódicos obtenidos para la secuencia (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})_n.

Picos anódicos (oxidación)	Potencial (mV)	Intensidad (μA)
(PEI/HNT/PEI/CuPc ^{S03-}) ₁	390,0	65,1
	1000,0	275,5
(PEI/HNT/PEI/CuPc ^{S03-}) ₅	450,0	90,7
	990,0	310,4
(PEI/HNT/PEI/CuPc ^{S03-}) ₁₀	475,0	115,4
	980,0	380,7

Tabla 14. Picos catódicos obtenidos para la secuencia (PEI/CuPc^{S03-})_n.

Picos catódicos (reducción)	Potencial (mV)	Intensidad (μA)
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₁	175,0	-110,6
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₅	180,0	-125,7
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₁₀	180,0	-190,3

Comparando estos valores con los correspondientes al sensor sin HNT, se puede observar que la presencia de la nanoarcilla en el sistema multiensamblado da lugar a voltamogramas con intensidades más grandes tanto en los picos de oxidación como en el pico de reducción, especialmente en el caso de 10 capas (**Figura 53.c**). Además, la presencia de HNT también mejora la reversibilidad de los procesos redox, disminuyendo ligeramente la distancia entre los picos. Este resultado corrobora que la HNT permite una mejor adhesión de la metalftalocianina y, con ello, una mejora en la transferencia electrónica.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

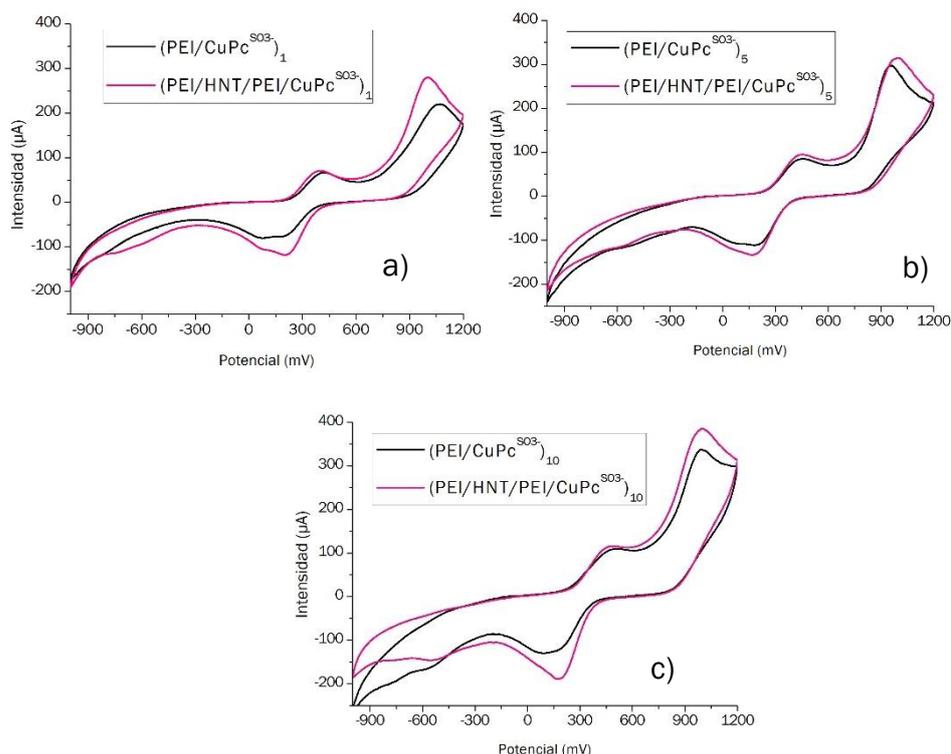


Figura 53. Representación voltamétrica entre las secuencias: a) $(PEI/CuPc^{SO_3})_1$ y $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3})_1$. b) $(PEI/CuPc^{SO_3})_5$ y $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3})_5$. c) $(PEI/CuPc^{SO_3})_{10}$ y $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3})_{10}$.

El mejor sensor que ofreció mayores intensidades frente a catecol fue el de mayor número de capas, $n=10$, siendo $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3})_{10}$ seguido de $(PEI/CuPc^{SO_3})_{10}$. Por lo tanto, los resultados que se presentan a continuación se centrarán en estas dos secuencias y se compararán.

4.2.1.1. Estudio de la reproducibilidad

Se ha realizado un estudio de reproducibilidad de los sensores $(PEI/CuPc^{SO_3})_{10}$ y $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3})_{10}$, para comparar la fiabilidad de los mismos. Las condiciones de operación fueron las mismas que para los anteriores análisis: un potencial de ventana de $-1,0$ V a $1,2$ V en una disolución de catecol 10^{-3} M en KCl $0,1$ M y 10 repeticiones del ensayo.

Para el estudio de reproducibilidad se ha calculado el coeficiente de variación (CV) de las intensidades de los picos catódicos y anódicos seleccionados de tres sensores desarrollados en las mismas condiciones de operación, pero en tres días diferentes.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reproducibilidad del sensor $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$

Se realizó la medida voltamétrica de 10 ciclos y se representó el último de cada sensor. (*Figura 54*)

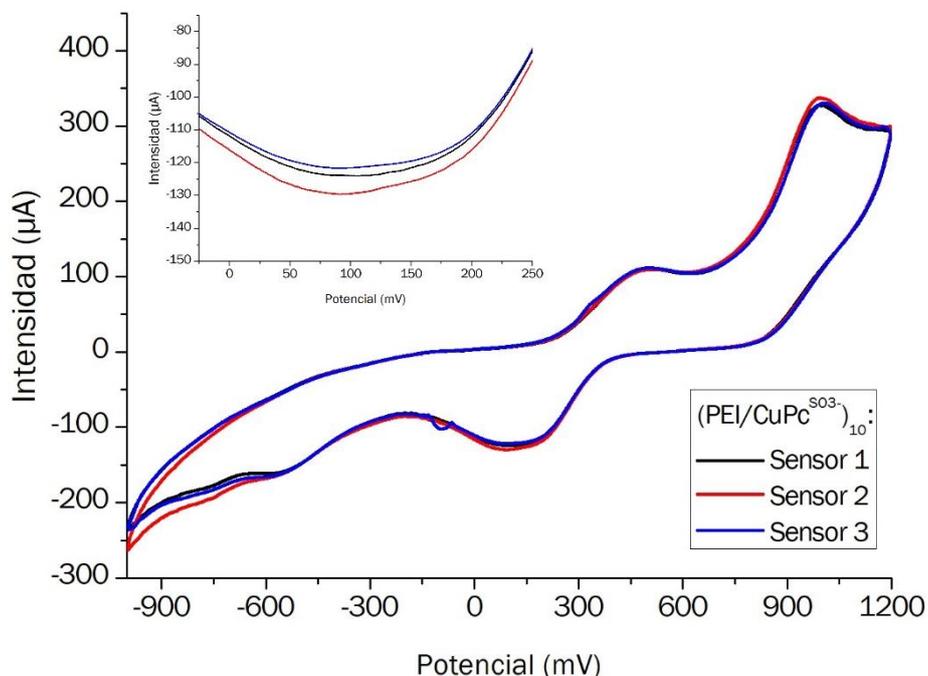


Figura 54. a) Voltamogramas de 3 sensores $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$. preparados con las mismas condiciones para el estudio de la reproducibilidad a.1) Detalle del pico catódico.

Las intensidades del pico catódico en torno a un potencial de 125 mV y del pico anódico más intenso, que aparece en torno a 995 mV, se recogen en la *Tabla 5*.

Tabla 15. Picos catódicos y anódicos obtenidos para los tres sensores $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$.

	Intensidad (μA) Pico catódico	Intensidad (μA) Pico anódico
Sensor 1	-128,98	326,4
Sensor 2	-128,4	336,8
Sensor 3	-126,6	329,7



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta voltamétrica de los tres sensores da como resultado un coeficiente de variación para el pico catódico de $CV=0,94\%$ y para el pico anódico $CV=1,62\%$, siendo unos resultados aceptables.

Reproducibilidad del sensor $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$

Al igual que para el caso anterior, se realizó la voltametría cíclica de tres sensores con nanoarcilla realizados en las mismas condiciones de operación, pero en diferentes días, se seleccionó para el estudio el último ciclo de cada voltamograma. (**Figura 55**)

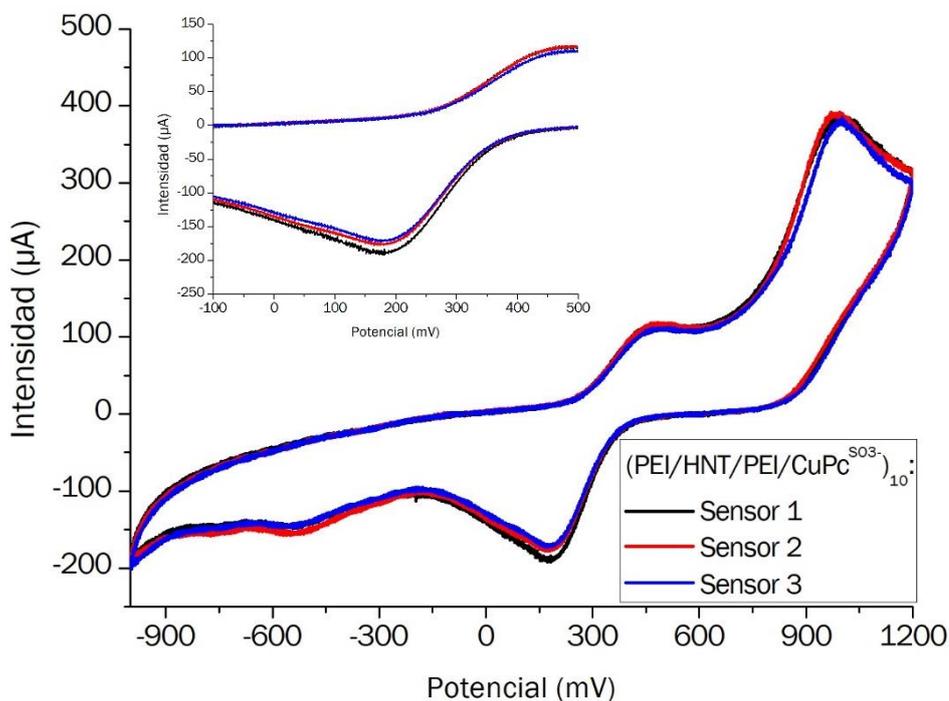


Figura 55. a) Voltamogramas de 3 sensores $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$ preparados con las mismas condiciones para el estudio de la reproducibilidad.
a.1) Detalle del pico catódico.

La respuesta de los tres sensores analizados da como resultado un coeficiente de variación de $CV=3,78\%$ para el pico catódico a un potencial de 180 mV y para el pico anódico a 985 mV es $CV=1,58\%$. A continuación, se representan en la **Tabla 6** las correspondientes intensidades:



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 16. Picos catódicos y anódicos obtenidos para los tres sensores (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3})₁₀.

	Intensidad (μA) Pico catódico	Intensidad (μA) Pico anódico
Sensor 1	-188,5	384,1
Sensor 2	-177,2	388,7
Sensor 3	-176,2	376,7

Como queda reflejado para ambas configuraciones, (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3})₁₀ Y (PEI/CuPc^{SO3})₁₀ los coeficientes de variación del estudio de la reproducibilidad son aceptables, permitiendo fabricar sensores fiables que ofrecen la misma respuesta electroquímica con errores menores del 5%.

4.2.1.2. Estudio de la repetitividad

La repetitividad de los sensores, entendida en términos de estabilidad, se ha realizado ciclando los sensores 5 veces consecutivas mediante voltametría cíclica en el potencial de ventana habitual de trabajo, -1,0 V a 1,2 V, en una muestra de catecol 10^{-3} M en KCl 0,1 M. Como criterio de aceptabilidad se usó también el coeficiente de variación.

