



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Mecánica

**APLICACIÓN DE SENSORES Y BIOSENSORES
NANOESTRUCTURADOS PARA LA DETECCIÓN
DE ANTIOXIDANTES**

Autora:

Martín Pacho, Elena

Tutoras:

García Cabezón, Cristina

Blanco Val, Yolanda

Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica, Expresión Gráfica en la Ingeniería Cartográfica, Geodesia y Fotogrametría, Ingeniería Mecánica e Ingeniería de los Procesos de Fabricación

JULIO 2015

Agradecimientos

Quiero agradecer este Trabajo de Fin de Grado a las siguientes personas:

En primer lugar a mis tutoras, en especial a Cristina, por toda su ayuda y esfuerzo, ya que han sido muchas horas de dedicación y trabajo que es imposible agradecer con palabras.

A todas las personas de ambos laboratorios, porque cada una de ellas ha aportado su granito de arena, haciendo más ameno todo este trabajo y ayudándome en todo lo que han podido.

A mis padres, por supuesto, porque no hay nadie que me haya animado y apoyado más de corazón como lo han hecho ellos durante toda mi vida.

A mis amigos de la Universidad, ya sea por alegrarme el día a día en clase o con un café a media mañana.

A mis amigas de toda la vida, por todos estos años de amistad y momentos únicos a vuestro lado.

Y por último a Carlos, nada sería lo mismo sin el apoyo que me has dado durante estos dos maravillosos años.

Muchas gracias a todos.

Resumen

Se han fabricado sensores de grafito modificados con nanopartículas de titanio con el fin de realizar detección de antioxidantes, en concreto catecol e hidroquinona. Se han comparado los resultados obtenidos con los sensores sin modificar y se ha demostrado el efecto electrocatalítico de las nanopartículas de titanio. Se ha correlacionado el comportamiento de estos sensores con el de los biosensores, con y sin nanopartículas, con la enzima tirosinasa para la detección de catecol e hidroquinona. Se han fabricado biosensores, con y sin modificación, con la enzima glucosa oxidasa para la detección de glucosa. Con los sensores modificados ha sido posible la discriminación de catecol e hidroquinona en una mezcla de ambos. En este estudio se han analizado igualmente otras variables como el efecto de la variación del pH en la solución obtenida, además de la repetibilidad y reproducibilidad de los sensores.

Palabras clave: sensores, biosensores, nanopartículas, antioxidantes, titanio.

Abstract

Graphite sensors modified with titanium nanoparticles have been built in order to perform detection of the antioxidants catechol and hydroquinone. The obtained results were compared with those provided by unchanged sensors, demonstrating the electrocatalytic effect of titanium nanoparticles. The behavior of sensors and biosensors (both with and without particles) has been correlated, using the tyrosinase enzyme for catechol and hydroquinone detection of biosensors. Furthermore biosensors with and without modification, with glucose oxidase enzyme, were manufactured for glucose detection. Modified sensors succeeded discriminating catechol and hydroquinone in a mixture of both. This study also analyzed other variables such as the effect of varying pH in the solution obtained in addition to the repeatability and reproducibility of the sensors.

Key words: sensors, biosensors, nanoparticles, antioxidants, titanium.

Abreviaturas y Acrónimos

CPE: Electrodo de Pasta de Carbono

TiNP's: Nanopartículas de Titanio

Glu: Glutaraldehído

CC: Catecol

HQ: Hidroquinona

LOD: Límite de detección

SD: desviación estándar

CV: Voltametría Cíclica

LbL: Layer by Layer

Tyr: Tirosinasa

GOx: Glucosa Oxidasa

Tabla de contenido

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivos	2
CAPÍTULO 2. ASPECTOS GENERALES. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
2.1. Sensores químicos	3
2.1.1. Concepto de sensor químico	4
2.1.2. Sensores electroquímicos	5
2.2. Voltametría.....	7
2.2.1. Descripción del proceso	7
2.2.2. Voltametría cíclica	11
2.3. Electrodo de pasta de carbono.....	14
2.3.1. Características y funcionamiento.....	15
2.3.2. Modificadores de los electrodos de pasta de carbono	17
2.4. Biosensores químicos	18
2.4.1. Biosensor de tirosinasa	19
2.4.2. Biosensor de glucosa oxidasa.....	20
2.5. Antioxidantes y azúcares en uvas de mostos.....	21
2.5.1. Polifenoles	22
2.5.2. Azúcares	24
CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	27
3.1. Preparación de sensores	27
3.1.1. Materiales utilizados.....	27
3.1.2. Preparación de la pasta.....	28

3.1.3.	Fabricación de los electrodos.....	30
3.2.	Preparación de biosensores	36
3.2.1.	Elementos utilizados	36
3.2.2.	Procedimiento de deposición de enzimas.....	38
3.3.	Medición de resultados	40
3.3.1.	Elementos utilizados	40
3.3.2.	Disoluciones utilizadas.....	45
3.3.3.	Voltametría cíclica	48
CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....		55
4.1.	Estudio de viabilidad	55
4.2.	Caracterización de sensores en KCl.....	59
4.3.	Detección de antioxidantes con sensores	62
4.3.1.	Detección de catecol.....	63
4.3.2.	Detección de hidroquinona.....	76
4.3.3.	Efecto del pH.....	89
4.3.4.	Repetibilidad de los sensores.....	92
4.3.5.	Caracterización de mezclas de hidroquinona y catecol.....	94
4.4.	Detección de antioxidantes y azúcares con biosensores	102
4.4.1.	Detección de catecol.....	102
4.4.2.	Detección de hidroquinona.....	106
4.4.3.	Caracterización de mezclas de hidroquinona y catecol.....	110
4.4.4.	Detección de glucosa	112
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS		119
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....		123

MEMORIA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

El Grupo de Investigación en el que he desarrollado este trabajo fin de grado tiene una línea de investigación en el ámbito de la nanociencia en torno al desarrollo de (bio)sensores que detectan distintos componentes interesantes en el campo de la alimentación, por sus propiedades beneficiosas para los seres humanos. El enfoque principal de aplicación de estos sensores es el análisis de vinos y mostos. Este trabajo se integra, por tanto, dentro de esta línea de investigación en cuanto a la optimización y fabricación de sensores que detectan componentes de uvas en mostos y vinos.

En especial, es de gran interés en este campo el estudio de polifenoles y azúcares debido a que son componentes de las uvas que confieren las propiedades deseadas a mostos y vinos. Éstas dependerán del mayor o menor contenido de estos componentes. Uno de los objetivos básicos en la investigación de hoy en día en este ámbito es encontrar unos sensores que puedan servir para caracterizar estos analitos de forma selectiva, sencilla, rápida y económica y, por tanto, desarrollar unos sensores de elevada selectividad que sean capaces de discriminar unas variedades de mostos de otras por su mayor o menor contenido en estos elementos. Con este fin, y debido a que es muy extendido el uso de enzimas y nanopartículas como elementos modificadores de estos electrodos para así mejorar la respuesta obtenida, se ha pensado que sería interesante fabricar unos sensores elaborados a partir de pasta de carbono modificados con nanopartículas de titanio (CPE-TiNP's), que no han sido utilizados anteriormente para estos propósitos, pensando en obtener un efecto electrocatalítico. Finalmente se utilizarán diferentes enzimas con objeto de hacer selectivos nuestros sensores y determinar su capacidad para detectar estos componentes en rangos bajos de concentración, en los que suelen encontrarse en mostos y vinos.

Se trata de un trabajo inicial, con el que se pretende estudiar la respuesta obtenida en estos analitos y, en función de los resultados obtenidos, utilizarlos en futuras investigaciones para realizar a posteriori una aplicación directa en mostos una vez se hayan validado los mismos, lo que será el principal objetivo de este trabajo de investigación.

1.2. Objetivos

Uno de los objetivos del presente trabajo es la obtención de unos sensores de carbono modificados con nanopartículas de titanio que sean capaces de detectar antioxidantes. Dentro de estos nos centraremos en la detección de dos polifenoles, catecol (CC) e hidroquinona (HQ), comparando su respuesta con la de los sensores de carbono sin modificar. También se estudiará la posibilidad de realizar una discriminación de ambos analitos en una mezcla de los mismos, hecho que no es posible con muchos de los sensores comerciales. Esto daría un valor añadido a nuestros sensores de cara a la realización de mediciones directas en mostos, en los cuáles coexisten una cantidad variada de componentes polifenólicos y, por tanto, en los que la detección selectiva de un componente determinado es difícil de conseguir. Además se estudiará la influencia de diferentes variables en el comportamiento electroquímico de los sensores con objeto de optimizar su comportamiento en servicio. También se estudiará la repetitividad, la estabilidad y la reproducibilidad de estos sensores fabricados a partir de pasta de carbono (CPE) y la modificación que el uso de nanopartículas supone al respecto. Para finalizar se analizará el comportamiento de biosensores con y sin nanopartículas en antioxidantes, haciendo uso del enzima tirosinasa (Tyr), y en glucosa, utilizándose en este caso el enzima glucosa oxidasa (GOx).

CAPÍTULO 2. ASPECTOS GENERALES. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En este capítulo se introducirá el marco teórico en el que se basa la realización de este trabajo. En primer lugar se realizará una explicación del concepto de sensor químico y, en concreto, de sensor electroquímico y sensor voltamétrico. En segundo lugar se explicará en profundidad el proceso de voltametría cíclica, que es la metodología de análisis electroquímico que se ha llevado a cabo para la obtención de todos los resultados experimentales. A continuación se detallarán los fundamentos teóricos de los electrodos usados en la realización de este trabajo, que son los fabricados a partir de pasta de carbono, y las propiedades que confieren las nanopartículas como elementos modificadores de los mismos. En el siguiente apartado se ahondará en el concepto de biosensor, ya que en la última parte de esta investigación se ha trabajado también con biosensores modificados con nanopartículas de titanio. Por último, se comentarán los aspectos teóricos que conciernen a los analitos que han sido seleccionados para su estudio en este trabajo, esto es antioxidantes, en concreto los isómeros catecol e hidroquinona; y los azúcares, particularmente la glucosa, y la importancia de todos ellos en el campo de la enología.

2.1. Sensores químicos

Un sensor se define como un dispositivo que se encarga de recibir cierta información exterior y convertirla en una señal, generalmente de tipo eléctrica, que puede cuantificarse y analizarse [1].

Los sensores pueden clasificarse dentro de dos grupos principales, en función del tipo de información que reciben:

- ❖ **Sensores físicos:** son aquellos que convierten una magnitud física, como pueden ser temperaturas, presiones o movimientos en magnitudes eléctricas.
- ❖ **Sensores químicos:** son aquellos que son capaces de advertir cambios de tipo químico, como composiciones de un analito o pH, y realizar su caracterización por medio de señales eléctricas.

Durante este trabajo se ha trabajado con sensores de tipo químico, por lo que a continuación se explicará la base de los mismos y su funcionamiento en mayor detalle.

2.1.1. Concepto de sensor químico

Dichos sensores químicos tienen una importancia creciente en la investigación actual, debido a las necesidades actuales de caracterizar un analito en una muestra con un número elevado de componentes o en unas determinadas condiciones. Representan una alternativa a complejos y aparatosos instrumentos de caracterización de analitos, ya que algunas de las características de los sensores son su pequeño tamaño, su capacidad de selectividad y su reducido coste, en comparación con otro tipo de instrumentación.

El funcionamiento básico de un sensor químico se presenta en la *Figura 2.1* [2].

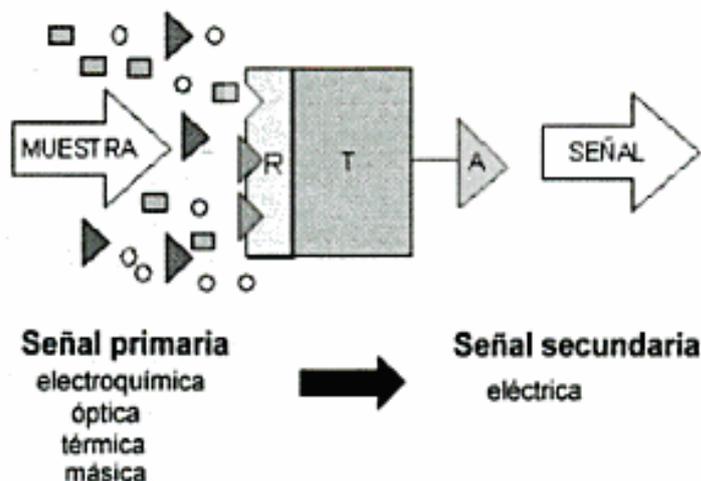


Figura 2.1. Funcionamiento de un sensor químico

Los elementos principales de un sensor químico son:

- ❖ **Receptor (R):** elemento de reconocimiento molecular o iónico. Este componente se encarga de reaccionar con un determinado

componente de la muestra o analito de forma selectiva, es decir, sólo es capaz de discriminar un único componente.

- ❖ **Transductor (T):** elemento instrumental que traduce la interacción en una señal procesable. La señal primaria (de tipo electroquímico, másico, etc) se transforma por medio del transductor en una señal secundaria, es decir, de tipo eléctrico.

2.1.2. Sensores electroquímicos

Dentro de la clasificación de sensores químicos, se pueden encontrar diferentes tipos, como pueden ser sensores de tipo óptico, másico, térmico o electroquímico. Los sensores que se han usado para la experimentación de este trabajo han sido de tipo electroquímico. Los motivos de esta elección han sido, en primer lugar, la posible utilización de reducidas cantidades de analito para su estudio, el abaratamiento de costes respecto a otros métodos de análisis y la ventaja de que la señal obtenida con este tipo de sensores se obtiene de forma inmediata, por lo que la interpretación de resultados obtenidos es directa, además de que no necesitan una instrumentación de elevada complejidad.

De este modo, en el caso de los sensores de tipo electroquímico, el objeto de estudio es la interacción electroquímica entre el analito y el sensor que, de igual forma que en todos los tipos de sensores diferentes, se traduce en una señal eléctrica estudiada y caracterizable.

Existe un tipo especial de sensores electroquímicos denominados biosensores electroquímicos en los que se introducen elementos biológicos, en nuestro caso enzimas. Debido a que durante este trabajo también se ha hecho uso de este tipo de sensores, se explicarán detenidamente en el apartado 2.4.

❖ Tipos de sensores electroquímicos

Puesto que los sensores utilizados durante este trabajo se encuentran dentro del grupo de sensores electroquímicos, se explicarán estos en mayor profundidad.

Los diferentes tipos de sensores electroquímicos existentes son:

- ❖ **Sensores potenciométricos:** se encargan de medir la diferencia de potencial existente entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia.
- ❖ **Sensores conductimétricos:** realizan una medición de conductividad provocada por el analito objeto de estudio.
- ❖ **Sensores impedimétricos:** toman como base la espectroscopía de impedancia. Se encargan, por tanto, de medir la impedancia propia de un sistema ante diferentes frecuencias de estudio.
- ❖ **Sensores amperométricos:** el principio de funcionamiento de los mismos se basa en el establecimiento de un potencial fijo a un electrodo de trabajo respecto a uno de referencia. Se tendrá una celda electroquímica con estos dos elementos además de un electrodo auxiliar. Dentro de esta clasificación se encuentran los sensores voltamétricos, los cuales han sido los sensores utilizados para la realización de este trabajo.

Por último, a modo de resumen, se presenta la *Figura 2.2* con los principales tipos de sensores comentados en estas páginas anteriores.

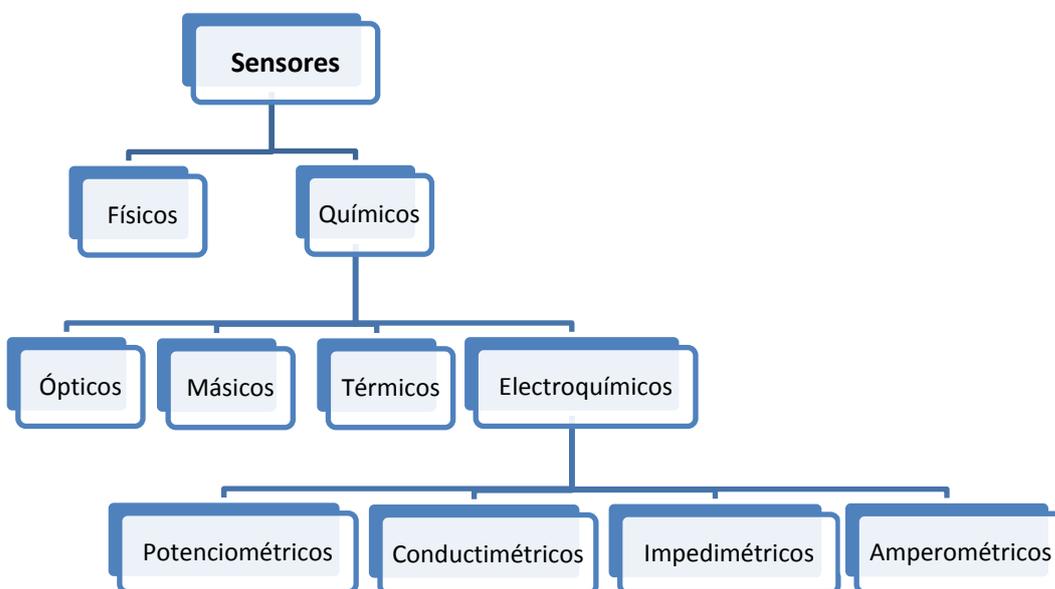


Figura 2.2. Clasificación de sensores

2.2. Voltametría

Dentro del campo de la química analítica, pueden encontrarse diferentes métodos electroquímicos que permiten caracterizar un analito, que es el objeto de estudio [3]. La clasificación de las técnicas más destacadas dentro de este campo se presenta en la *Figura 2.3*.

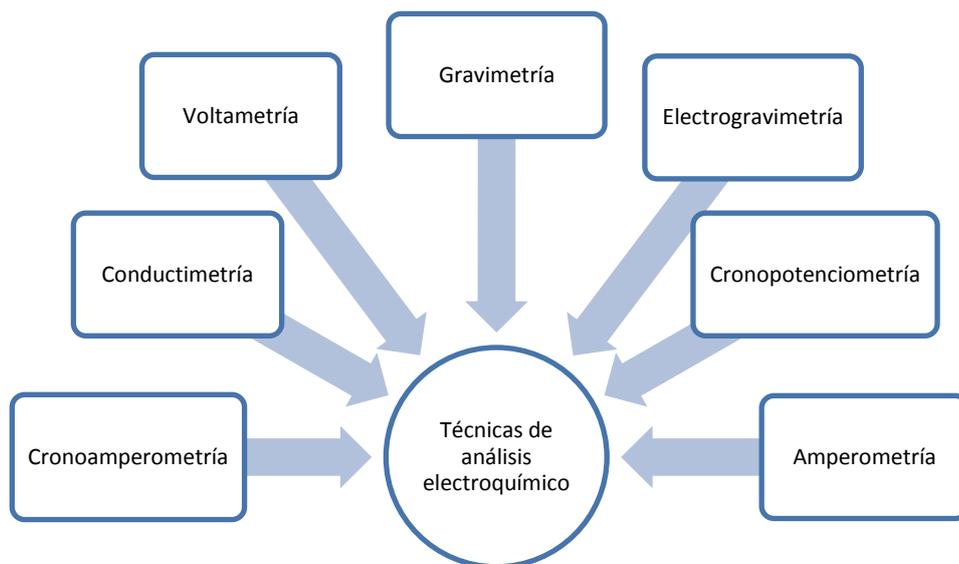


Figura 2.3. Clasificación de los métodos de análisis electroquímico

Nos centraremos en la explicación y caracterización de la **voltametría**, ya que ha sido el procedimiento utilizado en la caracterización de los analitos de este trabajo.

2.2.1. Descripción del proceso

Se caracteriza por ser un método de carácter electrolítico, por tanto se basa en la oxidación y reducción de un analito contenido en una celda electrolítica debido a la aplicación de un potencial a través de un electrodo de trabajo. Las ventajas de este método de análisis estriban en la falta de necesidad de separación previa de componentes debido a la especificidad del método y en la posibilidad de trabajar con concentraciones reducidas de analito [4].

El proceso se realiza variando el potencial aplicado entre un potencial inicial y otro potencial extremo. En este tipo de medición, la información que se

obtiene del analito objeto de estudio es la intensidad de corriente producida al variar el potencial. Esta información se registra en forma de un gráfico denominado **voltamograma**, en el que se representa la intensidad de corriente registrada en función del voltaje aplicado.

El fin de este método es posibilitar la detección de una especie electroactiva contenida en un electrolito. Para que este método pueda ser realizado es necesario el establecimiento de una celda electroquímica, la cual se compone de tres electrodos y una disolución en la que se encuentra dicho analito. En la *Figura 2.4* se representa un posible esquema de configuración de la celda electroquímica.

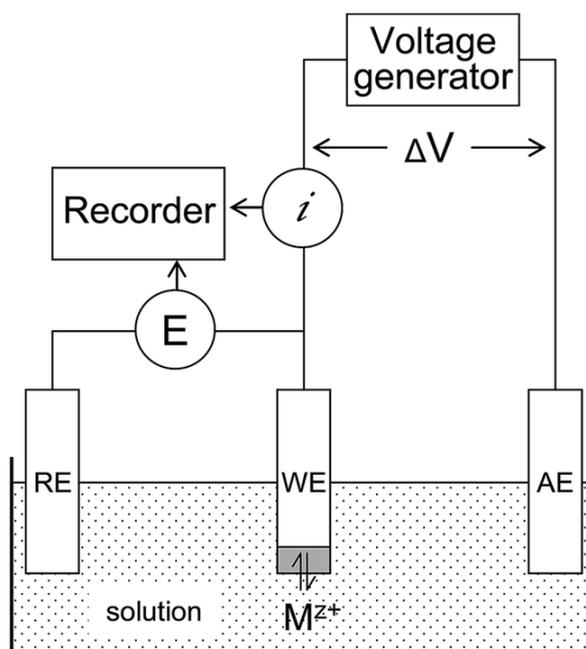


Figura 2.4. Celda electrolítica de voltametría cíclica

Como se muestra en la figura, se establece una diferencia de potencial variable entre el electrodo de trabajo (WE) y un electrodo de referencia (RE). Como electrodos de trabajo existen diferentes tipos, de sustratos muy diversos como son platino, oro, mercurio o pasta de carbono y obtenidos mediante procedimientos y técnicas muy variadas. En nuestro caso se ha utilizado como **electrodo de trabajo** el fabricado a partir de pasta de carbono, cuyas propiedades se definen en el apartado 2.3 y cuya elaboración se detalla en el capítulo 3.

Como **electrodos de referencia** los más usados son los de calomelanos saturados o electrodos de Ag/AgCl. En nuestro caso se ha utilizado este último, que se presenta de forma esquemática en la *Figura 2.5*. La composición principal del mismo consiste en un hilo de plata recubierto de una solución de cloruro de plata (AgCl), el cual se introduce en una solución de cloruro potásico (KCl). La función del mismo es la de medir la diferencia de potencial existente entre el electrodo de trabajo y éste, siendo el potencial al que se encuentra dicho electrodo de referencia constante.

Generalmente se dispone también de un **electrodo auxiliar o contraelectrodo** (AE) fabricado de un material conductor que transmite la corriente desde la fuente al electrodo de trabajo, a través del analito. En nuestro caso se ha trabajado con un hilo de platino como contraelectrodo.

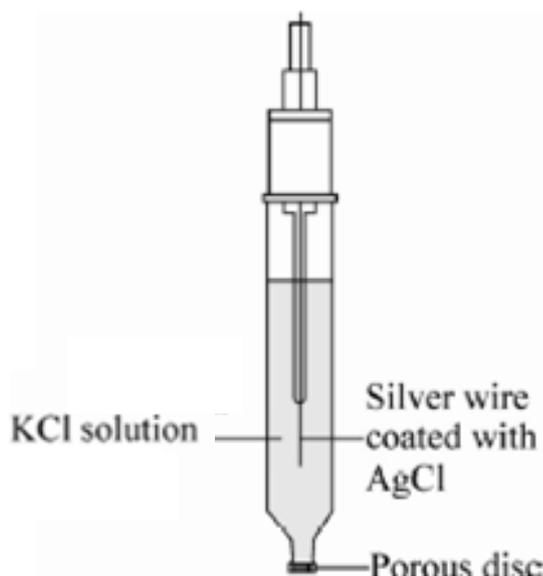


Figura 2.5. Electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl

En el instante en el que se alcanza cierto potencial de trabajo para el cual se produce una reacción de reducción u oxidación de una especie presente en la disolución, se produce un aumento de intensidad considerable, que provoca un pico en la respuesta obtenida a través del voltamograma.