Repetitividad del sensor (PEI/CuPc^{SO3})₁₀

El estudio voltamperométrico de 5 ciclos consecutivos de un sensor sin nanoarcilla se refleja en la **Figura 56**:



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

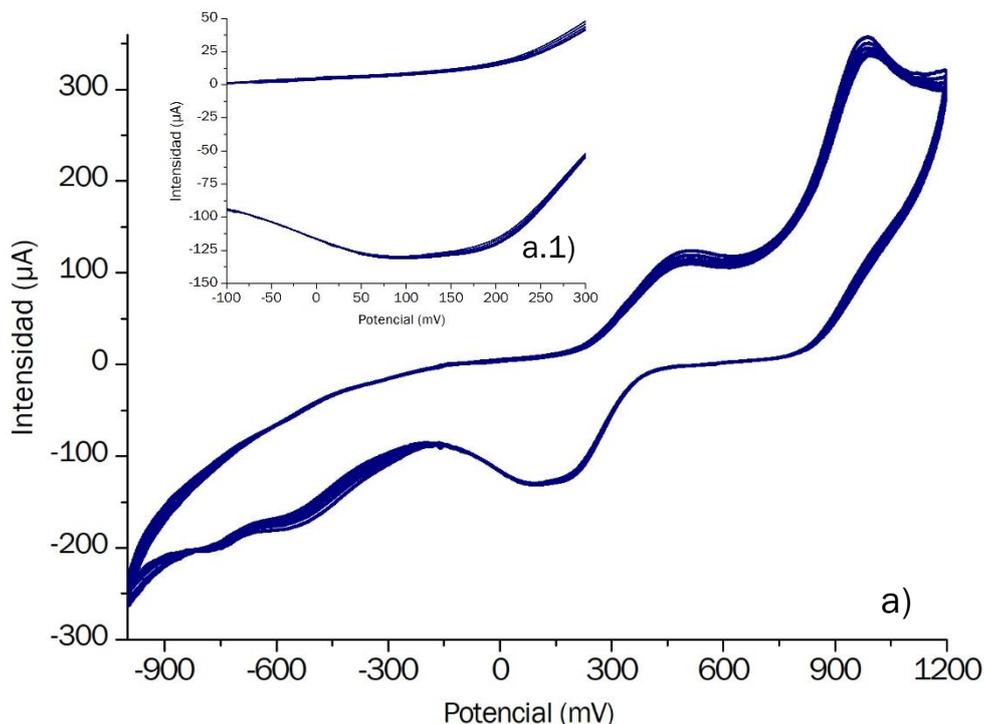


Figura 56. a) Representación voltamétrica de 5 ciclos para el estudio de la repetitividad del sensor (PEI/CuPc^{SO3-})₁₀. a.1) Ampliación del pico catódico.

Los valores de la intensidad del pico catódico a 125 mV y del pico anódico a 995 mV para cada ciclo se muestran en la **Tabla 7**:

Tabla 17. Intensidad de los picos catódicos y anódicos obtenidos para los cinco ciclos de (PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

	Intensidad (µA) Pico catódico	Intensidad (µA) Pico anódico
Ciclo 1	-129,0	355,8
Ciclo 2	-128,5	349,5
Ciclo 3	-127,7	344,2
Ciclo 4	-126,7	340,4
Ciclo 5	-125,7	338,5

Se obtiene un coeficiente de variación CV=1,05% para el pico catódico y CV=2,04% para el pico anódico, lo que evidencia la alta repetitividad del sensor.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Repetitividad del sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀

De idéntica forma se realizó un estudio voltamperométrico de 5 ciclos consecutivos de un sensor con nanoarcilla. (**Figura 57**)

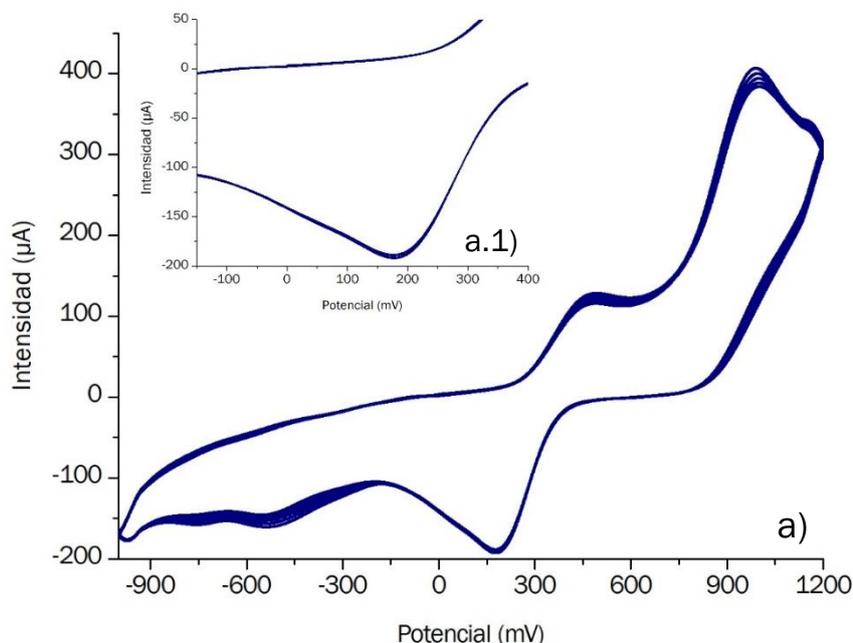


Figura 57. a) Representación voltamétrica de 5 ciclos para el estudio de la repetitividad del sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀. a.1) Ampliación del pico catódico.

Tomando los valores de la intensidad del pico catódico a 180 mV para cada ciclo se obtiene un coeficiente de variación del CV=0,66%. Para el pico anódico que se presenta a un potencial de 985 mV se obtiene un CV=2,08%. En la siguiente tabla se representan las diferentes intensidades para los distintos ciclos:

Tabla 18. Intensidades de los picos catódicos y anódicos obtenidos para los cinco ciclos de (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

	Intensidad (µA) Pico catódico	Intensidad (µA) Pico anódico
Ciclo 1	-192,6	403,9
Ciclo 2	-192,6	401,0
Ciclo 3	-191,3	390,8
Ciclo 4	-190,6	387,3
Ciclo 5	-189,7	385,9



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como conclusión del estudio de la repetitividad, ambos sensores han mostrado una alta repetitividad y, por lo tanto, aporta fiabilidad en la adquisición de las medidas realizadas.

4.2.1.3. Estudio de los límites de detección de los sensores

Para determinar los límites de detección de los sensores frente a catecol, se llevaron a cabo ensayos de voltametría cíclica en disoluciones con concentraciones crecientes de catecol. Se calculó el límite de detección (LOD o LDD) para cada sensor en el pico anódico, que es el que mejor se ha observado.

Para la realización de la voltametría cíclica se partió de un volumen inicial en la celda electrolítica de 50 mL de KCl 0,1 M. A continuación, se testó el sensor 5 ciclos para su estabilización y acondicionamiento en el electrolito y, después, se fueron realizando adiciones de catecol 10^{-3} M (**Tabla 9**). Tras cada adición se realizó una voltametría de 5 ciclos, representando el último ciclo de cada estudio.

Límite de detección para el sensor (PEI/CuPc^{S03})₁₀

Para el estudio del LOD se evaluó la intensidad del pico anódico a 420 mV. En la siguiente tabla se recogen las adiciones realizadas y la concentración final de catecol en la celda electroquímica:

Tabla 19. Adiciones realizadas de catecol y concentración en la celda electroquímica.

Volumen final adicionado de catecol (μ L)	Concentración final (μ M)
500	9,9
1000	19,6
1400	27,2
2000	38,5
3000	56,6
3500	65,4
4000	74,1
6000	107,1
6500	115,0
7500	130,4
8000	137,9

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes figuras (*Figura 58* y *Figura 59*) se muestran los voltamogramas obtenidos para cada adición y su ampliación del pico anódico en torno a 420 mV:

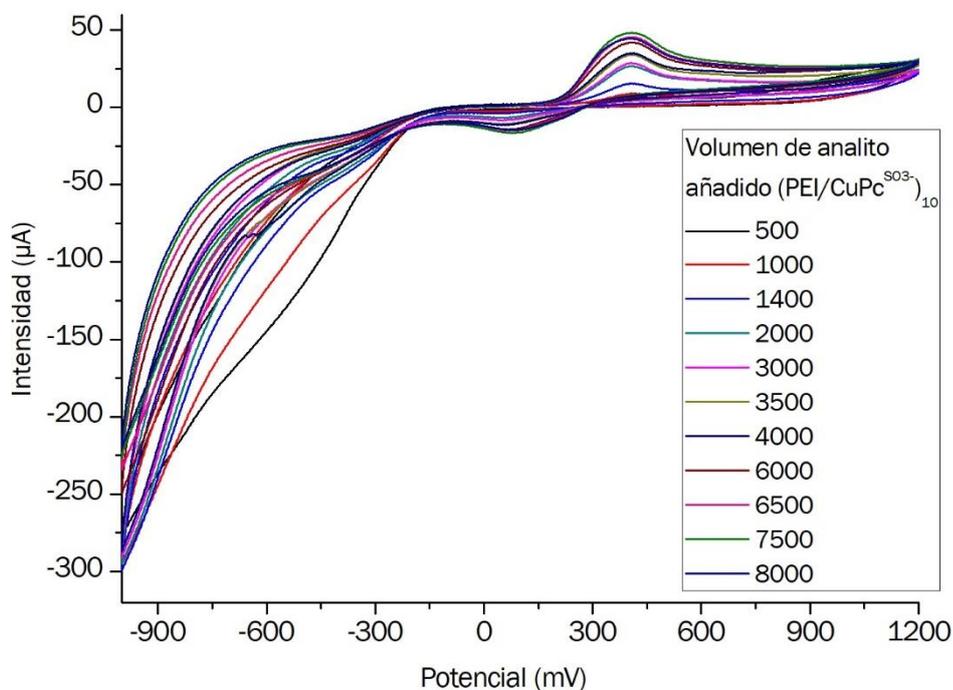


Figura 58. Representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10^{-3} M para el sensor $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_{10}$.

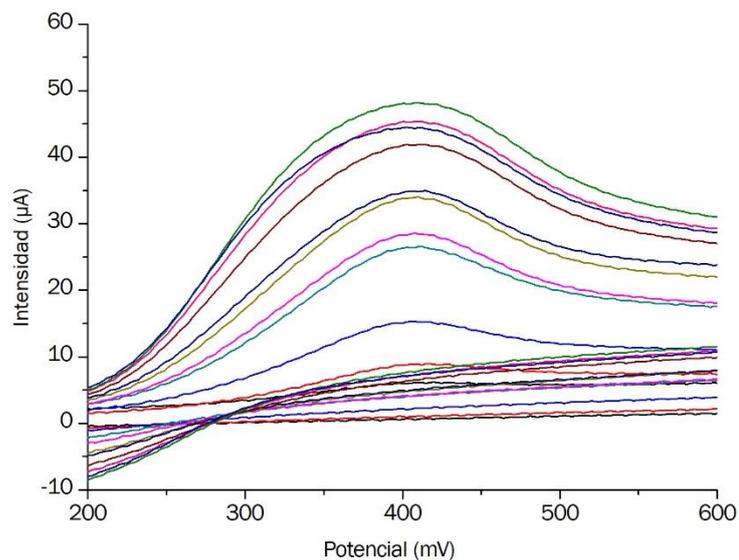


Figura 59. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10^{-3} M para el sensor $(\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{S03-}})_{10}$.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ecuación usada para el cálculo del límite de detección (LDD) es:

$$LDD(catecol) = \frac{3 \cdot \sigma}{m}$$

Ecuación 17 –Límite de detección

Siendo σ la desviación típica de la intensidad de los últimos 5 ciclos que se obtuvieron con el sensor en el blanco (KCl 0,1 M) en el pico de oxidación/reducción analizado (en este caso a 420 mV) y m la pendiente de la recta de calibrado obtenida al representar la concentración final frente a la intensidad. Se obtuvo una regresión lineal con un $R^2=0,9345$ tal y como se observa en la **Figura 60**, con un límite de detección de $1,16 \cdot 10^{-6}$ M:

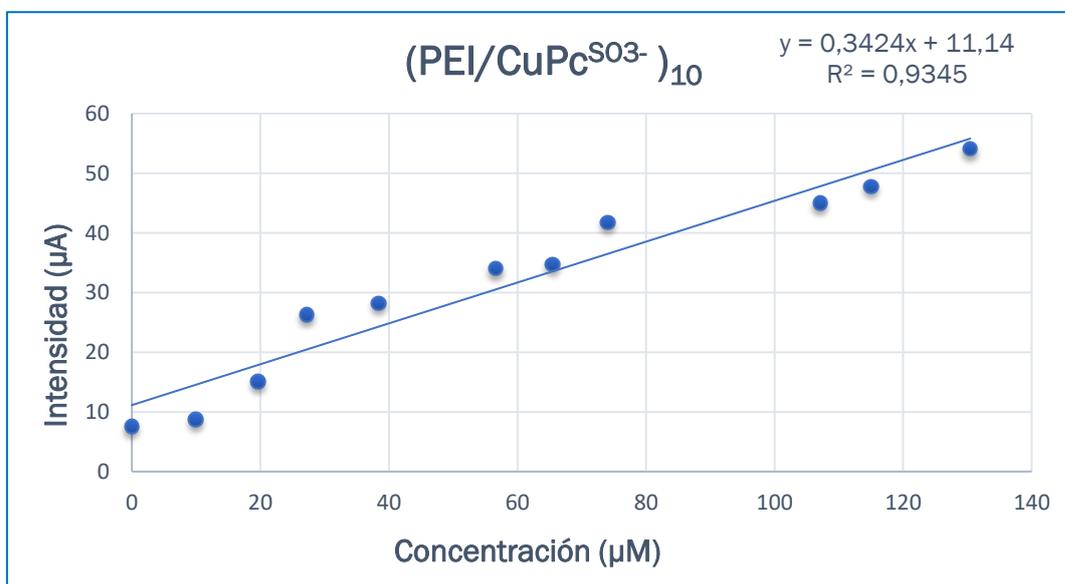


Figura 60. Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de catecol 10^{-3} M para el sensor $(PEI/CuPc^{SO3-})_{10}$.

$$LDD(catecol) = \frac{3 \cdot 0,1321 \mu A}{0,3424 \mu A/\mu M} = 1,16 \mu M = 1,16 \cdot 10^{-6} M$$

Ecuación 18.- Límite de detección anódico en catecol del sensor $(PEI/CuPC^{SO3-})_{10}$.