Esta celda electroquímica debe ser conectada a un potenciostato, que es el elemento que se encarga de aplicar el voltaje de polarización y medir la intensidad de corriente producida en el proceso.

Además, se debe tener un software específico que genere los voltamogramas convenientes con la respuesta obtenida del proceso electroquímico. Una representación esquemática de todo el conjunto se muestra en la *Figura 2.6*, en la que se tendría como elementos en la celda el contraelectrodo (C), el electrodo de trabajo (W) y el electrodo de referencia (R).

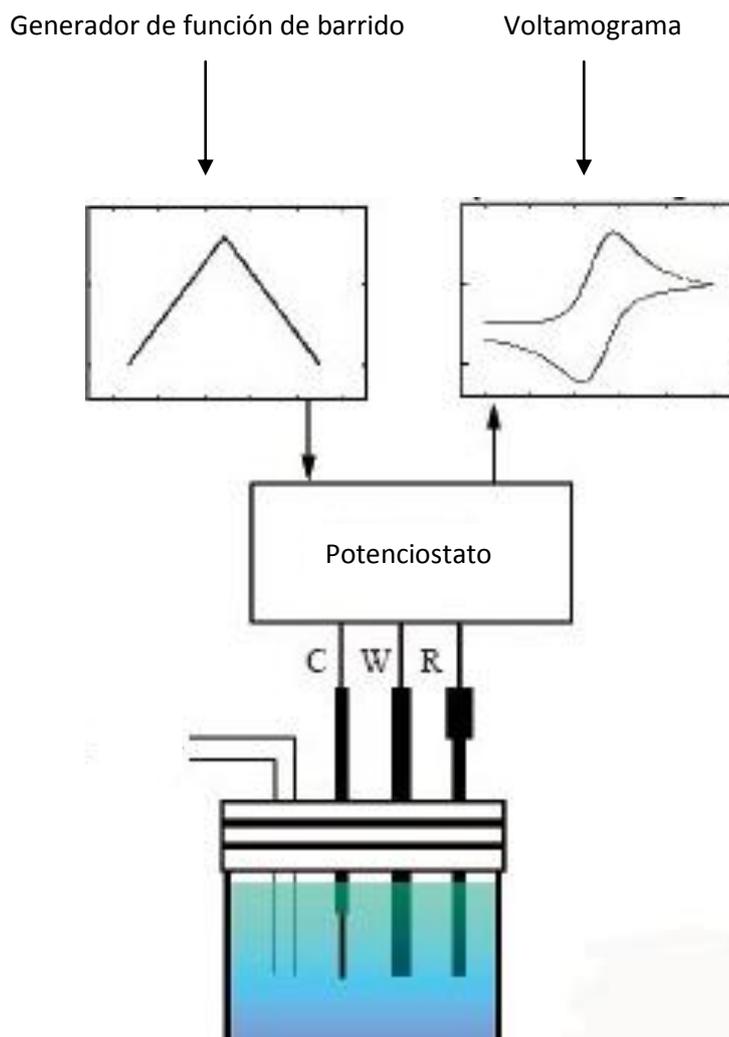


Figura 2.6. Montaje necesario para la realización de voltametría.

Existen diferentes tipos de voltametrías en función de cómo se realice el barrido de potencial. De esta forma podemos encontrarnos con voltametría lineal, de onda cuadrada, de impulso diferencial o voltametría cíclica. En la *Figura 2.7* se presenta un esquema con los diferentes tipos de voltametría,

así como una gráfica que representa en cada caso el potencial aplicado en función del tiempo.

Durante este trabajo se ha hecho uso de la metodología de voltimetría cíclica, por lo que en el siguiente apartado se explicará esta técnica en detalle.

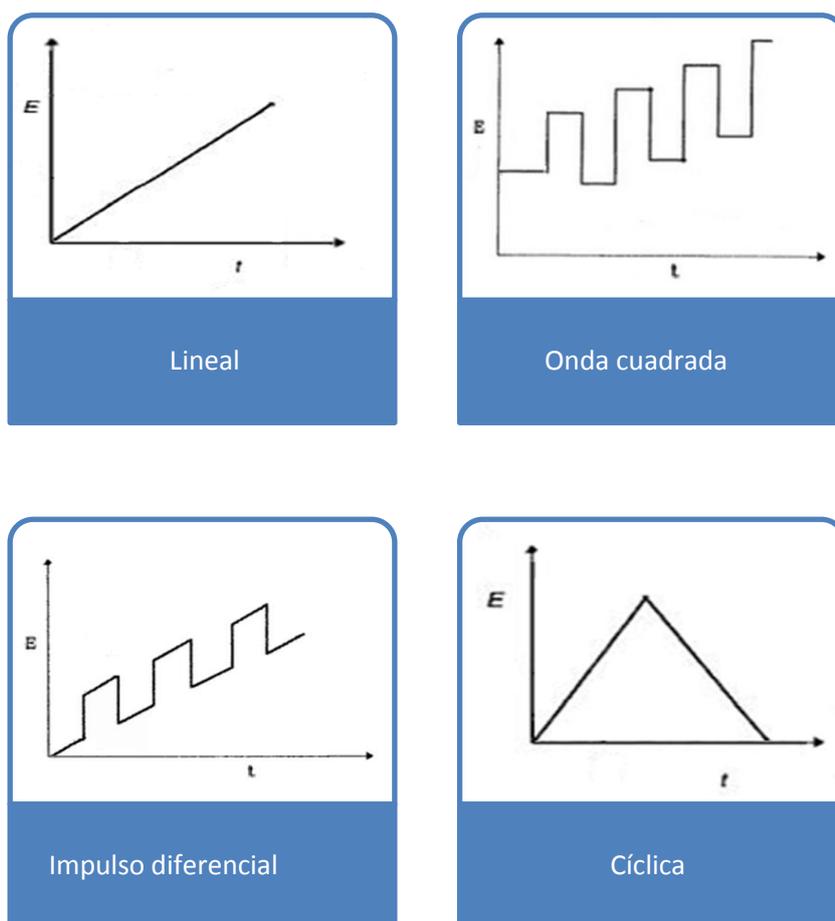


Figura 2.7. Tipos de voltimetrías y potencial aplicado en cada caso en función del tiempo

2.2.2. Voltimetría cíclica

El método de trabajo denominado voltimetría cíclica (CV) consiste en la aplicación de un potencial a un electrodo de trabajo, el cual cambia con el tiempo de la forma que se muestra en la *Figura 2.8*.

Para el desarrollo del experimento se establecen diferentes potenciales. En primer lugar, se determina un potencial E_1 de inicio, que generalmente toma

un valor en el cual el valor de intensidad es despreciable, con el fin de que el analito no se encuentre inicialmente reducido u oxidado. A continuación se realiza un barrido lineal de potencial (velocidad de barrido constante) hasta un potencial límite E_2 . En este punto se cambia la dirección de barrido hasta que vuelve a alcanzarse el potencial inicial del electrodo de referencia, E_1 [5].

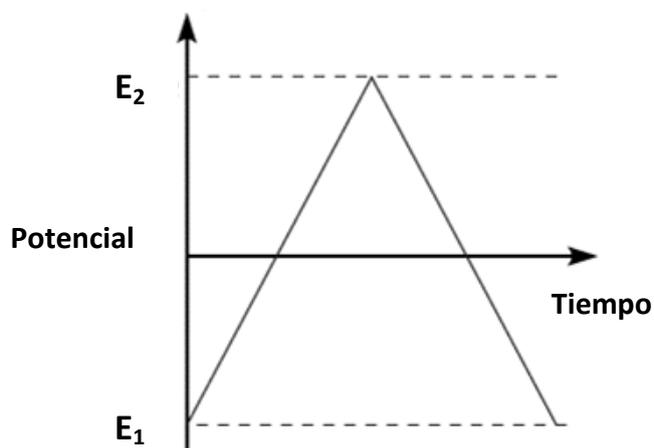


Figura 2.8. Potencial aplicado en función del tiempo en una voltametría cíclica

Suele elegirse un potencial E_2 tal que, al recorrerse el intervalo de potencial (E_2-E_1), se produzca una reacción de oxidación y otra de reducción, las cuales sean el objeto de estudio.

Puede darse el caso de que sea necesario extender el barrido inverso hasta un potencial más allá de E_1 , si esto ayuda a caracterizar mejor el analito, o permite mostrar una reducción importante, que ocurre a un potencial determinado.

El voltamograma se construye de forma similar al resto de experimentos, ya que se registra la intensidad de corriente en función del potencial aplicado. Un ejemplo de voltamograma tipo puede ser el mostrado en la *Figura 2.9*.

El convenio establece las intensidades positivas como corrientes anódicas y las negativas como catódicas. Los picos representan, como hemos comentado anteriormente, puntos de reducción y oxidación del analito. Si el pico se produce a intensidades positivas, se trataría de un pico de oxidación, y si la intensidad del pico es negativa, el pico se caracterizaría por ser de reducción.

Acorde a la representación de la figura, el pico de oxidación tendría un potencial E_p^a y una intensidad I_p^a , que en el caso del pico de reducción serían E_p^c y I_p^c respectivamente. De esta forma, se puede caracterizar un analito a partir de los picos redox producidas, la morfología del voltamograma y las intensidades de corriente producidas.

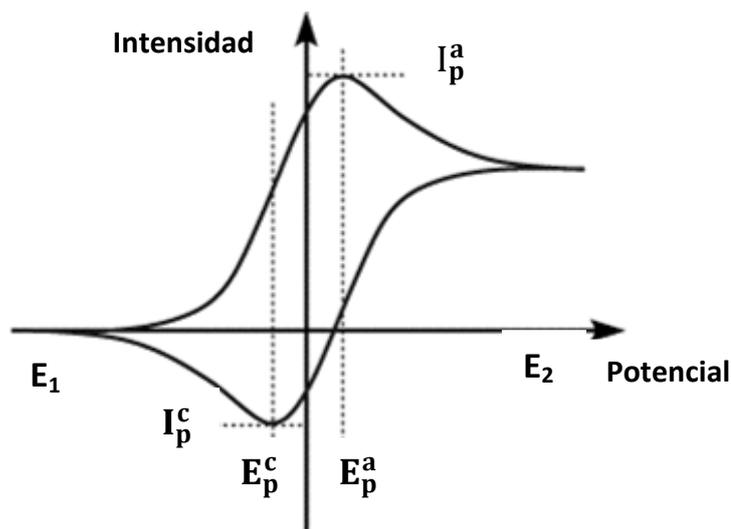


Figura 2.9. Voltamograma registrado de una voltametría cíclica

Como último punto de este apartado se comentará un aspecto de suma importancia como es la reversibilidad o irreversibilidad del proceso redox, la cual se determina a partir de la respuesta voltamétrica obtenida. Para determinar la reversibilidad o irreversibilidad de un proceso es necesario atender a distintos parámetros, que se detallan a continuación.

❖ Reversibilidad e irreversibilidad del proceso

Un proceso es reversible cuando, al realizar el barrido inverso de potencial, se realiza un desplazamiento a través de las posiciones de equilibrio, reduciéndose el producto de la electrólisis para obtenerse el componente inicial. Existen diferentes parámetros que caracterizan la reversibilidad de un proceso. Así pues, para que un proceso pueda determinarse como reversible deben cumplirse las siguientes condiciones:

- La diferencia de potencial entre ambos picos debe tomar el valor:

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{59}{n} mV \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

- El potencial de aparición de los picos no presenta una variación con respecto a la velocidad de barrido.
- El cociente entre las intensidades de los picos de reducción y oxidación es igual a 1, por tanto, estas intensidades son idénticas:

$$\left| \frac{I_p^a}{I_p^c} \right| = 1 \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

- Las intensidades de los picos son proporcionales a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

2.3. Electrodo de pasta de carbono

Existen múltiples métodos de preparación de electrodos en la actualidad con los que se trabaja actualmente en el campo de la investigación. Además, el trabajo con elementos nanoestructurados es un tema de creciente interés, ya que dichos componentes poseen ciertas características que los convierten en herramientas muy interesantes para el análisis químico [6]. Por un lado, su relación superficie/volumen es mayor que en el caso de materiales no nanoestructurados, que provoca una mayor rapidez en cuanto a la adsorción y desadsorción de moléculas de analito. Además, con el uso de estos materiales, se consigue una modificación en la organización estructural, que provoca unas propiedades diferenciadas frente a los materiales de película gruesa.