Límite de detección para el sensor $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})_{10}$

En este caso, para el estudio del LOD del sensor que contiene HNT, también se analizó para el pico anódico que aparece torno a 425 mV. Las adiciones realizadas y la concentración final de catecol en la celda electroquímica fueron las mismas que las recogidas en la **Tabla 9**.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes figuras se muestran los voltamogramas y la ampliación del pico anódico en torno a 425 mV:

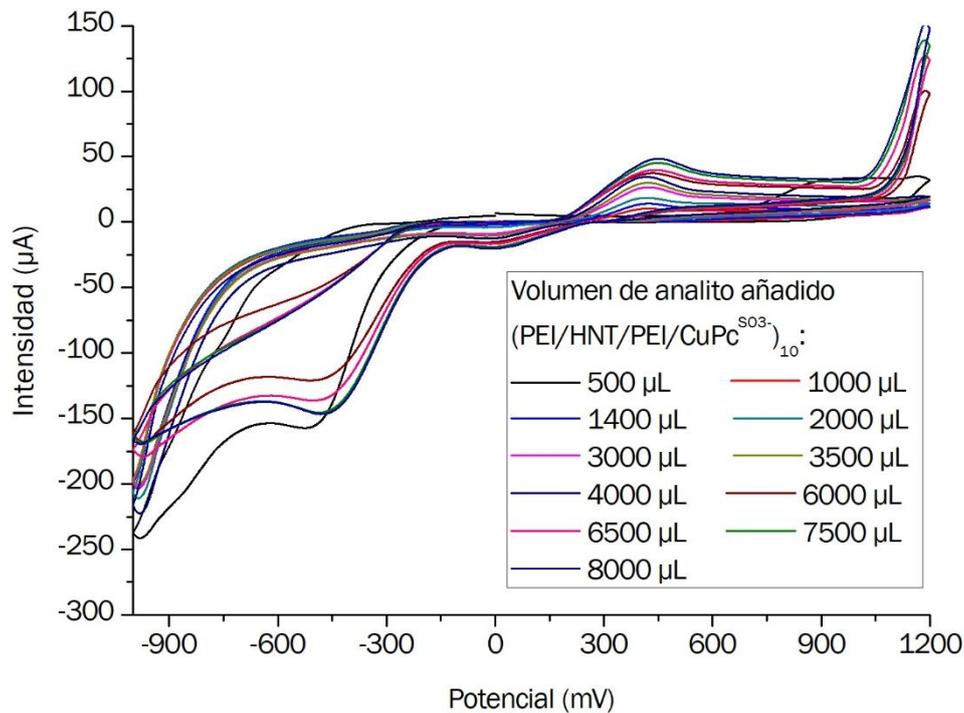


Figura 61. Representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol $10^{-3} M$ para el sensor $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$.

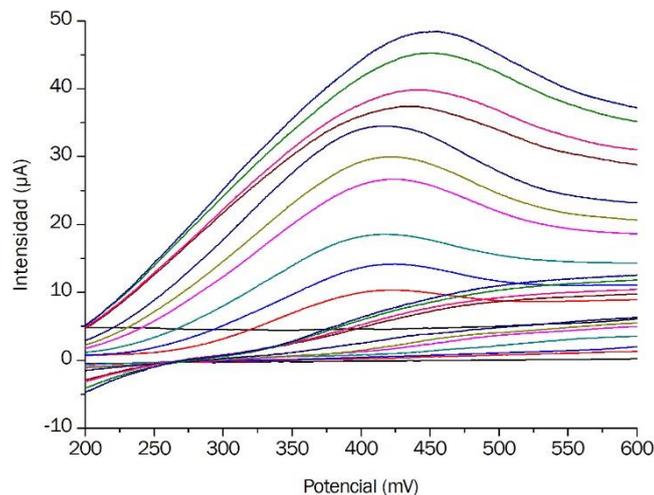


Figura 62. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol $10^{-3} M$ para el sensor $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se representó la intensidad de pico frente a la concentración de catecol, para obtener la pendiente de la recta y la regresión lineal:

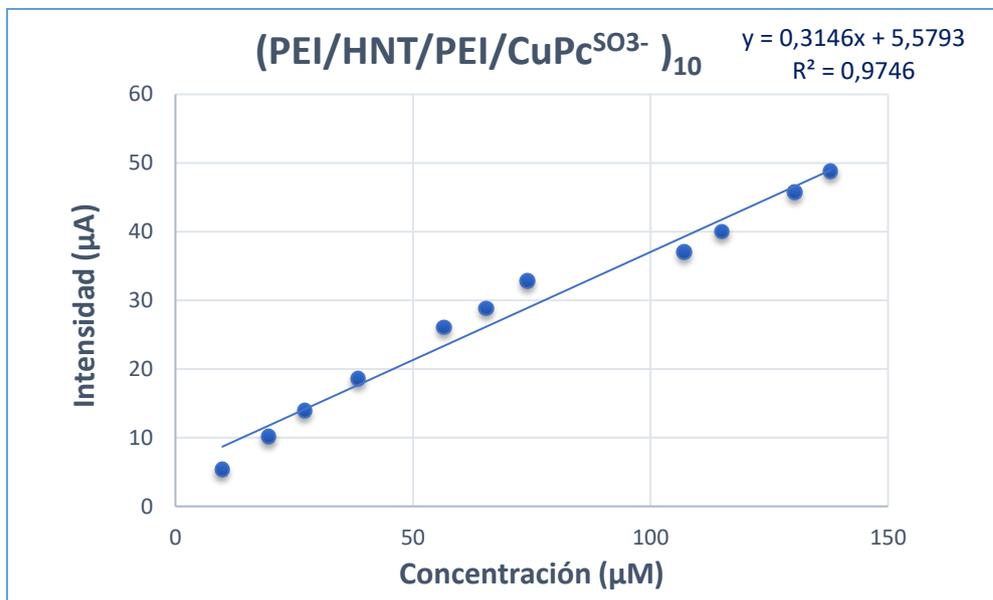


Figura 63. Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de catecol 10^{-3} M para el sensor $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$.

Como en el caso anterior, se usó también la **Ecuación 17** para el cálculo del límite de detección de catecol. El resultado obtenido es el siguiente:

$$LDD(\text{catecol}) = \frac{3 \cdot 0,1035 \mu\text{A}}{0,3146 \mu\text{A}/\mu\text{M}} = 0,987 \mu\text{M} = 0,987 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

Ecuación 19.- Límite de detección del sensor anódico en catecol del sensor $(\text{PEI}/\text{HNT}/\text{PEI}/\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-})_{10}$.

Analizando los resultados obtenidos para los LDDs, se puede observar que el uso de la nanoarcilla ha aportado una mejora en el límite de detección ya que, aunque el valor numérico obtenido en cada caso es del mismo orden, la regresión lineal obtenida con HNT con un $R^2=0,9746$ presenta una linealidad mayor que sin HNT y este hecho también hace que el sensor con HNT ofrezca mejores prestaciones en la detección de catecol.

Los límites de detección se han comparado con otros límites obtenidos para otros sensores electroquímicos de catecol, previamente publicados, tal y como se muestra en la **Tabla 10**:



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20. Parámetros analíticos de sensores nanoestructurados frente al catecol.

Electrodo	Potencial aplicado (V)	Sensibilidad ($\mu\text{A}/(\mu\text{M})$)	Rango (μM)	R ²	LDD (μM)
(PEI/CuPc ^{S03-}) ₁₀	0,42	0,3424	10-138	0,935	1,16
(PEI/HTN/PEI/CuPc ^{S03-}) ₁₀	0,43	0,3146	10-138	0,974	0,98
PEDOT/PSS [58]	1,1	0,2303	4-150	0,993	49,6
PEDOT/PSS/LuPc ₂ [58]	0,65	0,2048	4-150	0,999	1,23
PEDOT/PSS/CuPc [58]	1,1	0,3609	4-150	0,992	2,99
PEDOT/PSS/AuNP [58]	1,1	0,2500	4-150	0,998	2,18

4.2.1.4. Comportamiento dinámico de los sensores

Para saber qué mecanismo controla la reacción redox en nuestro sensor frente al catecol se realizó un estudio dinámico. Si la etapa limitante es la transferencia de electrones da lugar a un aumento lineal de la intensidad de corriente frente a la intensidad de barrido de potencial (I vs v) mientras que, si la etapa limitante es la difusión, aumenta linealmente frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (I vs $v^{1/2}$).

Para este estudio, se aplicó por voltametría cíclica a los sensores seleccionados anteriormente, (PEI/CuPc^{S03-})₁₀ y (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀, frente a catecol 10⁻³ M en KCl 0,1 M, aumentando la velocidad de barrido para cada medida en el rango de 10 mV/s a 2000 mV/s.

Resultados obtenidos para el sensor (PEI/CuPc^{S03-})₁₀

A continuación, se representan los voltamogramas y la ampliación del pico anódico (**Figura 64** y **Figura 65**) que, como se observa, se desplaza a potenciales mayores (600 mV-900 mV) a medida que aumenta la velocidad de barrido lo que se traduce en que el proceso redox es un proceso irreversible:

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

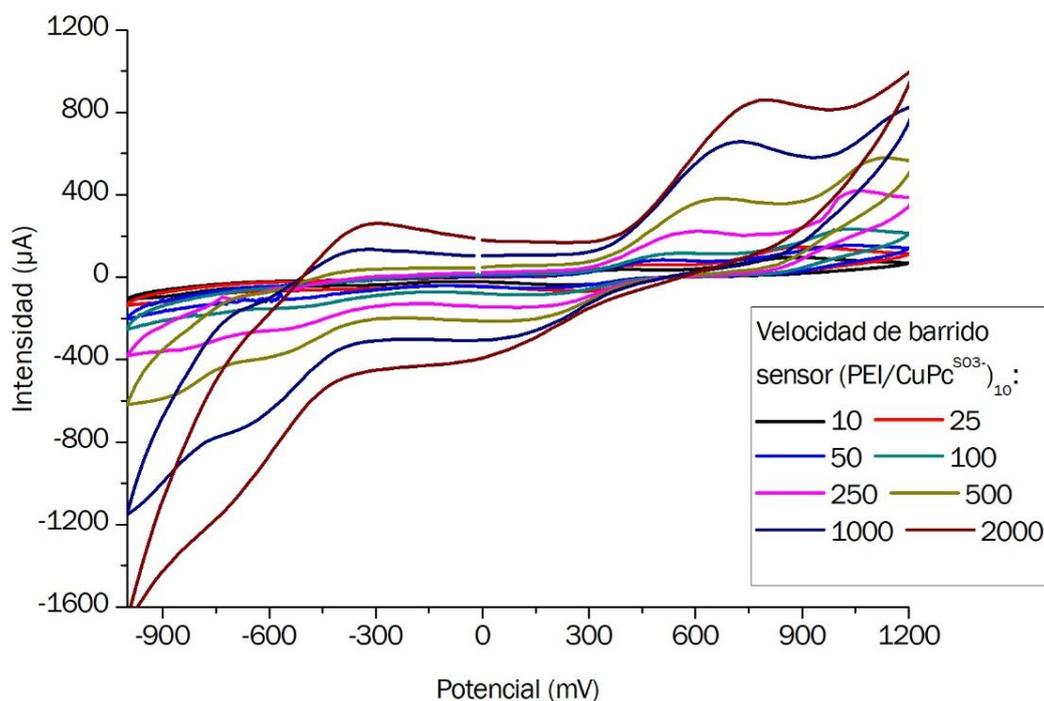


Figura 64. Representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol $10^{-3} M$ para el sensor $(PEI/CuPc^{SO_3})_{10}$.

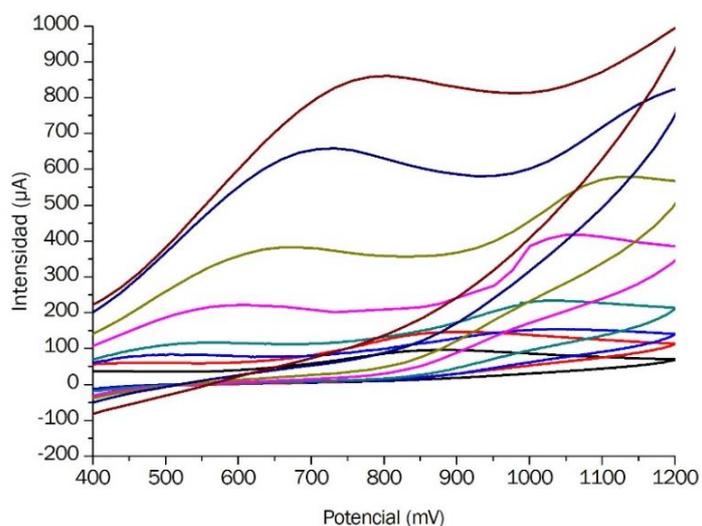


Figura 65. Ampliación del pico catódico de la Figura 64.

En la siguiente tabla (**Tabla 11**), se muestran las diferentes intensidades de pico obtenidas a cada velocidad de barrido:

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Intensidades de pico anódico frente a la velocidad de barrido utilizada en un sensor $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$ en catecol $10^{-3} M$.

Velocidad de barrido (mV/s)	Intensidad (μA)
10	92,5
25	52,11
50	74,97
100	110,36
250	225,27
500	379,94
1000	658,63
2000	853,07

Las siguientes figuras (**Figura 66** y **Figura 67**) muestran las regresiones lineales de la intensidad frente a la velocidad y a la raíz cuadrada de ésta.

Se obtuvo que la regresión lineal para el control por difusión es mucho mayor, $R^2=0,9757$ frente a $R^2=0,9395$, con lo que se puede afirmar que para este caso el mecanismo predominante es la difusión de iones del analito hacia la superficie del electrodo.

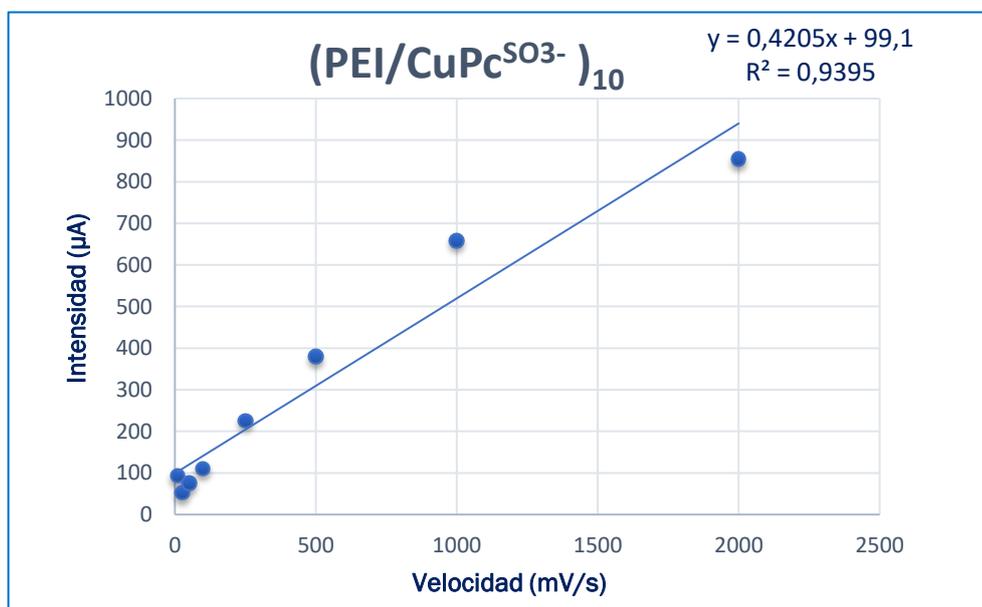


Figura 66. Representación de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido para el análisis de catecol $10^{-3} M$ para el sensor $(PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

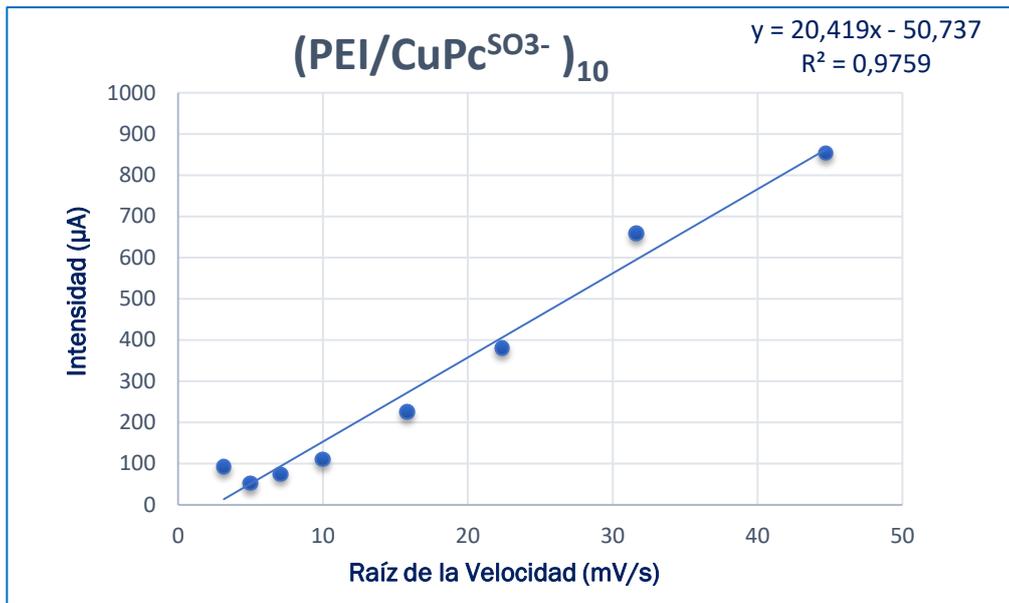


Figura 67. Representación de la intensidad de corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

Resultados obtenidos para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀

De la misma manera que para el sensor sin HNT, se representaron las voltametrías cíclicas con diferente velocidad de barrido en una disolución de catecol 10^{-3} M. (Figura 68 y Figura 69)

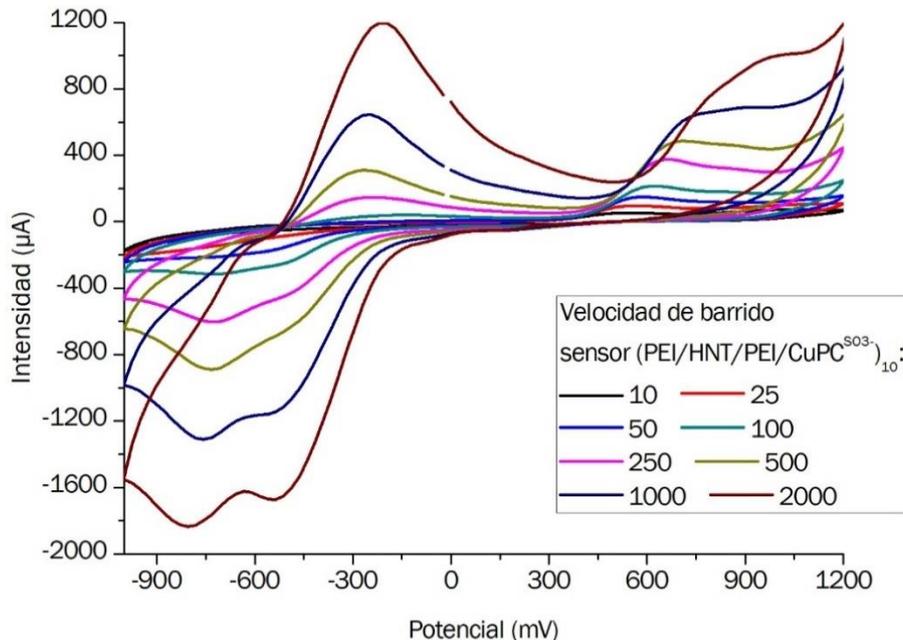


Figura 68. Representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

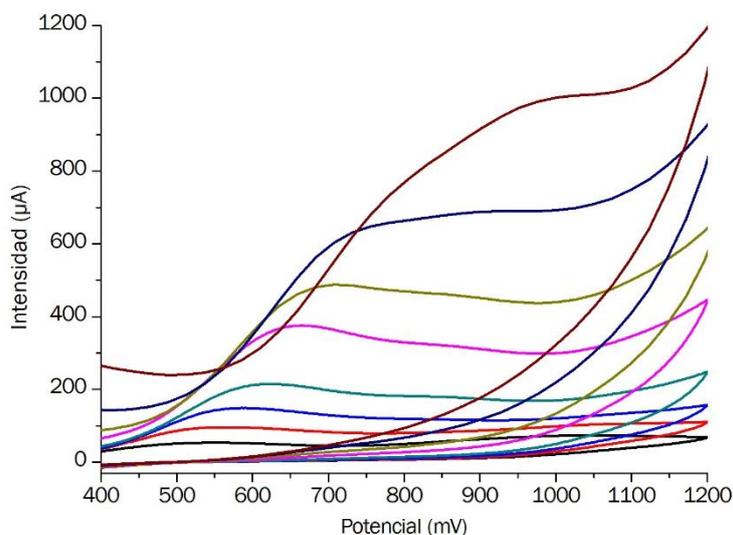


Figura 69. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol $10^{-3} M$ para el sensor $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3})_{10}$.

El análisis de la intensidad del pico anódico, que se sitúa entre 530 mV y 1050 mV, frente a la velocidad y a la raíz cuadrada de la velocidad se recoge en las siguiente tabla y figuras. (**Tabla 12**, **Figura 70** y **Figura 71**)

Tabla 12. Intensidades de pico anódico frente a la velocidad de barrido utilizada en un sensor $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3})_{10}$ en catecol $10^{-3} M$.

Velocidad de barrido (mV/s)	Intensidad (μA)
10	46,6
25	89,5
50	142,2
100	213,5
250	375,2
500	479,8
1000	684,7
2000	1003,5



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

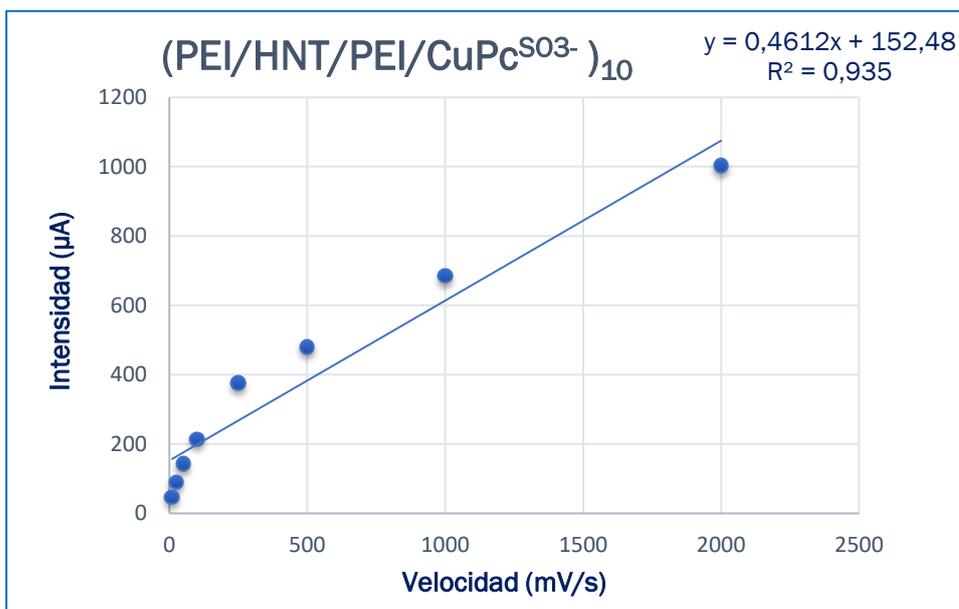


Figura 70. Representación de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