En cuanto a este tipo de métodos, existe una gran referencia bibliográfica en relación a investigaciones realizadas con este tipo de metodologías, siendo los más tradicionales los métodos de Langmuir-Blodgett [7], Layer-by-Layer [8] y monocapas autoensambladas.

Por otro lado, existen otros métodos tradicionales de fabricación de electrodos que incluyen diversos métodos, como son casting, adsorción, Screen Printing [9], método Sol-Gel o los electrodos de pasta de carbono. Nos centraremos en la explicación de estos últimos por ser los electrodos usados en nuestro caso.

2.3.1. Características y funcionamiento

El método de fabricación de electrodos a partir de pasta de carbono (CPE) posee diversas características que lo convierten en una metodología interesante de creación de electrodos, algunas de ellas son las que se mencionan a continuación:

- ❖ Se trata de unos electrodos de reducido coste de fabricación, ya que su fabricación es manual y no son necesarios materiales de elevado coste.
- ❖ Los límites de detección obtenidos son notablemente mejores que en el caso de uso de otro tipo de electrodos.
- ❖ La limpieza de la superficie para futuras reutilizaciones se realiza de forma muy sencilla.
- ❖ El tiempo de preparación del electrodo es relativamente menor, en especial en comparación con ciertas técnicas basadas en nanociencia, como las comentadas anteriormente.
- ❖ Permite la posibilidad de añadir elementos que modifiquen la pasta de carbono mejorando la selectividad del sensor.
- ❖ Existe una extensa bibliografía que avala el buen funcionamiento de los mismos en cuanto a la detección de analitos [10] [11] [12].

El electrodo se compone de un tubo o cilindro hueco en cuyo interior se encuentra la pasta de carbono, compuesta de polvo conductor de grafito y un aglutinante de tipo hidrófobo, orgánico, viscoso y no electroactivo como puede ser la parafina o aceites minerales. Un aglutinante muy utilizado en la fabricación de estos es el aceite mineral Nujol, que es el que se ha utilizado para la realización de este trabajo. Las partículas de grafito deben tener una elevada pureza química y es necesario que se encuentren en un tamaño del orden de micrómetros, debido a que tamaños mayores provocan peores características mecánicas y químicas resultantes.

Además, para que se pueda dar una conducción eléctrica del sistema, debe añadirse un material conductor eléctricamente. Para ello se suelen usar cables de cobre, platino, acero o grafito. En la *Figura 2.10* se presenta un electrodo de pasta de carbono de forma esquemática.

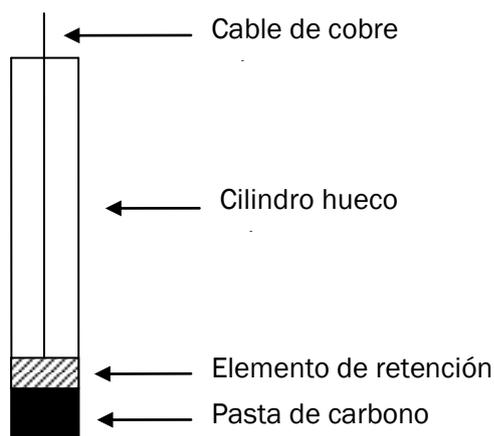


Figura 2.10. Composición de un electrodo de pasta de carbono

En el apartado 2.2 se ha explicado la configuración de la celda electroquímica para la realización del método de voltametría cíclica. La función de este electrodo de pasta de carbono en el sistema sería el de electrodo de trabajo (WE). Un ejemplo del proceso completo, desde la preparación de la pasta de carbono hasta la obtención del voltamograma se muestra en la Figura 2.11.

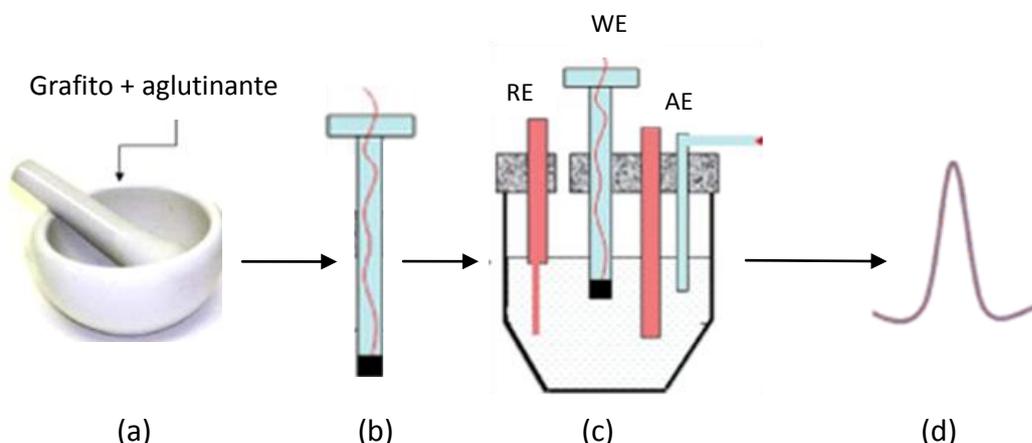


Figura 2.11. Proceso de elaboración del CPE y obtención del voltamograma

Acorde a la figura, en primer lugar se prepara la pasta de carbono, realizando una mezcla del polvo de grafito con el aglutinante hasta obtener una pasta homogénea (a), en segundo lugar se fabrica el electrodo de pasta de carbono con los elementos anteriormente comentados (b), a continuación se monta la

celda electroquímica (c) con el CPE actuando como electrodo de trabajo (WE), además del electrodo de referencia (RE) y contraelectrodo (AE); y por último se obtiene la respuesta en forma de voltamograma (d).

Como último punto de este apartado se ha creído conveniente hablar del efecto que produce en las respuestas la modificación de electrodos con diferentes componentes, los cuales actúan como mediadores electrónicos. En concreto nos hemos centrado en los antecedentes bibliográficos de diferentes tipos de nanopartículas, para así explicar el motivo de la elección de nanopartículas de titanio como elemento modificador de los electrodos.

2.3.2. Modificadores de los electrodos de pasta de carbono

Es interesante comentar la posibilidad de modificación de la pasta de carbono con diferentes tipos de partículas. Existe un gran número de referencias bibliográficas que señalan la notable mejora de resultados y el aumento de selectividad del electrodo gracias a la adición de elementos que han demostrado tener un efecto autocatalítico. Este es el caso de la ftalocianinas [13] con las que el grupo de investigación en el que se desarrolla este trabajo tiene amplia experiencia. Por otra parte, también es muy extendido el uso de nanopartículas, ya que sus propiedades nanométricas aportan unas características únicas a los electrodos de grafito. Existen, por tanto, numerosos estudios en los que se hace uso de nanopartículas de metales y óxidos de metales [14].

Como modificadores se han usado ftalocianinas de diversos metales, como son cobalto, cobre o zinc [15]. En cuanto a las nanopartículas de metales, algunas de las más usadas han sido las de oro, cobalto, hierro y manganeso [16]. En referencia a las nanopartículas de óxidos de metales, se han usado nanopartículas de óxidos de níquel, de cerio o titanio [17].

A rasgos generales, con el uso de estas nanopartículas se ha mejorado notablemente la selectividad de los electrodos, viéndose reducidos los límites de detección obtenidos; se han obtenido mayores intensidades de corriente y se ha comprobado la existencia de una mayor reversibilidad en el proceso. Se ha demostrado que las nanopartículas juegan un papel importante como mediadores electrónicos.

Teniendo en cuenta estos estudios y considerando que no existen antecedentes bibliográficos del uso de **nanopartículas de titanio**, habiéndose no obstante conseguido buenos resultados con nanopartículas de óxido de titanio, se creyó que podría ser interesante estudiar el comportamiento de

este elemento en forma nanométrica en la fabricación de sensores de grafito, y así poder determinar si aportaba estas características beneficiosas a los resultados que se habían observado con otros componentes. Para ello se aprovechará una disolución de nanopartículas de titanio en aceite teniendo en cuenta que los electrodos de grafito se compactan mediante este fluido.

2.4. Biosensores químicos

Un tipo de sensor electroquímico del que se ha hecho un uso extendido en el campo de la investigación científica es el biosensor químico. La característica compartida de estos sensores radica en la adición de un componente de tipo biológico como puede ser una enzima, anticuerpo o microorganismo. De igual forma que en el caso de sensores químicos, se encargan de transformar una señal química en otra de tipo eléctrica.

En este trabajo se ha hecho uso de biosensores químicos de tipo enzimático, por lo que se realizará una caracterización exhaustiva de los mismos.

Se ha comprobado en numerosos estudios que dichas enzimas, junto con la adición de ciertos componentes (como en este caso han sido las nanopartículas de titanio) actuando como mediadores electrónicos, han aportado a los electrodos una mejor selectividad, mayor efecto autocatalítico y límites de detección más reducidos. Ya que el caso que nos ocupa es la aplicación de electrodos de pasta de carbono para el estudio de antioxidantes y azúcares, se han encontrado un gran número de referencias bibliográficas que avalan el comportamiento mejorado en la detección de estos compuestos con la adición de enzimas [9] [18].

El proceso de inmovilización de enzimas puede realizarse por diferentes métodos. De esta forma pueden encontrarse diversas técnicas como deposición electroquímica, deposición electroforética, Langmuir-Blodgett o Layer-by-Layer (LbL) [6]. En nuestro caso se han utilizado electrodos de pasta de carbono con y sin modificar con nanopartículas y se ha hecho uso de glutaraldehído (Glu) como agente de entrecruzamiento (cross-linking).

Para este caso particular, el procedimiento seguido en el proceso de inmovilización de la enzima conlleva dos procesos de unión. En primer lugar se produce la adsorción de la enzima por la pasta y en segundo lugar se realiza el entrecruzamiento debido a la acción del glutaraldehído. Una representación de la actuación del glutaraldehído sobre las enzimas sería la correspondiente a la Figura 2.12.

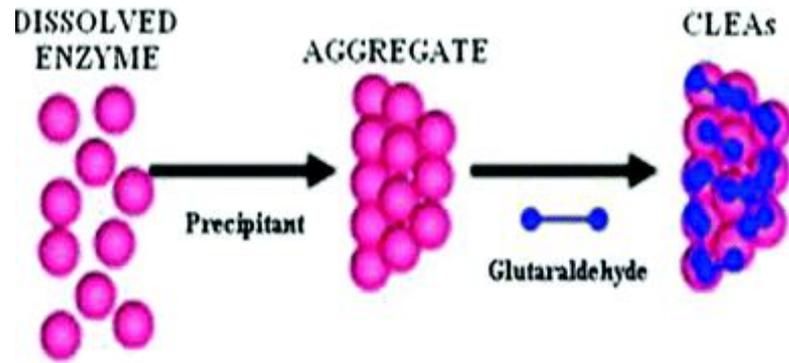


Figura 2.12. Entrecruzamiento de enzimas producido por acción del glutaraldehído

A continuación se procederá a realizar una explicación detallada de los biosensores creados a partir de las dos enzimas que se han utilizado para la consecución de este trabajo, siendo éstas la tirosinasa (Tyr) y la glucosa oxidasa (GOx).

2.4.1. Biosensor de tirosinasa

La tirosinasa también es conocida como monofenol monooxigenasa o catecol oxidasa. Esta enzima cataliza la oxidación de fenoles, por lo que en este trabajo se ha usado en la detección de catecol e hidroquinona. Su estructura molecular en tres dimensiones se muestra en la *Figura 2.13*.