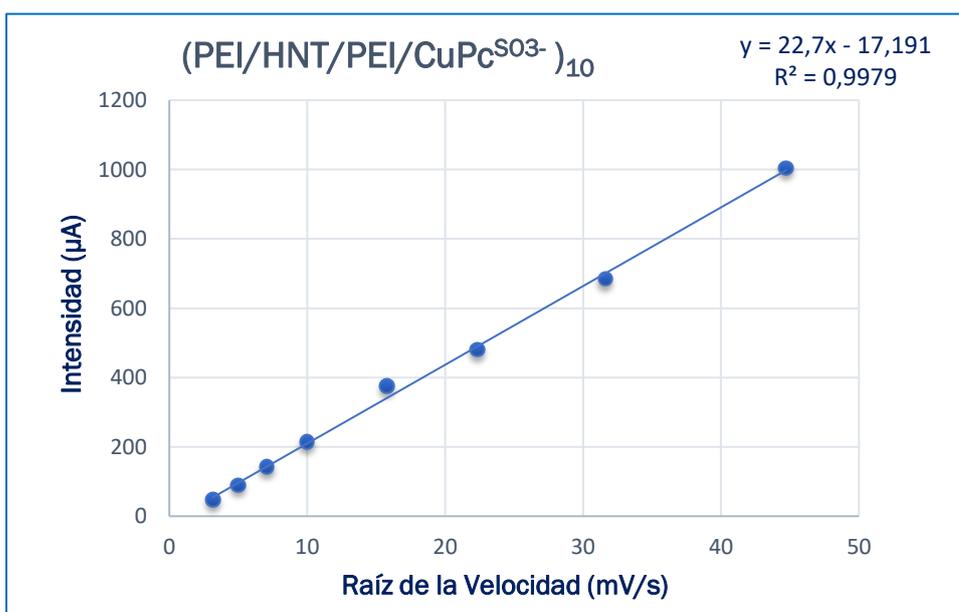


Figura 71. Representación de la intensidad de corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

En este caso, para el sensor modificado con HNT, también se ha obtenido que el mecanismo que controla el proceso redox es la difusión, obteniéndose un R^2 en el ajuste de 0,9979. También se ha observado que la presencia de HNT hace que el ajuste sea más lineal que sin HNT.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo tanto, en ambos casos, el mecanismo que controla la reacción redox es la difusión de los iones desde la matriz de la disolución hacia la superficie del electrodo.

4.2.2. Respuesta voltamétrica del biosensor frente al catecol

Una vez estudiado el comportamiento del sensor con nanoarcilla y sin ella, se ha desarrollado el biosensor de tirosinasa (TYR) a partir del sensor que mejores resultados ha ofrecido, siendo el seleccionado el sensor con nanoarcilla (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

Para la formación del biosensor se usó la técnica de inmovilización mediante la inmersión directa del sensor en glutaraldehído para la realización del entrecruzamiento. La concentración de la encima depositada es 5 mg/mL.

A continuación, se realiza un estudio de la actividad enzimática del biosensor, analizando la repetitividad, reproducibilidad del biosensor por voltametría cíclica y para finalizar, se hallará el límite de detección en catecol y el mecanismo de control del proceso redox.

4.2.2.1. Estudio de la actividad enzimática

Para el estudio de la actividad enzimática del biosensor de tirosinasa, (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR, se realizó el estudio mediante voltametría cíclica en catecol con las mismas operaciones de trabajo que para el estudio desarrollado con el sensor: potencial de barrido -1,0 V a 1,2 V, velocidad de barrido 100 mV/s y potencial inicial 0,0 V.

Para realizar la voltametría primero se estabilizó el biosensor con 5 ciclos en una disolución de KCl 0,1M, seguidamente, se llevó a cabo su estudio en catecol 10⁻³ M.

Como se observa en la **Figura 72** el biosensor no presenta picos característicos frente al electrolito de trabajo.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

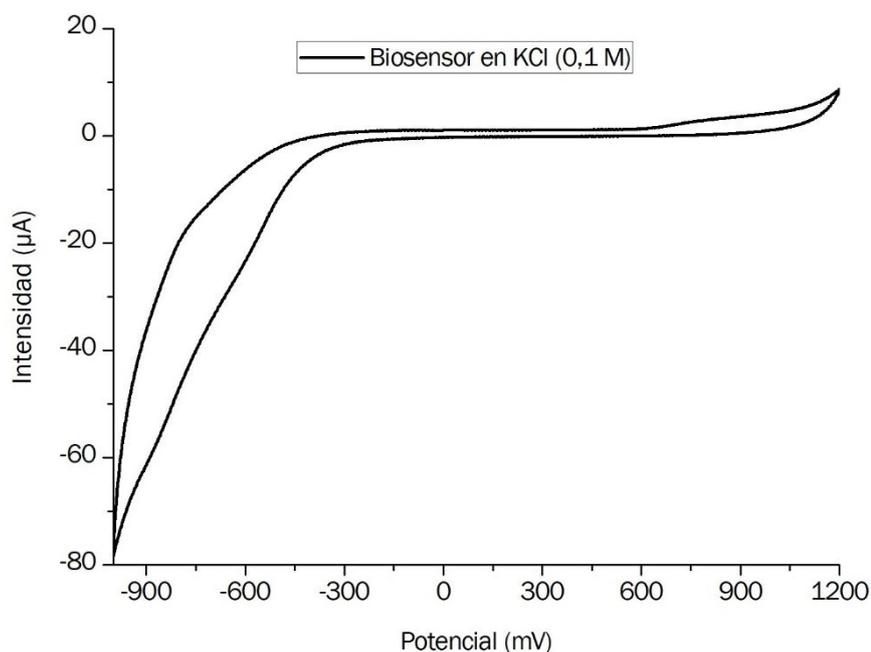


Figura 72. Respuesta voltamétrica de un biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR en el electrolito de trabajo KCl 0,1 M.

Como se observa en la **Figura 73** el biosensor ofrece una respuesta voltamétrica frente a catecol con dos picos de oxidación a 320 mV y 720 mV, y un pico catódico a 0,0 mV.

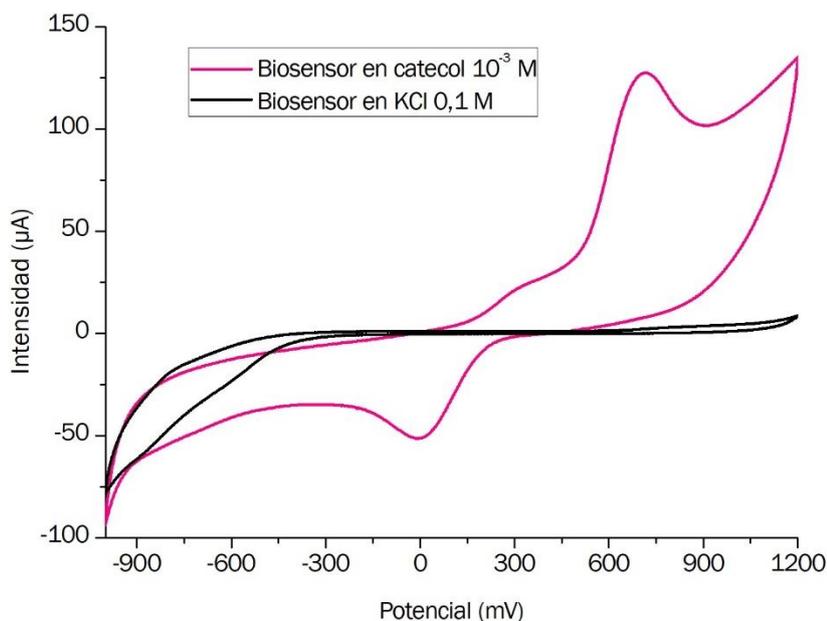


Figura 73. Comparación de la respuesta voltamétrica de un biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR en catecol 10⁻³ M frente al electrolito KCl 0,1 M.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por último, se comparó la respuesta del sensor nanoestructurado (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀ con la del mismo sensor con la enzima depositada, biosensor. La figura siguiente muestra dicha comparación:

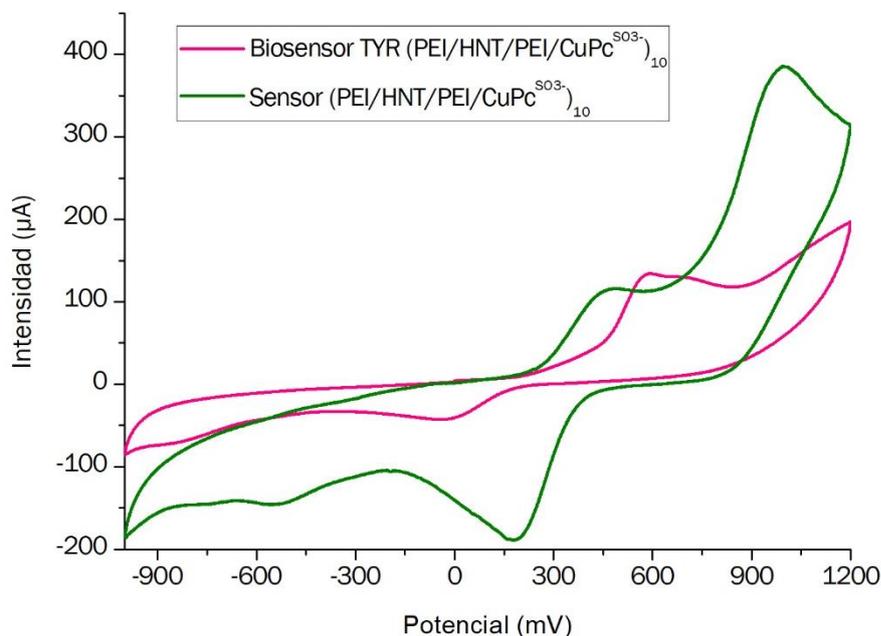


Figura 74. Comparación de la respuesta voltamétrica de un biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀ con enzima TYR frente al sensor no enzimático en catecol 10⁻³ M.

Tal y como se observa en la **Figura 74** el biosensor ofrece intensidades menores que el sensor no enzimático, si bien los picos de oxidación que presentaba el sensor no enzimático en torno a 980 mV y 475 mV, se han reducido a potenciales menores, 720 mV y 320, respectivamente. Este hecho significa que hay una mejora en la zona de oxidación, que se produce a potenciales menores.

4.2.2.2. Estudio de la reproducibilidad

Se realizó un estudio de reproducibilidad del biosensor enzimático (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR. Las condiciones de operación fueron las mismas que para los anteriores análisis: un potencial de ventana de -1,0 V a 1,2 V con una disolución de catecol 10⁻³ M en KCl 0,1 M.

Para el estudio de reproducibilidad, se ha empleado el criterio de coeficiente de variación entre las intensidades del pico anódico, como se ha estudiado anteriormente.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó el estudio con tres biosensores desarrollados en las mismas condiciones de operación, pero en tres días diferentes. El voltamograma obtenido es el que se muestra en la **Figura 75**:

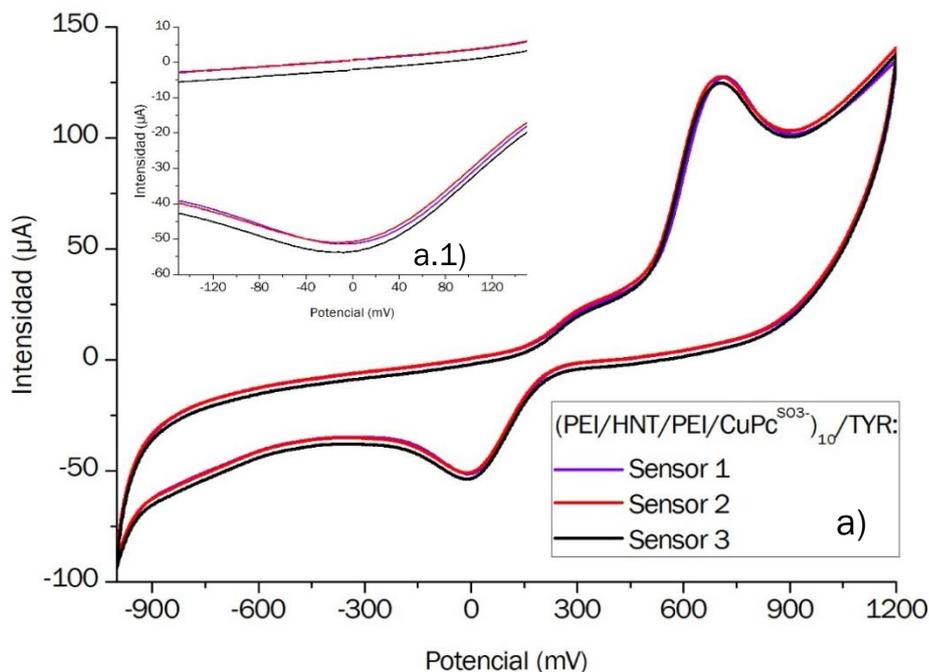


Figura 75. a) Representación voltamétrica de 3 biosensores para el estudio de la reproducibilidad de $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}/TYR$ a.1) Detalle del pico catódico.