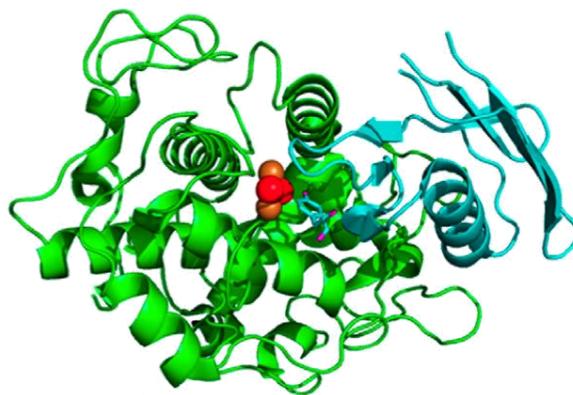


Figura 2.13. Estructura de la tirosinasa en 3D

En la *Figura 2.14* se presenta el mecanismo de actuación de la tirosinasa. Si un polifenol (en este caso el catecol) se oxida en presencia de oxígeno y tirosinasa da lugar a una o-quinona (en este caso benzoquinona) y agua. Esta o-quinona se reduce en la superficie del electrodo.

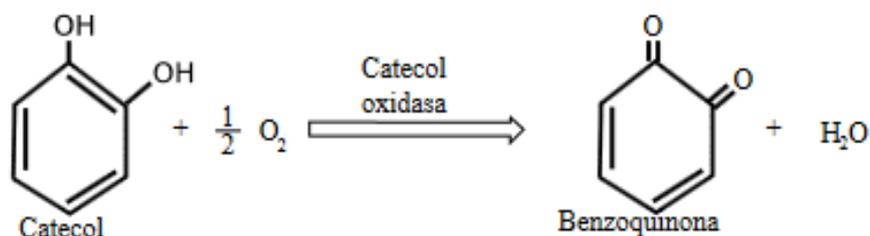


Figura 2.14. Oxidación de catecol en presencia de tirosinasa

Hemos decidido utilizar esta enzima para la detección de antioxidantes en este trabajo debido a la selectividad que presenta para la detección de fenoles y polifenoles y a que es una enzima ampliamente usado en la investigación científica, que ha demostrado aportar claras mejoras a las respuestas voltamétricas [11] [13].

2.4.2. Biosensor de glucosa oxidasa

Se trata de una oxidorreductasa que cataliza la oxidación de la glucosa, por lo que en este trabajo se ha usado para la determinación de azúcares, en concreto, α -D-Glucosa. Su estructura en tres dimensiones se muestra en la *Figura 2.15*.

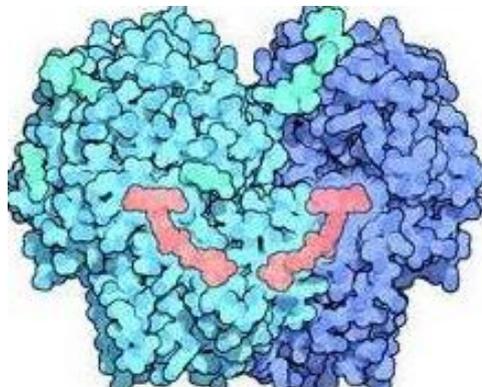
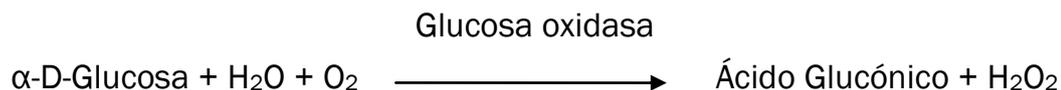


Figura 2.15. Estructura de la glucosa oxidasa en 3D

Estos azúcares no pueden ser determinados sin la utilización de la enzima GOx específica, por lo que para la detección de glucosa únicamente se ha trabajado con biosensores.

En presencia de esta enzima y oxígeno se produce la oxidación de α -D-Glucosa para formar D-glucono- δ -lactona y, mediante hidrólisis, conseguir finalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido glucónico de la forma siguiente:



Esta enzima ha sido ampliamente usada en el campo de la investigación y es de gran interés científico, ya que ha demostrado tener un buen comportamiento en cuanto a la detección de azúcares [19].

2.5. Antioxidantes y azúcares en uvas de mostos

Son múltiples los componentes químicos que se encuentran en los productos alimenticios, tomando algunos de ellos una mayor importancia respecto a otros debido a las propiedades perjudiciales o beneficiosas que aporta su consumo. Existe un gran interés por parte de la industria y la ciencia de poder caracterizarlos y determinar su aparición en los diferentes productos, ya que un mayor porcentaje de aparición de elementos beneficiosos aporta un elevado valor añadido a dicho alimento. Debido a ello, se han desarrollado diversos métodos de detección de los mismos, mencionados en el apartado 2.3, que permiten discriminar y controlar la calidad de ciertas sustancias alimenticias en función del porcentaje que contienen de alguno de estos componentes. El grupo de sensores de la Universidad de Valladolid, con el que he trabajado durante estos meses, enfoca sus investigaciones al estudio de vinos y mostos, por lo que en este trabajo nos hemos centrado en el estudio de polifenoles y azúcares, debido a las propiedades antioxidantes de los primeros y el gran porcentaje de aparición en uvas de mostos de los segundos. Aun así, pueden encontrarse diversos estudios cuyo objeto de aplicación son diferentes tipos de cervezas o aceites [12] [20]. En los siguientes apartados se explicarán estos componentes en mayor detalle.

2.5.1. Polifenoles

Los polifenoles se definen como un conjunto heterogéneo de moléculas que se caracterizan por tener grupos bencénicos en su estructura molecular, sustituyendo hidrógenos de la cadena por funciones hidroxílicas. Una de las propiedades más remarcadas de los polifenoles es su capacidad antioxidante. Esta propiedad es la que los ha convertido en un material muy interesante y deseable desde el punto de vista de una dieta saludable.

Existen cerca de 8000 polifenoles diferentes, siendo los principales grupos [14]:

- ❖ **Flavonoides:** pigmentos verdes no nitrogenados. Existen unos 600 tipos diferentes dentro de este grupo, y su aparición se produce en compuestos vegetales y plantas. Algunos de los flavonoides más destacados son las catequinas, los carotenos, los betacarotenos, la quercitina, la luteína o el resveratrol.
- ❖ **Ácidos y alcoholes fenólicos:** algunos de los más conocidos son los ácidos gálico, cafeico y vanílico.

Los polifenoles se pueden encontrar en más de 450 alimentos diferentes. Se han realizado numerosos estudios relativos a polifenoles debido a las propiedades antioxidantes que éstos poseen. Además de ello, se ha comprobado que tienen propiedades anti-inflamatorias y que son capaces de actuar sobre el sistema neurológico aliviando, entre otras cosas, la ansiedad. Asimismo actúan como antiagregante plaquetario y antitrombótico, por lo tanto, son claramente beneficiosos en cuanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares. También se ha comprobado que una dieta rica en polifenoles disminuye el riesgo de aparición de tumores cancerígenos y enfermedades neurodegenerativas. Debido a todas estas propiedades beneficiosas para el consumo humano se han realizado numerosas investigaciones científicas en torno a ellos, desarrollando y optimizando métodos de detección e identificación de los mismos [9].

Como se ha dicho anteriormente, el objetivo de la fabricación de estos sensores es la aplicación a vinos y mostos, por lo que resulta de interés comentar la importancia de la aparición de antioxidantes en la composición de los mismos y las consecuencias que estriban del mayor o menor contenido de polifenoles en los mostos. Según el grado de maduración en el que se encuentre la uva, el contenido en polifenoles sufre una variación, por lo que el mayor o menor porcentaje de aparición de los mismos en la uva puede convertirse en un parámetro de determinación de la madurez de la misma además de un importante índice de calidad. Debido a ello, resulta de suma

importancia poder realizar una detección del contenido de estos polifenoles en vinos y mostos. De esta forma, se han elegido como antioxidantes para la realización de este trabajo dos isómeros de igual estructura molecular, que cobran una importancia elevada en la aparición en las uvas de mostos, siendo éstos el catecol (CC) y la hidroquinona (HQ). Cabe destacar que este trabajo es un estudio preliminar del comportamiento de los CPE en cuanto a la detección de antioxidantes y azúcares, por lo que no se ha estudiado el comportamiento de estos sensores directamente en mostos puesto que será objeto de una investigación posterior una vez se haya concluido su utilidad al respecto. Se presenta, por tanto, como una línea de futuro la aplicación de estos CPE en mostos de diferentes características y composiciones.

A continuación se comentarán más en detalle las características y propiedades de estos dos isómeros elegidos para la realización de este trabajo.

❖ Catecol

También es conocido como pirocatecol o 1,2-didroxibenceno. Su fórmula estructural es $C_6H_6O_2$, su masa molecular es 110,1 g/mol y su densidad 1,34 g/cm³. Se presenta comercialmente en forma de cristales de plumas blancas, fácilmente solubles en agua. En la *Figura 2.16* se representa su estructura molecular.

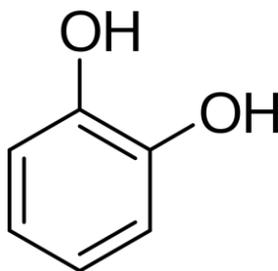


Figura 2.16. Estructura molecular del catecol

❖ Hidroquinona

También conocido como 1,4-dihidroxibenceno. Su fórmula molecular es $C_6H_6O_2$, su masa molecular es 110,11 g/mol. Tiene una densidad de 1,30 g/cm³, un punto de fusión a 172 °C y un punto de ebullición a 287 °C. Su estructura molecular se representa en la *Figura 2.17*.



Figura 2.17. Estructura molecular de la hidroquinona

Ambos isómeros han sido utilizados en numerosas investigaciones, realizándose su caracterización con diferentes tipos de sensores. Sin embargo, es de gran interés poder caracterizarlos, no de forma independiente, sino conjunta en una mezcla de ambos. Esto es debido a que posibilitaría que un único sensor fuera capaz de realizar discriminaciones de ambos componentes en la aplicación directa de mostos, lo cual despierta gran interés en este campo. A causa de ello, se han realizado investigaciones previas en las que se ha buscado poder llevar a cabo esta discriminación conjunta [21] [22] pero se han encontrado dificultades en el proceso debido a que los picos asociados aparecían englobados, por producirse a potenciales muy similares. Es por esto que uno de los objetivos que perseguimos con este trabajo es poder determinar ambos isómeros en una mezcla de ambos componentes, y así determinar si los sensores modificados con nanopartículas son adecuados para realizar este proceso.

2.5.2. Azúcares

Dentro de esta denominación se clasifican los diferentes monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos. De esta forma, los azúcares se clasifican, de acuerdo al número de sacáridos que contienen, en tres grupos principales:

- ❖ **Monosacáridos:** también llamados azúcares simples. Dentro de este grupo se encuentran la glucosa y la fructosa.

- ❖ **Disacáridos:** como su propio nombre indica, contienen dos sacáridos en su cadena. Algunos de ellos son la lactosa, la sacarosa o la maltosa.
- ❖ **Oligosacáridos:** este grupo se caracteriza por tener tres sacáridos en su estructura. Algunos de los principales oligosacáridos o trisacáridos son la maltotriosa o rafinosa.

Centrándonos en la importancia de los azúcares en la composición de la uva, cabe destacar que son uno de los elementos que aparece en mayor proporción, sólo superado por el agua. Se encarga de aportar sabor dulce a la uva y es un elemento importante como fuente de energía. Tiene gran facilidad de oxidación y capacidad reductora. En este trabajo nos centraremos en el estudio de α -D-Glucosa, cuyas características principales se presentan a continuación.

❖ α -D-Glucosa

Es un compuesto de fórmula estequiométrica $C_6H_{12}O_6$. Su masa molecular es 180 g/mol, posee una densidad de 1,54 g/cm³ y su punto de fusión es 150 °C. La estructura molecular se puede observar en la *Figura 2.18*.

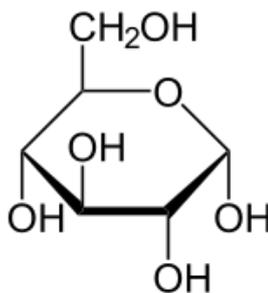


Figura 2.18. Estructura molecular de la glucosa

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo de este capítulo es realizar una explicación detallada de los pasos seguidos para la consecución de toda la parte experimental llevada a cabo en este trabajo. Para ello se comenzará realizando una explicación de la preparación de los electrodos de pasta de carbono, continuando con la fabricación de biosensores, y explicando, en último lugar, la técnica experimental de voltametría cíclica en detalle, utilizada en la caracterización de los sensores. En todos los apartados se detallarán, además, los materiales utilizados para cada proceso.

3.1. Preparación de sensores

Dentro de la diversidad de sensores con los que se trabaja a día de hoy, comentados en el capítulo anterior, el tipo de sensores que se ha elegido para ser usados en este trabajo son los elaborados a partir de pasta de carbono. Se usarán los electrodos de pasta de carbono como elementos de referencia en las mediciones, y se fabricarán otros sensores modificados con nanopartículas de titanio, cuyos resultados se compararán con los primeros para poder estudiar las modificaciones que supone la introducción de estas nanopartículas en el comportamiento electroquímico de los sensores.

A continuación se comentarán los materiales utilizados para la fabricación de estos electrodos, el proceso de elaboración de la pasta y la fabricación del soporte de contención de la misma.

3.1.1. Materiales utilizados

Para poder llevar a cabo la preparación de la pasta de carbono de los electrodos de trabajo, hemos hecho uso de los siguientes materiales del laboratorio:

- ❖ Grafito Ultracarbon F purity
- ❖ Espátulas
- ❖ Vidrios de reloj

- ❖ Pipetas Pasteur
- ❖ Aceite mineral (Nujol)
- ❖ Nanopartículas de Titanio en base aceite
- ❖ Balanza analítica de precisión Precisa 125A

En cuanto a la fabricación de los soportes de contención de la pasta de carbono, los materiales necesarios han sido:

- ❖ Jeringuillas PVC 1 mL (Cod. 07642157 1 ml BD Suministros Jimeno)
- ❖ Bobina de cable Cu/Sn (diámetro = 1,5 mm)
- ❖ Cúter, tijeras, pinzas
- ❖ Mechero
- ❖ Clips

3.1.2.Preparación de la pasta

Se han usados dos composiciones diferentes en cuanto a la pasta de carbono, por lo que los sensores utilizados para los estudios experimentales se clasifican en dos tipos:

- ❖ **Electrodos de carbono:** para la fabricación de 4 sensores de este tipo se han utilizado 0,20 gramos de carbono y 0,13 gramos del aceite mineral Nujol.
- ❖ **Electrodos de carbono modificados con nanopartículas de Titanio:** en este caso, y ya que las nanopartículas de Titanio están dispuestas en base de aceite, para el mismo número de sensores, las cantidades usadas serán 0,17 gramos de carbono, 0,10 gramos de Nujol y 0,03 gramos de nanopartículas de titanio.

Se depositan las cantidades de cada uno de los casos anteriores en un vidrio de reloj diferente y se pesan en la balanza analítica de precisión Precisa 125A (*Figura 3.1*).



Figura 3.1. Balanza analítica de precisión Precisa 125A

Se debe controlar que las cantidades sean las correctas, ya que una mala elección las mismas puede provocar que la pasta quede excesivamente líquida, y que por tanto, no se introduzca bien en los soportes de las jeringuillas, o que quede demasiado espesa, y como consecuencia se produzcan poros al realizarse el llenado. Es importante que la pasta se introduzca correctamente, de forma homogénea y que no exista porosidad en el sensor final, por lo que es necesario seguir los pasos con mucho cuidado.

Una vez que se depositan los diferentes componentes en el vidrio de reloj se procede a la homogeneización de la mezcla con la ayuda de una espátula.

En primer lugar se junta toda la pasta en el centro del vidrio de reloj, con cuidado de que no queden restos de algún componente en los laterales, como en la *Figura 3.2. (a)*.

A continuación se procede a homogeneizar la pasta. Para ello, se presiona la pasta poco a poco con la espátula, extendiéndola lentamente en una dirección determinada como indica la *Figura 3.2. (b)* hasta que queda una fina capa repartida en el vidrio de reloj (*Figura 3.2. (c)*). A continuación, se gira el vidrio unos 45° aproximadamente y se repite el mismo proceso en esa dirección. Se repite el proceso hasta que se retorna a la posición inicial.

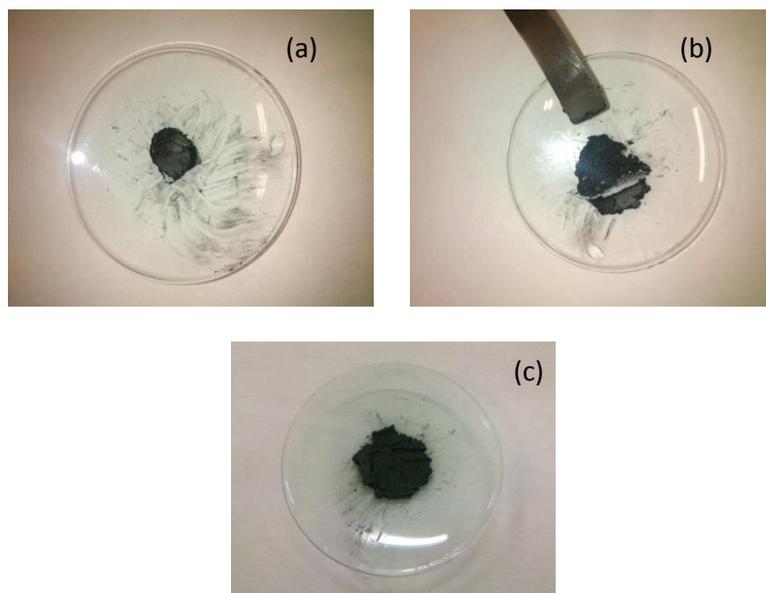


Figura 3.2. Proceso de homogeneización de la pasta de carbono

Se repite todo el proceso durante unos 45 minutos, y se deja reposar la mezcla durante 4 o 5 horas.

Pasado este tiempo vuelve a repetirse el procedimiento anterior durante otros 45 minutos. En ese momento la pasta ya está lista para introducirse en los soportes, por lo que el siguiente paso es preparar estos para que el contacto eléctrico posterior se realice satisfactoriamente.

3.1.3. Fabricación de los electrodos

Como soportes para la contención de la pasta de carbono se han usado jeringuillas PVC de 1 mL de capacidad, como la mostrada en la *Figura 3.3*.



Figura 3.3. Jeringuilla PVC 1 mL

Será necesaria una preparación previa de los mismos, antes de poder introducir la pasta, por lo que deberán seguirse los pasos comentados a continuación.

En primer lugar, se separan los diferentes elementos que componen la jeringuilla y se desecha la aguja, ya que ésta parte no será necesaria para la fabricación de los electrodos.

En segundo lugar, para poder introducir el cable de cobre, que servirá de elemento conductor eléctrico, será necesario realizar una perforación en la pieza de goma de la jeringuilla para que el cable pueda atravesarlo. Dicha perforación se realizará con un clip puesto al rojo con la ayuda de un mechero, y deberá quedar lo más centrada posible, para que el cable que posteriormente se introducirá en ella sea lo más equidistante posible a las paredes del soporte. El resultado quedaría de la forma representada en la *Figura 3.4*.



Figura 3.4. Proceso de perforación del émbolo

A continuación debe realizarse un corte plano, con la ayuda de un cúter, en el extremo esférico final del émbolo, y otro de forma triangular en la parte superior para que el cable pueda deslizarse sin encontrarse con ningún obstáculo (*Figura 3.5*).



Figura 3.5. Proceso de corte de émbolo

Por último deberá cortarse el cable de cobre con la ayuda de unas tijeras. Éste deberá tener una longitud de 20 cm, y será necesario pelarlo por ambos lados, con una longitud diferente en cada uno de ellos. En el extremo en el que el cable hace contacto con la pasta de carbono, deberá existir una longitud pelada de 1 cm, y en el extremo en el que va conectado al potencióstato, ésta será de 2 cm (*Figura 3.6*).



Figura 3.6. Cable de cobre de diámetro 1,5 mm

Finalizada la preparación de las diferentes partes del soporte, se colocará el cable junto al émbolo, se hará pasar la pieza de goma por ambos componentes para mantenerlos unidos y todos ellos se introducirán en el soporte. Se debe procurar que el extremo del cable que posteriormente se encontrará en contacto con la pasta quede un par de milímetros por debajo de la superficie del final del soporte, ya que si sobresale algo de cable se producirán errores en las mediciones.

El resultado final de la jeringuilla preparada para la introducción de la pasta se representa en la *Figura 3.7*.

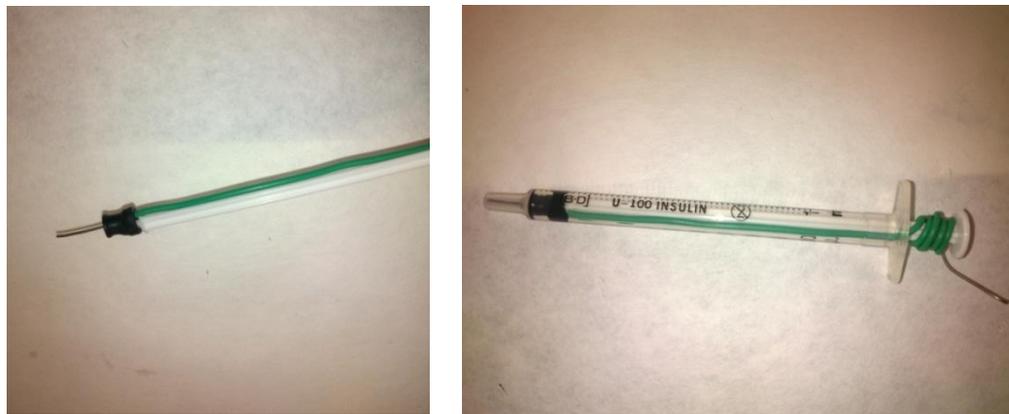


Figura 3.7. Jeringuilla modificada para su utilización como CPE

El último paso es introducir la pasta de carbono en el soporte preparado. Para ello, se extenderá cuidadosamente la pasta por el vidrio de reloj, procurando que la capa que queda sea muy fina, para que dicha pasta se introduzca con suavidad en el soporte.

Realizado esto, se colocará la jeringuilla a unos 45° respecto a la mesa de trabajo y se llevará ésta desde el extremo del vidrio de reloj hasta el centro, barriendo la pasta que encuentre en el camino. Al llegar a la posición central, se colocará la jeringuilla en posición vertical, para que la pasta barrida se introduzca en el volumen inferior del soporte.

Se repite esta operación durante unos 45 minutos y se deja reposar el electrodo en posición horizontal durante una noche. Es importante que en esta primera parte de la operación la pasta se introduzca de forma suave, sin forzarla a entrar en la jeringuilla con movimientos bruscos o impactos de la superficie de entrada de la pasta contra el vidrio de reloj o la espátula.

Pasada esa noche de reposo, se vuelve a repetir el proceso de nuevo, pudiéndose realizar en esta ocasión “picoteos” de la superficie de la jeringuilla contra el vidrio de reloj, para eliminar los posibles poros que se puedan producir, y con el fin de compactar toda la pasta en el volumen afinado para que el contacto eléctrico posterior se realice de forma satisfactoria.

Pasados esos 45 minutos de proceso, se deben colgar los electrodos finales durante una noche, para lo que hemos usado las pinzas del laboratorio (Figura 3.8).

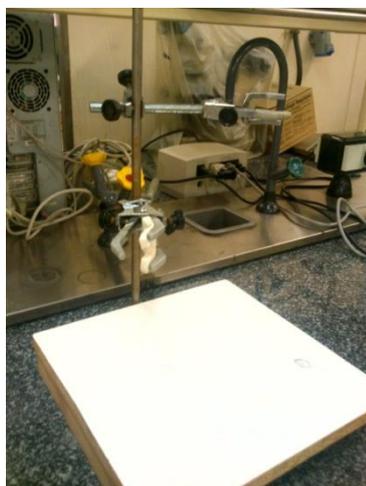


Figura 3.8. Pinzas de sujeción

El motivo de colgar los electrodos se debe al propósito de que éstos permanezcan en posición vertical durante el tiempo de reposo, para que el electrodo exude el Nujol que contiene la mezcla. Durante el tiempo de reposo se deberán cubrir con papel de aluminio para que permanezcan aislados del exterior (Figura 3.9).



Figura 3.9. Sistema de reposo vertical de los electrodos

Una vez pasado el tiempo de espera ya puede descolgarse y almacenarse para las posteriores mediciones que se realizarán con él. El electrodo preparado para la medición de los resultados se puede ver en la *Figura 3.10*.