Para la respuesta de los tres biosensores analizados se obtiene un coeficiente de variación de $CV=2,35\%$ para el pico catódico a un potencial de -10 mV y para el pico anódico a 700 mV es $CV=1,21\%$. A continuación, se representan las intensidades correspondientes de los picos catódicos y anódicos. (**Tabla 13**)

Tabla 13. Intensidades de los picos catódico y anódico obtenidas para los tres biosensores $(PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO_3^-})_{10}/TYR$.

	Intensidad (μA) Pico catódico	Intensidad (μA) Pico anódico
Sensor 1	-53,6	123,95
Sensor 2	-51,7	126,87
Sensor 3	-51,3	126,14

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.2.3. Estudio de la repetitividad

Para la realización del estudio de la repetitividad del biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR se realizaron 10 ciclos consecutivos de voltametría cíclica en el potencial de ventana habitual de trabajo, -1,0 V a 1,2 V en una muestra de catecol 10⁻³ M en KCl 0,1 M. Como criterio se usó el coeficiente de variación. Antes de testarlo en el analito se procedió a su estabilización en el electrolito KCl (0,1 M).

El estudio voltamperométrico de 5 ciclos consecutivos del biosensor con la enzima inmovilizada por cross-linking es el siguiente:

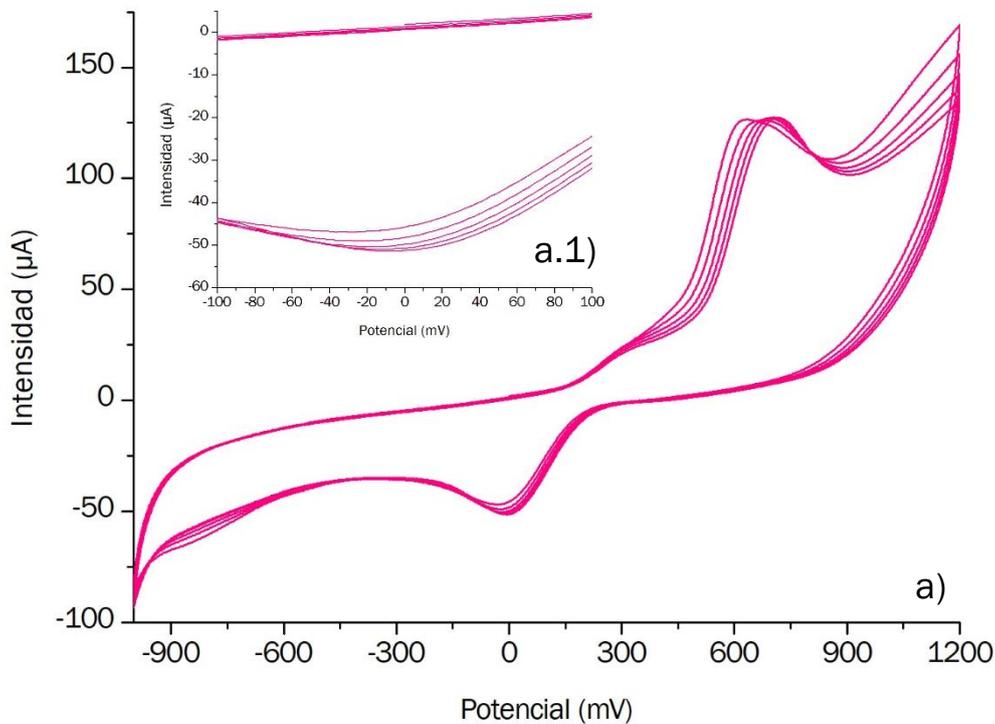


Figura 76. a) Representación voltamétrica de 5 ciclos para el estudio de la repetitividad de (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR. a.1) Ampliación del pico catódico.

A continuación, se representa una tabla con las intensidades del pico catódico (0,0 V) y del pico anódico que se encuentra en torno a 720 mV.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Intensidades del pico catódico y anódico obtenidos en los 5 ciclos en catecol 10^{-3} M.

	Intensidad (μ A) Pico catódico	Intensidad (μ A) Pico anódico
Ciclo 1	-51,6	125,7
Ciclo 2	-50,8	125,1
Ciclo 3	-49,9	124,5
Ciclo 4	-48,5	124,5
Ciclo 5	-46,1	125,1

Para el cálculo de la repetitividad del biosensor se usó, como para los estudios anteriores, el coeficiente de variación. Para el pico catódico se obtiene un coeficiente de variación $CV=0,391\%$ y para el caso del pico anódico un $CV=4,42\%$. Ambos valores dotan al sensor de una excelente repetitividad.

4.2.2.4. Estudio de los límites de detección

Para determinar la capacidad de detección del analito (catecol) por parte del biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{S03-})₁₀/TYR, se llevó a cabo una voltametría cíclica con adiciones de analito para calcular su LDD.

Para la realización de la voltametría cíclica con adiciones se parte de un volumen inicial en la celda electrolítica de 50 mL de la disolución de KCl 0,1 M. A continuación, se testó el biosensor 5 ciclos para su estabilización. Se fueron realizando adiciones de catecol 10^{-3} M de volúmenes conocidos, y tras cada adición se realizó una voltametría de 5 ciclos, representando el último ciclo de cada estudio.

Para el estudio del LOD se evaluó la intensidad correspondiente al pico anódico en torno a 320 mV de cada adición. Las adiciones realizadas y la concentración final de catecol en la celda electroquímica fueron las mismas que las recogidas en la **Tabla 9**.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

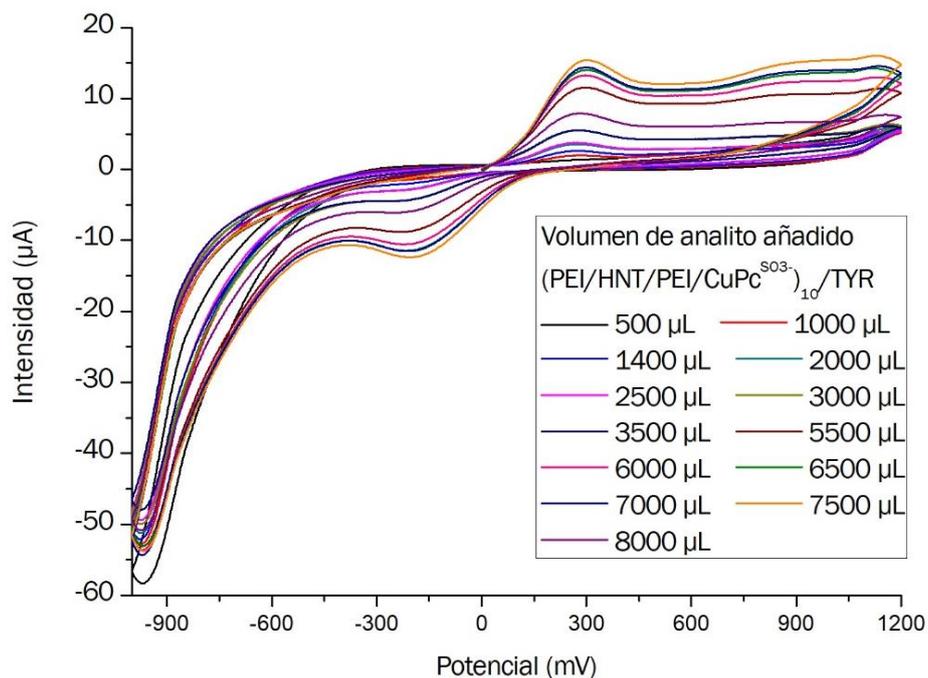


Figura 77. Representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3})₁₀/TYR.

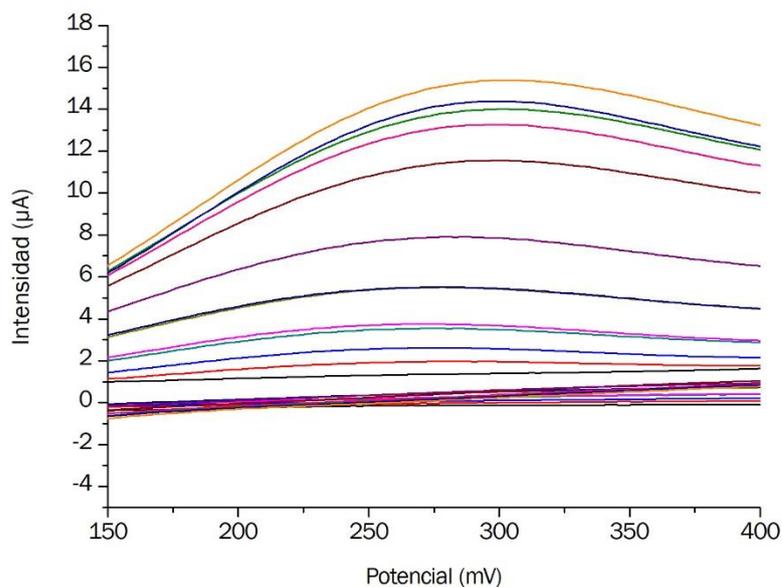


Figura 78. Ampliación de la representación voltamétrica de las diferentes adiciones de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3})₁₀/TYR.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se halló el límite de detección a través de la **Ecuación 17**. Para ello, se realizó la recta de calibrado representando de la intensidad frente a la concentración del analito añadido. Además, se calculó la desviación típica con cinco intensidades tomadas en la estabilización del sensor con KCl 0,1 M.

En la siguiente figura se observa la sensibilidad y la regresión lineal que se obtiene para el biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR:

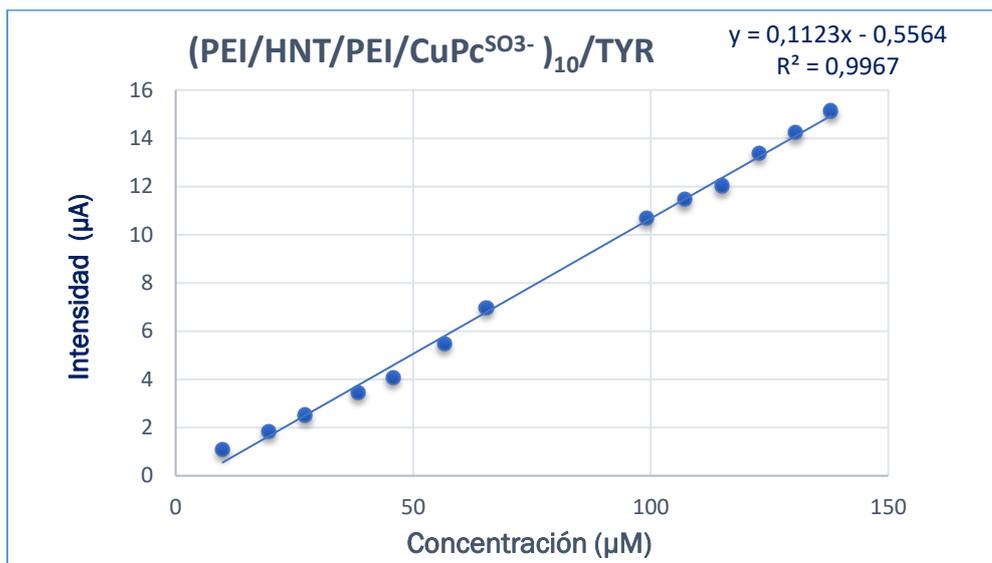


Figura 79. Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de catecol 10^{-3} M para el sensor (PEI/CuPc^{SO3-})₁₀.

Siendo el LDD:

$$LDD(catecol) = \frac{3 \cdot 0,0351 \mu A}{0,1123 \mu A/\mu M} = 0,938 \mu M = 0,938 \cdot 10^{-6} M$$

Ecuación 20.- Límite de detección del biosensor con nanoarcilla (PEI/HNT/PEI/CuPC^{SO3-})₁₀/TYR en función de la concentración en catecol 10^{-3} M.

Como se puede observar el límite de detección mejora frente a los sensores no enzimáticos, aunque son muy parecidos, pero la fiabilidad del sensor es la más elevada ya que la regresión lineal es la más cercana a 1 ($R^2=0,9967$).

Los límites de detección obtenidos en este TFG de los sensores y el biosensor en la detección de catecol se expresan tal y como se muestra en la **Tabla 15**:

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 15. Parámetros analíticos de los sensores y el biosensor desarrollados frente a catecol.

Electrodo	Potencial aplicado (V)	Rango (μM)	R^2	LDD (μM)
(PEI/HTN/PEI/CuPc ^{SO3-}) ₁₀ /TYR	0,32	10-138	0,9967	0,938
(PEI/CuPc ^{SO3-}) ₁₀	0,42	10-138	0,935	1,16
(PEI/HTN/PEI/CuPc ^{SO3-}) ₁₀	0,43	10-138	0,974	0,98

4.2.2.5. Comportamiento dinámico del biosensor

Para determinar si el mecanismo que controla la reacción redox es por difusión (I vs $v^{1/2}$) o transferencia (I vs v) cuando se utiliza un biosensor (PEI/HNT/PEI/CuPc^{SO3-})₁₀/TYR en el análisis de catecol, se llevó a cabo el registro de los voltamogramas en catecol 10^{-3} M en un rango de velocidades de 25 mV/s a 1000 mV/s.

A continuación, se representan los voltamogramas correspondientes a las diferentes voltametrías y la ampliación del pico anódico (670 mV-700 mV), representando para cada velocidad de barrido el último ciclo realizado. (**Figura 80**)

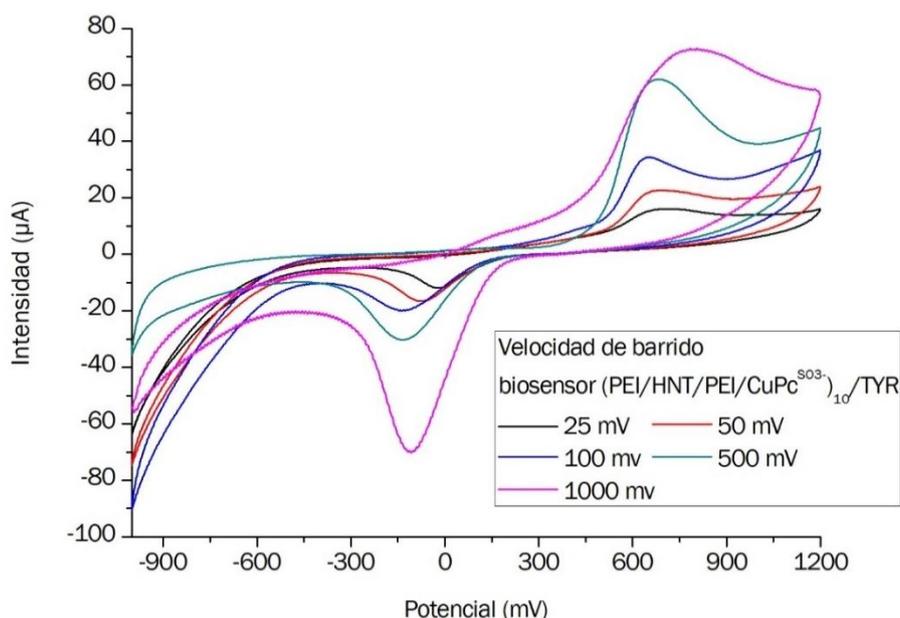


Figura 80. Representación voltamétrica de las diferentes velocidades de barrido para un análisis en catecol 10^{-3} M para el biosensor enzimático.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 16** se muestran las intensidades de barrido correspondientes al pico anódico:

Tabla 16. Intensidades correspondientes al pico anódico para su estudio dinámico.

Velocidad de barrido (mV/s)	Intensidad (μA)
25	15,56
50	22,02
100	33,04
250	60,6
500	72,71

A continuación, se representó la intensidad frente a la velocidad de barrido y a la raíz de ésta para determinar cuál es el mecanismo limitante en la reacción. Las siguientes figuras muestran las regresiones lineales de la intensidad frente a la velocidad y a la raíz cuadrada de la misma:

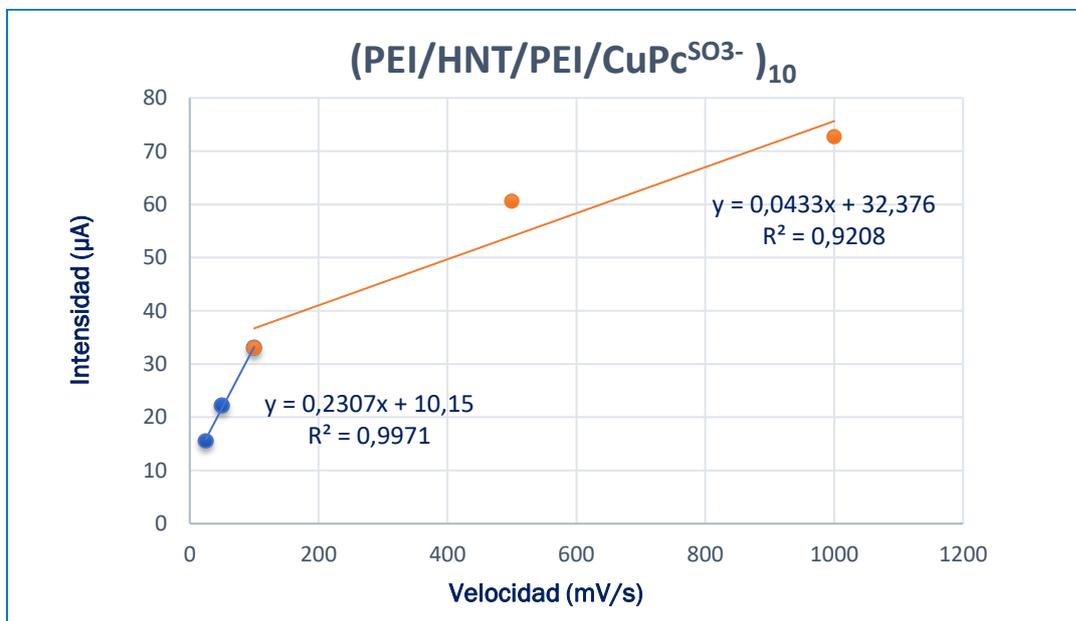


Figura 81. Representación de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el biosensor enzimático.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

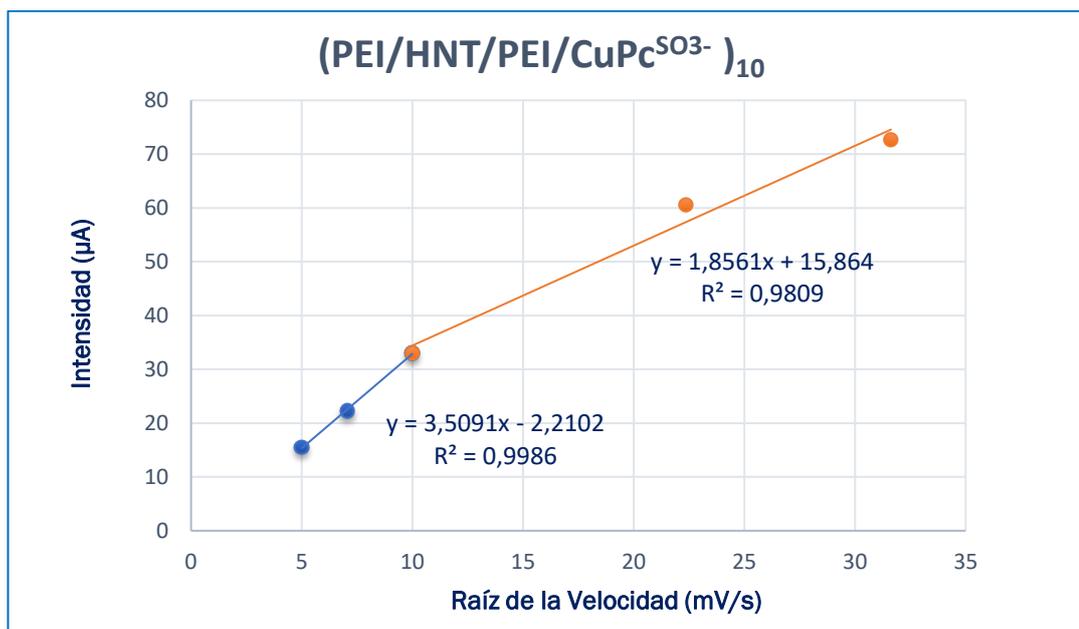


Figura 82. Representación de la intensidad de corriente en función de la raíz de la velocidad de barrido para el análisis de catecol 10^{-3} M para el biosensor enzimático.

Como se muestra en las figuras anteriores (**Figura 81** y **Figura 82**), se observaron dos líneas de tendencia en ambos casos, al representar la intensidad frente a la velocidad y también al representar la intensidad frente a la raíz cuadrada de la velocidad. Este resultado puede ser debido a que la enzima tiende a saturarse a medida que aumenta el número de ciclos, quedando menos sitios activos expuestos al analito y dejándose de observar un aumento en la intensidad.

A velocidades bajas, se observa que la etapa limitante de la reacción es la difusión, con una regresión lineal $R^2=0,9986$ y a velocidades elevadas, también se observa que la reacción redox es controlada por la difusión de los iones desde la matriz de la disolución hacia la superficie del electrodo, siendo la regresión lineal de la recta $R^2=0,9809$.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

Las principales conclusiones obtenidas en el desarrollo de este trabajo de investigación son las siguientes:

- ❖ Se han desarrollado sensores utilizando la técnica Layer by Layer, alternando películas con cargas electrostáticas diferentes: PEI (+), HNT (-), PEI (+) y $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ (-). Esta configuración produce sensores de calidad ya que el PEI facilita la inmovilización de las películas sobre el sustrato, la HNT aporta una gran relación superficie/volumen que permite una mejor adhesión de los compuestos que forman el sensor y, por último, la $\text{CuPc}^{\text{SO}_3^-}$ que actúa como mediador electrónico y mejora la transferencia electrónica.
- ❖ Los sensores preparados por la técnica LbL han demostrado tener un correcto comportamiento electroquímico frente a un difenol como el catecol.
- ❖ Se ha demostrado que la preparación de sensores nanoestructurados mediante LbL ofrece una alta reproducibilidad y repetitividad por parte de los sensores.
- ❖ Se ha demostrado que el uso de un material nanoestructurado para la formación del sensor como la nanoarcilla halloysita, mejora la adhesión de las películas en la técnica de LbL y aumenta la intensidad de la señal frente a los no modificados con dicho material para la detección de catecol.
- ❖ El uso de halloysita tiene un efecto beneficioso en cuanto al límite de detección, ya que permite detectar concentraciones más bajas de analito obteniéndose un LDD de $1,001 \mu\text{M}$ frente a los $1,667 \mu\text{M}$. obtenidos sin dicho material nanoestructurado.
- ❖ Usar un nanomaterial poroso que contiene una mayor relación superficie/volumen en comparación con otro material convencional, resulta ventajoso para la fabricación de sensores electroquímicos nanoestructurados, ya que permite una mejora en la adhesión de otros materiales en la formación de películas. También al ser un material poroso puede permitir una mejora en el paso de los electrones a lo largo de las películas depositadas en el sensor y así aumentar la efectividad del sensor.



- ❖ Se ha observado que el comportamiento cinético de los sensores y del biosensor se rige por la difusión de los iones del analito hacia la superficie del electrodo.
- ❖ Se ha desarrollado un biosensor usando el entrecruzamiento o cross-linking como técnica de inmovilización de la enzima sobre el sustrato.
- ❖ El biosensor ofreció una mejor respuesta en la onda anódica ya que se redujeron los potenciales de oxidación de los picos anódicos. Sin embargo, se esperaba obtener un LDD más sensible frente a catecol y el resultado fue similar al sensor con nanoarcilla no enzimático.
- ❖ Los resultados obtenidos por los sensores muestran una prometedora implantación en el mercado de la industria alimentaria, pudiendo controlar de una manera eficaz, rápida y sencilla del proceso de muestras fenólicas como es el caso de la fermentación del vino o mosto.