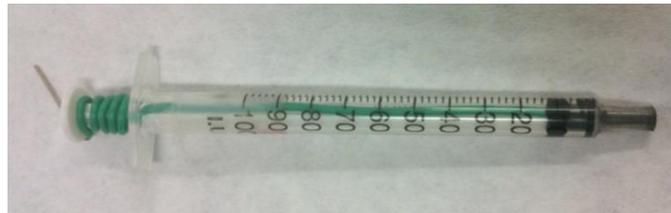


Figura 3.10. CPE preparado para su utilización

Por último, se representa una imagen con los dos tipos de sensores diferentes, el inferior es el electrodo de grafito, y el superior el modificado con nanopartículas de titanio (*Figura 3.11*)



Figura 3.11. Comparativa de electrodo CPE-C con CPE-TiNP's

Una vez que se ha detallado el procedimiento de creación de los electrodos de pasta de carbono, se procederá a explicar cómo éstos se transforman en biosensores, ya que para la realización de la parte experimental se ha trabajado con ambos tipos de electrodos.

3.2. Preparación de biosensores

Para su fabricación se parte de los sensores de pasta de carbono, cuya elaboración se ha explicado anteriormente, y se les adiciona una enzima específica, que reaccionará con el analito para su detección, convirtiendo así el sensor en específico. En los apartados siguientes se detallarán las enzimas utilizadas para la medición de cada uno de los diferentes analitos y el procedimiento que se ha seguido para la deposición de los mismos en los CPE.

3.2.1. Elementos utilizados

El elemento que diferencia a los biosensores de los sensores comentados en el apartado anterior es la adición a la pasta de carbono de una enzima. Por ello, en primer lugar, es necesario determinar las enzimas usadas. Para el estudio del presente trabajo se han utilizado dos enzimas diferentes, habiéndose elegido cada uno de ellas para la medición de un compuesto determinado:

- ❖ **Tirosinasa from mushroom (tyr):** con esta enzima se realizarán mediciones de antioxidantes. En este caso será utilizado para la medición de catecol, hidroquinona, y mezclas de ambos analitos.
- ❖ **Glucosa Oxidasa G7141 Type X-S (GOx):** esta enzima es específica para la medición de azúcares. Por tanto, será utilizada para la caracterización de la glucosa.

El resto de elementos necesarios para poder llevar a cabo la preparación de los biosensores son los siguientes:

- ❖ **Micropipeta Pluripet (Figura 3.12):** Debido a que la cantidad de enzima depositada en el electrodo es de 10 μL , es necesario disponer de un instrumento que sea capaz de administrar esta cantidad. Debido a ese motivo se ha usado esta micropipeta de alta precisión, que tiene un rango de medida de 0 a 10 μL .



Figura 3.12. Micropipeta Pluripet

- ❖ **Soporte** para colocar los electrodos en posición vertical (Figura 3.13). Esto permite que la deposición de la gota de enzima se pueda depositar correctamente. Esta caja tiene unas perforaciones con un diámetro igual al de los electrodos, para que así puedan mantenerse en la posición indicada.



Figura 3.13. Soporte de mantenimiento vertical de electrodos

- ❖ **Tapa** para vaso de precipitados (Figura 3.14). La función de ésta es el acoplamiento con el vaso de precipitados que contiene la solución de glutaraldehído. Lo que se busca es un cierre hermético para que los vapores del glutaraldehído actúen única y exclusivamente sobre la superficie de los electrodos, y que no haya escape de ellos al ambiente. Esta tapa tiene unas perforaciones de igual diámetro que la boquilla de la jeringuilla para que se adapten a ella adecuadamente, y de forma que puedan mantenerse en posición vertical durante el proceso.

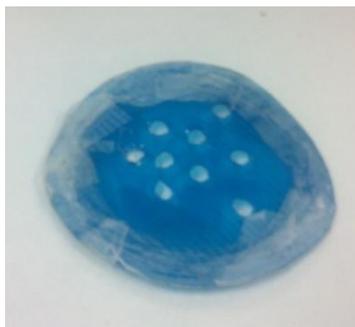


Figura 3.14. Tapa para vaso de precipitados

3.2.2. Procedimiento de deposición de enzimas

Como se ha comentado en el apartado 2.4, en la deposición de enzimas se produce un proceso de adsorción de los mismos por la pasta, y otro proceso posterior, denominado cross-linking, provocado por el efecto de los vapores del glutaraldehído que sirve de fijador aunque también ejerce un cierto efecto pantalla.

En primer lugar se introducirán los sensores a los que se les vaya a depositar la enzima en una solución buffer fosfato durante 2 minutos. La razón de realizar este paso es debido a que la enzima debe trabajar con compuestos a pH neutro para que ésta se mantenga en perfectas condiciones, por lo que debe asegurarse que se eliminan correctamente los restos que pudieran quedar en el electrodo de anteriores disoluciones con las que haya podido entrar en contacto. En nuestro caso, antes de depositar la enzima, todos se ciclaron en KCl 0,1 M de pH 5 para observar si existía algún posible error en alguno de ellos, por lo que después se introducían en una solución tampón buffer fosfato 0,01 M de pH 7 para la eliminación de los posibles restos de KCl que hubieran quedado en el electrodo.

A continuación deben colocarse en posición vertical, posicionándose el extremo en el que se encuentra la pasta hacia arriba, para posibilitar la deposición de la enzima en ese extremo. Para ello, se colocan en la caja con perforaciones y se deposita en la punta del electrodo una gota de 10 μ L de enzima, previamente descongelada, controlándose la cantidad con la micropipeta Pluripet. En la *Figura 3.15* se representa la disposición de los electrodos en la caja, y puede visualizarse la gota en la punta del electrodo.

Después de la deposición de la primera gota es necesario dejar reposar el electrodo unos 45 minutos, ya que ese es el tiempo que se tarda aproximadamente en absorber por completo la gota. Esperado ese tiempo, se

procederá a depositar la segunda y última gota sobre el electrodo, y se dejará reposar otros 45 minutos. Con este proceso se ha completado la primera parte de adsorción de la enzima.

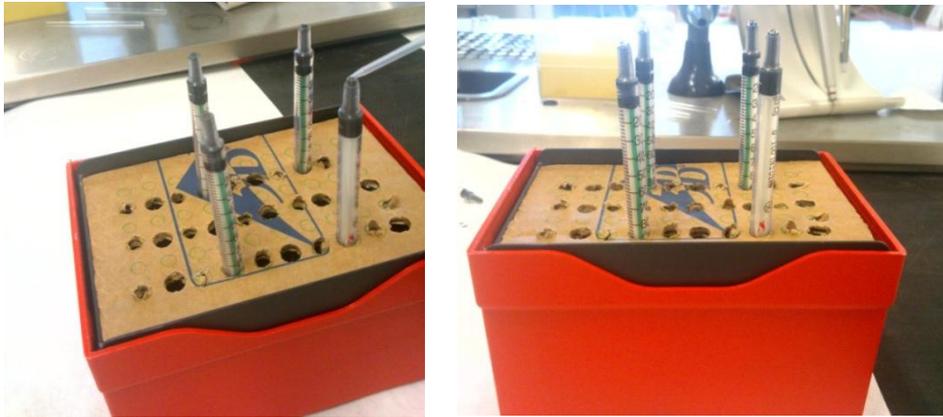


Figura 3.15. Deposición del enzima en la superficie de los electrodos

A continuación se pondrán en contacto los electrodos con los vapores del glutaraldehído durante 20 minutos para que se produzca el efecto de entrecruzamiento de las enzimas con la pasta de carbono, denominado cross-linking, y así asegurar que las enzimas se pegan de forma correcta a la pasta del sensor.

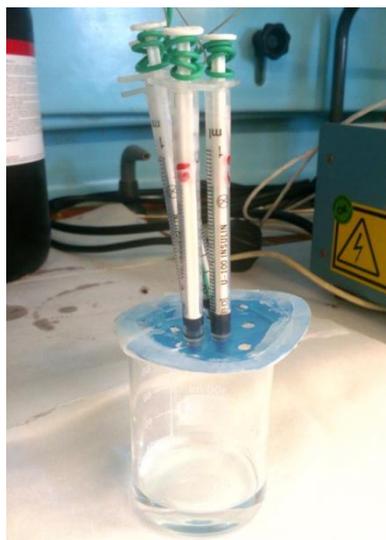


Figura 3.16. Proceso de contacto de electrodos con vapores del glutaraldehído

Para ello se ha diseñado una tapa con diferentes agujeros del mismo tamaño que la boquilla de la jeringuilla, así es posible poner en contacto el vaso de precipitados que contiene el glutaraldehído con la superficie del electrodo en la que se encuentra la pasta de carbono. Se procurará que los sensores se encuentren lo más verticales posibles. La disposición se puede observar en la *Figura 3.16*.

Una vez transcurridos los 20 minutos, se dejarán reposar al aire los electrodos durante 15 minutos y se congelará el glutaraldehído para futuros procesos. Por último, se volverán a introducir los electrodos en la solución de buffer fosfato durante 30 segundos. Con este último proceso se habrá completado la creación de biosensores.

Estos biosensores pueden usarse inmediatamente después para realizar las mediciones oportunas. Otra alternativa es guardarlos de forma horizontal a 4 °C hasta que sea necesaria su utilización. Se aconseja no demorarse en exceso en la utilización de los biosensores una vez colocada la enzima, ya que ésta puede perder propiedades con el paso del tiempo.

3.3. Medición de resultados

Una vez que se han preparado los (bio) sensores se procede al uso de los mismos para la caracterización de los diferentes compuestos que se vayan a usar, siendo en nuestro caso el catecol, la hidroquinona y la glucosa. A continuación se detallarán los elementos usados para la realización de las mediciones, las diferentes disoluciones preparadas para la obtención de los resultados, y la caracterización de nuestro proceso de medición.

3.3.1. Elementos utilizados

En primer lugar se enumerarán los elementos del laboratorio utilizados y en segundo lugar se comentarán los diferentes elementos necesarios para la creación de la celda electroquímica y la realización del proceso experimental.

Material de laboratorio

Se ha hecho uso de los siguientes elementos:

- ❖ Guantes de látex

- ❖ Matraces de 50, 100 200, 500 y 1000 mL
- ❖ Vasos de precipitado
- ❖ Espátulas
- ❖ Cucharillas
- ❖ Vidrios de reloj
- ❖ Cápsulas de eppendorf
- ❖ Probetas
- ❖ Pipetas Pasteur
- ❖ Parafilm
- ❖ Tijeras
- ❖ Papel de aluminio
- ❖ Mechero
- ❖ Micropipeta Ecopipette



Figura 3.17. Micropipeta Ecopipette

Elementos para las mediciones electroquímicas

Como elementos constitutivos de la celda electroquímica han sido necesarios los siguientes instrumentos:

- ❖ **Electrodo de trabajo:** como electrodo de trabajo se han utilizado los (bio)sensores preparados como se ha determinado en apartados anteriores. Se coloca en la posición central del sistema.

- ❖ **Electrodo de referencia:** se usará el electrodo Ag/AgCl/KCl 3M (Figura 3.18). Para purificarlo se lava el extremo con agua ultra pura desionizada. La disposición del mismo en el sistema es la izquierda.



Figura 3.18. Electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3M

- ❖ **Contraelectrodo:** se ha usado un hilo de platino (Figura 3.19). Antes de la utilización del mismo es necesario purificarlo, para ello se quema el extremo que estará en contacto con la disolución con un mechero durante unos segundos. El electrodo ocupa la posición izquierda de la celda.



Figura 3.19. Contraelectrodo de platino

El analito se dispondrá en una celda, de tamaño grande o pequeño, en función de la cantidad con la que se trabaje del mismo (Figura 3.20).



Figura 3.20. Celda de tamaño grande

En la *Figura 3.21* se representan los electrodos y contraelectrodo determinados formando el circuito explicado, y habiendo siempre contacto entre la disolución que se pretenda medir y todos los elementos del sistema.