Las posibles líneas futuras de esta investigación, de acuerdo con los resultados de estudios obtenidos, son las siguientes:

- ❖ Mejorar la inmovilización de la enzima en los sensores LbL desarrollados para obtener límites de detección más sensibles.
- ❖ Aplicar estos sensores y biosensores en el análisis de vinos y mostos para discriminar muestras con contenido polifenólico distinto.
- ❖ Realizar un estudio de la superficie morfológica del sensor a través de una microscopía de barrido electrónico SEM y mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).
- ❖ La realización de sensores con diferentes nanoarcillas para comparar el diferente funcionamiento electroquímico con distintas nanoarcillas.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA



CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- [1] Informe anual de la industria alimentaria 2017-2018 “Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno de España.” [Online]. Available: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/Cifras-de-la-industria-alimentaria/default.aspx>. [Accessed: 15-Jun-2019].
- [2] R. W. Cattrall, *Chemical Sensors*. New York: Oxford University Press, 1997.
- [3] A. Baeza, “Sensores y biosensores electroquímicos”. *Facultad de Química, Departamento de química analítica*, UNM, Buenos Aires, p. 2009.
- [4] A. Hulanicki, S. Geab, and F. Ingman, “Chemical sensors definitions and classification”. *Int. union pure Appl. chemistry*, vol. 63, no. 0, pp. 1247–1250, 1991.
- [5] M. R. Gómez Moliné and S. Alegret, “Los sensores químicos. Una aportación a la instrumentación analítica”. *Educ. Química*, vol. 8, no. 4, p. 191, 2018.
- [6] U. Guth, W. Vonau, and J. Zosel, “Recent developments in electrochemical sensor application and technology - A review”. *Meas. Sci. Technol.*, vol. 20, no. 4, 2009.
- [7] E. Palecek and J. Frantisek, “Electrochemistry of Nucleic Acids and Development of DNA Sensors”. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, no. January 2013, pp. 37–41, 2010.
- [8] C. Del Gratta and G. L. Romani, “ELECTROCHEMISTRY: Principles, methods, and applications”. in *Biomedizinische Technik*, New York: Oxford Uni., vol. 44, no. s2, 1999, pp. 310–324.
- [9] B. Segura, F. N. Jiménez, and L. R. Giraldo, “Potentiostat prototype with applications in electrochemical processes”. *Entre Cienc. e Ing.*, vol. 4, no. 19 de 2016, pp. 61–69, 2016.
- [10] V. D. Alkaine, Z. Mahmud, and G. Gordillo, “Informe Técnico Voltametría de Onda Cuadrada para estudiar la Electrodeposición de cinc en medio ácido . Zona de potenciales de control por transferencia de masa”. *Bibl. Dígít. Dr. Luis Federico Leloi*, 2017.
- [11] I. González Martínez, C. E. Frontana Vázquez, and V. M. Ugalde Saldívar, “Curso de Técnicas Electroquímicas (Voltametría de barrido lineal y triangular)”. *Departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática, Valladolid*, pp. 1–33, 2015.



CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- [12] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry". *J. Chem. Educ.*, vol. 95, no. 2, pp. 197–206, 2018.
- [13] E. Flores B., "Voltametría cíclica: La espectroscopía electroquímica . Parte I". *Rev. Química*, vol. IX, no. 2, pp. 165–172, 1995.
- [14] R. Boqué, "El Límite de detección de un Método Analítico. Técnicas de laboratorio". *BOQUÉ, Ricard, et al. El límite de detección de un método analítico. Técnicas de laboratorio*, Tarragona: Universitat Rovira i Virgili 2004, vol. 296, p. 878-81., vol. 296. pp. 878–81, 2004.
- [15] L. A. Peña Guédez, "Sistemas nanoestructurados y propiedades de transporte en capas delgadas de manganita" Barcelona: Universitat de Barcelona, p. 185, 2013.
- [16] L. Godínez, "Substratos modificados con monocapas autoensambladas : dispositivos para fabricar sensores y estudiar procesos químicos y fisicoquímicos interfaciales". *J. Mex. Chem. Soc.*, vol. 43, pp. 219–229, 1999.
- [17] D. B. Hall, P. Underhill, and J. M. Torkelson, "Spin coating of thin and ultrathin polymer films". *Polym. Eng. Sci.*, vol. 38, no. 12, pp. 2039–2045, 1998.
- [18] "OSSILA Enabling Materials Science." [Online]. Available: <https://www.ossila.com/pages/spin-coating>. [Accessed: 18-Apr-2019].
- [19] E. Nieto and F. Fernandez, "Películas delgadas: fabricación y aplicaciones". *Cerámica y Vidr.*, vol. 258, pp. 245–258, 1994.
- [20] J. O. Zerbino, C. Falivene, A. Maltz, and M. G. Sustersic, "Polypyrrole films electropolymerised in sodium dodecylsulphate solution". *Av. en Ciencias e Ing.*, vol. 1, no. 4, pp. 23–32, 2010.
- [21] A. Arrieta, M. L. Rodriguez-Mendez, and J. A. De Saja, "Langmuir-Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste". *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 95, no. 1–3, pp. 357–365, 2003.
- [22] UVaSens, "Preparación de películas delgadas Técnica de Langmuir-Blodgett," 2012. [Online]. Available: http://www.eis.uva.es/inorganica/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=26. [Accessed: 18-Apr-2019].
- [23] D. García Raya, "*Monocapas autoensambladas (SAMs) y nanopartículas metálicas (MPCs) como elementos en la arquitectura de interfases funcionales*". Córdoba: Universidad de Córdoba, 2009.
- [24] N. C. de Lucena, C. M. Miyazaki, F. M. Shimizu, C. J. L. Constantino, and M. Ferreira, "Layer-by-layer composite film of nickel phthalocyanine and



CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- montmorillonite clay for synergistic effect on electrochemical detection of dopamine". *Appl. Surf. Sci.*, vol. 436, pp. 957–966, 2018.
- [25] B. I. Kharisov and L. Á. Garza Rodríguez, "Pigmentos tipo ftalocianinas no sustituidas: Obtención y propiedades". *Ingenierías*, vol. XI No. 38, no. January 2008, 2008.
- [26] M. L. Rodríguez-Mendez and J. Antonio de Saja, "Nanostructured thin films based on phthalocyanines: electrochromic displays and sensors". *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 13, no. 04, pp. 606–615, 2009.
- [27] B. I. Kharisov, "Las ftalocianinas y la industria de pigmentos". *Ingenierías*, vol. VI, no. 20, pp. 3–5, 2003.
- [28] E. Orti, J. L. Brédas, and C. Clarisse, "Electronic structure of phthalocyanines: Theoretical investigation of the optical properties of phthalocyanine monomers, dimers, and crystals". *J. Chem. Phys.*, vol. 92, no. 2, pp. 1228–1235, 1990.
- [29] C. Salvo-Comino, C. Garc, C. Garc, and M. Luz, "Discrimination of Milks with a Multisensor System Based on Layer-by-Layer Films". *Sensors vol.18* , pp. 1–12, 2018.
- [30] C. Garcia-hernandez, C. Medina-plaza, C. Garcia-cabezon, and M. L. Rodríguez-méndez, "An Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Multisensor System Based on Phthalocyanine Nanostructured Films: Discrimination of Musts". *Sensors*, vol 15, pp. 29233–29249, 2015.
- [31] P. Alessio, C. S. Martin, J. A. De Saja, and M. L. Rodríguez-mendez, "Sensors and Actuators B: Chemical Mimetic biosensors composed by layer-by-layer films of phospholipid , phthalocyanine and silver nanoparticles to polyphenol detection". *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 233, pp. 654–666, 2016.
- [32] P. Alessio, F. J. Pavinatto, O. N. Oliveira, J. A. De Saja Saez, C. J. L. Constantino, and M. L. Rodríguez-Méndez, "Detection of catechol using mixed Langmuir-Blodgett films of a phospholipid and phthalocyanines as voltammetric sensors". *Analyst*, vol. 135, no. 10, pp. 2591–2599, 2010.
- [33] B. N. Films, P. Alessio, C. Apetrei, R. J. G. Rubira, C. J. L. Constantino, and J. A. De Saja, "Structural and Electrochemical Properties of Lutetium Application as Voltammetric Sensors". American Scientific Publishers, 2014.
- [34] A. Arrieta, M. L. Rodríguez-Mendez, and J. A. De Saja, "Langmuir-Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste". *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 95, no. 1–3, pp. 357–365, 2003.
- [35] V. Parra, T. Hernando, M. L. Rodríguez-Méndez, and J. A. de Saja, "Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- carbon paste electrodes for discrimination of red wines”. *Electrochimica Acta, Elsevier*, vol 49, pp. 5177-5185, 2004.
- [36] C. García-Hernández *et al.*, “Electrochemical behavior of polypyrrol/AuNP composites deposited by different electrochemical methods: Sensing properties towards catechol”. *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 2052–2061, 2015.
- [37] J. A. De Saja *et al.*, “The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes”. *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 62, pp. 940–947, 2015.
- [38] C. García-Hernández, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, and M. L. Rodríguez-Méndez, “Analysis of musts and wines by means of a bioelectronic tongue based on tyrosinase and glucose oxidase”. *Food Chemistry*, 2019.
- [39] P. L. Arriola Márquez, Mariela Carolin, Rojas Pomalima, “Síntesis y caracterización de nanoarcillas a partir de montmorillonita utilizando sales de amonio”. *Tesis licenciatura Univ. Nac. del Cent. del Perú Huncayo*, p. 116, 2017.
- [40] G. Picasso and M. del R. Sun Kou, “Aplicaciones tecnológicas de las arcillas modificadas”. *Rev. la Soc. Química del Perú*, vol. 74, no. 1, pp. 57–74, 2008.
- [41] E. García Romero and M. Suárez Barrios, “Las Arcillas: Propiedades Y Usos”. Madrid: UCM, pp. 1–28, 2014.
- [42] P. Yuan *et al.*, “Functionalization of halloysite clay nanotubes by grafting with γ -aminopropyltriethoxysilane”. *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 40, pp. 15742–15751, 2008.
- [43] D. Shchukin, G. Sukhorukov, R. Price, and Y. Lvov, “Halloysite Nanotubes as Biomimetic Nanoreactors”. *Small*, vol. 1, no. 5, pp. 510–513, 2005.
- [44] P. B. Rodrigo, P. V Cecília, and C. M. Mauricio, “Las Nanoarcillas y sus potenciales aplicaciones en el Ecuador”. *Rev. Tecnológica ESPOL*, vol. 19, pp. 121–124, 2006.
- [45] M. Hetzer and D. De Kee, “Wood/polymer/nanoclay composites, environmentally friendly sustainable technology: A review”. *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 86, no. 10, pp. 1083–1093, 2008.
- [46] G. C. Oliveira *et al.*, “Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring”. *Talanta*, vol. 98, pp. 130–136, 2012.
- [47] N. Joshi, K. Rawat, P. R. Solanki, and H. B. Bohidar, “Enzyme-free and biocompatible nanocomposite based cholesterol sensor”. *Biochem. Eng. J.*, vol. 102, pp. 1–5, 2015.



CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- [48] D. Yang, Y. Wang, Y. Wang, and H. Li, "A simple and effective luminescence sensor distinguishing cationic surfactants from other type of surfactants". *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 235, pp. 206–212, 2016.
- [49] S. Alegret and M. del Valle, *Sensores electroquímicos*. Cataluña: Universidad Autónoma de Barcelona, 2004.
- [50] M. De, L. Velázquez, M. Ángel, O. Vargas, and F. E. Buch-, "Termodinámica, Cinética y Enzimas". Ciudad de México: Ins. Pol. Nacional, 2014.
- [51] J. M. Valpuesta, "Relaciones históricas entre la química, la bioquímica y la biología molecular". *Cent. Nac. Biotecnol. Madrid*, pp. 7–10, 2011.
- [52] D. A. Skoog, F. James Holler, and T. A. Nieman, "Douglas A. Skoog & F. James Holler & Timothy A. Nieman - "Principios de análisis instrumental" 5 Ed. Ciudad: McGrawHill, 2001. pp. 1–856,
- [53] Universitat Autònoma de Barcelona, "Espectrofotometria UV-Vis". [Online]. Available: <http://sct.uab.cat/saq/es/content/espectrofotometria-uv-vis>. [Accessed: 23-Apr-2019].
- [54] F. Lu, M. Bao, C. Ma, X. Zhang, D. P. Arnold, and J. Jiang, "Infrared spectra of phthalocyanine and naphthalocyanine in sandwich-type (na)phthalocyaninato and porphyrinato rare earth complexes". *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 59, no. 14, pp. 3273–3286, 2003.
- [55] M. Norman *et al.*, "Marine sponge skeleton photosensitized by copper phthalocyanine : A catalyst for Rhodamine B degradation". *Gruyter Open*, pp. 243–254, 2016.
- [56] P. R. Chang, Y. Xie, D. Wu, and X. Ma, "Amylose wrapped halloysite nanotubes". *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, no. 4, pp. 1426–1429, 2011.
- [57] O. Makhotkina and P. A. Kilmartin, "The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide". *Anal. Chim. Acta*, vol. 668, no. 2, pp. 155–165, 2010.
- [58] C. García-Hernández, C. García-Cabezón, F. Martín-Pedrosa, J. A. De Saja, and M. L. Rodríguez-Méndez, "Layered composites of PEDOT/PSS/nanoparticles and PEDOT/PSS/phthalocyanines as electron mediators for sensors and biosensors". *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 7, pp. 1948–1959, 2016.