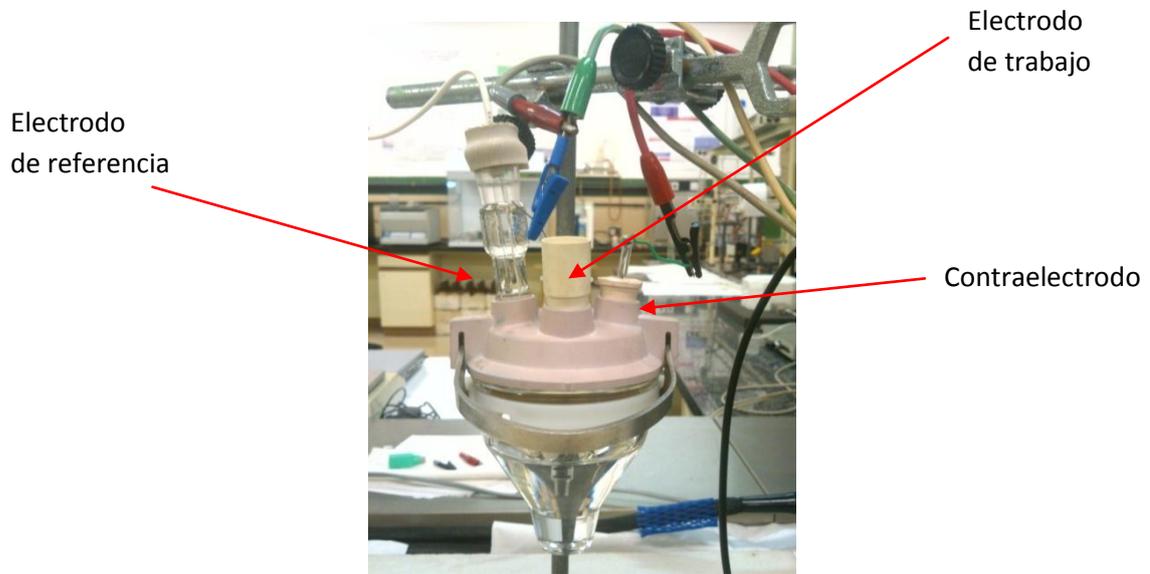


Figura 3.21. Celda electroquímica

Como herramienta para establecer el potencial de polarización necesario, registrar la densidad de corriente para cada valor de potencial y representar los resultados por medio del software específico, se ha usado el Potenciostato/Galvanostato PARStat 2273 (*Figura 3.22*).



Figura 3.22. Potenciostato/Galvanostato PARStat 2273

La disposición de los elementos que se han comentado en este apartado, necesarios para la realización de mediciones, se visualizan en la *Figura 3.23*.



Figura 3.23. Disposición de elementos para el análisis experimental

El software utilizado para la representación y generación de resultados a partir de los que se ha realizado posteriormente el tratamiento de datos es Electrochemistry PowerSuite, de Princeton Applied Research (*Figura 3.24*).



Figura 3.24. Software Electrochemistry PowerSuite

3.3.2. Disoluciones utilizadas

Para poder llevar a cabo la realización de las mediciones descritas en el apartado anterior, se han preparado diferentes disoluciones. El agua que se ha utilizado como disolvente en las diferentes soluciones ha sido agua ultrapura destilada y desionizada MilliQ MILLIPORE (*Figura 3.25*).



Figura 3.25. Sistema MilliQ MILLIPORE

Para la medición de las diferentes masas necesarias en la preparación de cada disolución se ha utilizado la balanza digital analítica Precisa 125A correspondiente a la *Figura 3.1*.

Para asegurar que los reactivos se disolvían correctamente se utilizó el dispositivo de ultrasonidos Selecta Ultrasons, que se muestra en la *Figura 3.26*.



Figura 3.26. Dispositivo de ultrasonidos Selecta Ultrasons

A continuación se presentan las distintas disoluciones preparadas durante la realización de este trabajo.

❖ **Solución de cloruro potásico (KCl) 100 mL 0,1 M.**

Se disuelven 0,7518 g de KCl en agua ultrapura desionizada. Esta disolución se usa como base para medir los electrodos y comprobar que funcionan de la manera adecuada, y como disolvente para preparar disoluciones de catecol e hidroquinona. También es la disolución que contiene el electrodo de referencia, por lo que es necesario prepararla cuando sea necesario cambiar la disolución del interior del electrodo.

❖ **Solución de buffer fosfato 1L 0,1 M (pH=7)**

Para la preparación de esta disolución, que se usará como disolvente de los antioxidantes y la glucosa, es necesario disolver dos elementos diferentes en agua ultrapura desionizada, cuyas denominaciones y cantidades necesarias se presentan a continuación:

- Fosfato monosódico (NaH_2PO_4)  0,7318 g
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)  0,5393 g

La utilización de buffer fosfato como disolvente de los analitos en lugar de KCl aporta al medio un pH neutro, a diferencia de la solución de KCl, que tiene un pH de, aproximadamente, 5. Esta diferencia es crucial cuando las mediciones se realizan con enzimas, ya que éstas deben trabajar en un medio neutro, por lo que la utilización de un disolvente u otro se determinará en función de si las mediciones se realizan con sensores, en cuyo caso el disolvente sería KCl, o si se trabaja con biosensores, que se usaría buffer fosfato como disolvente.

Como último punto a destacar sobre la preparación y uso del buffer fosfato, cabe decir que puede usarse hasta semanas después de su preparación, siempre y cuando se mantenga guardado en el frigorífico.

❖ Solución de catecol 100 mL 10^{-3} M

Para esa cantidad determinada, se disuelve una cantidad de 0,011 g de catecol en el disolvente correspondiente. Como disolventes se han usado KCl o buffer fosfato, dependiendo del pH que se deseaba aportar a la solución en cada momento. En el caso de mediciones con sensores, el disolvente que se ha usado en la fase de experimentación ha sido KCl, y para las pruebas con biosensores, donde el pH requerido era 7, se ha usado como medio solvente buffer fosfato.

Esta disolución debe prepararse en el momento de uso y es necesario que se proteja con papel de aluminio, ya que se oxida con facilidad.

❖ Solución de hidroquinona 100 mL 10^{-3} M

Para la preparación de la misma cantidad de disolución que en el caso anterior, la cantidad que deberá aportarse del elemento será la misma, ya que las masas moleculares de ambos analitos son idénticas. Asimismo, como en el caso del catecol, el disolvente utilizado será KCl o buffer fosfato, dependiendo del medio en el que se desee trabajar.

También se han preparado las disoluciones requeridas en el momento de la utilización y se han protegido adecuadamente, ya que la hidroquinona es igualmente sensible a la oxidación.

❖ Solución de glucosa 100 mL 10^{-3} M

Se utilizarán 0,036 g de α -D-glucosa para esa cantidad determinada. Ya que la glucosa únicamente se ha medido con enzima Glucosa Oxidasa, y la enzima necesita un pH neutro para comportarse de forma adecuada, el disolvente que se ha usado siempre ha sido buffer fosfato.

Esta disolución puede permanecer varios días en perfecto estado posteriormente a su preparación, siempre que se guarde a 4 °C y protegida con papel de aluminio.

❖ Solución de glutaraldehído

Se prepara una disolución de glutaraldehído al 25%, que se usará para poner en contacto los vapores con los sensores con la enzima depositada, y así producirse el entrecruzamiento de la enzima con la pasta.

Esta solución puede usarse más de una vez, siempre que se proteja con parafilm y papel de aluminio, y se mantenga la solución guardada y congelada.

3.3.3. Voltametría cíclica

Los sensores de pasta de carbono con y sin modificar son sensores voltamétricos y por tanto se utiliza la voltametría cíclica como técnica de medición en todos los ensayos realizados, aunque los parámetros de ensayo varían en función del analito y del tipo de (bio)sensor. En este apartado se detallan los valores de potenciales y el número de ciclos realizados para cada tipo de estudio realizado.

A continuación se explicará la puesta en marcha del mismo para nuestro proceso de medición en concreto, que ha sido el de la realización de mediciones a partir de voltametría cíclica en rampa.

A lo largo de la definición de todos los parámetros necesarios para la realización de una medición, se muestran diferentes ventanas en el software, en las cuáles establecemos los datos necesarios en cada caso.

En el momento de iniciar un nuevo experimento, debemos elegir qué tipo de método estableceremos. Como se ha dicho anteriormente, para este trabajo se ha elegido la opción de voltametría cíclica en rampa (Cyclic Voltammetry (Ramp)). Como bien se muestra en la descripción, para definir completamente este método, será necesario introducir el potencial inicial y los dos potenciales extremos, que en nuestro caso variarán dependiendo del analito con el que se trabaje en cada momento.

De este modo, en la primera ventana (*Figura 3.27*) se elige el tipo de experimento a realizar, en nuestro caso se elegiría Cyclic Voltammetry (Ramp).

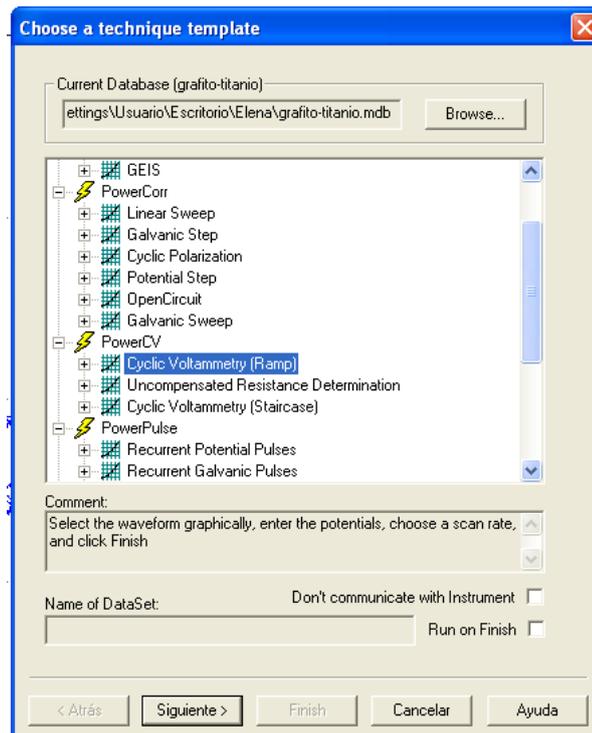


Figura 3.27. Elección del proceso eletroquímico

Una vez que se ha seleccionado se escoge un template, el cual se ha debido guardar anteriormente para poder elegirlo. En nuestro caso, se han guardado y elegido diferentes templates para cada tipo de operación. De este modo se habría guardado uno para la medición en KCl, otro diferente para antioxidantes y, por último, uno para la caracterización de la glucosa. En cualquier caso, se pueden cambiar las características de uno que ya esté guardado para adaptarlo a una medición.

A continuación se muestra una ventana nombrada “Cell Definition” (Figura 3.28). En ella se elige el instrumento de medición, en nuestro caso el Potenciostato/Galvanostato PARStat 2273. También se definen en él las características del electrodo de trabajo (electrodo de grafito) y del electrodo de referencia (Ag/AgCl/KCl 3M).

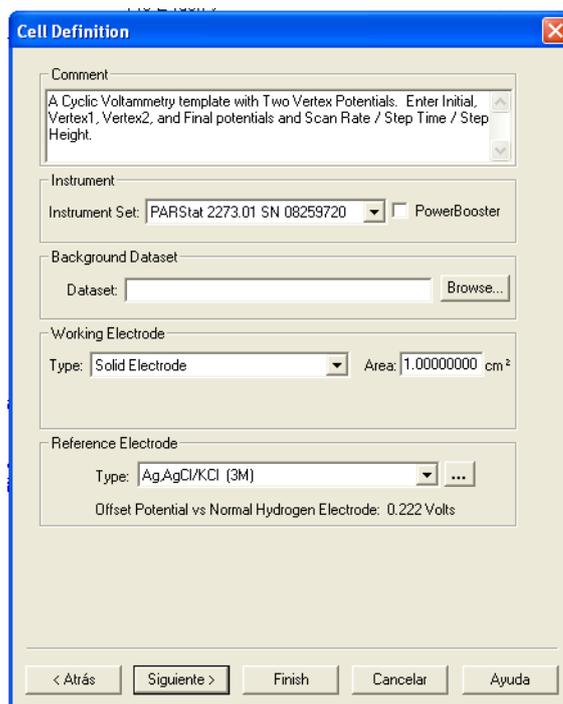


Figura 3.28. Definición de los elementos de la celda electroquímica

En la ventana siguiente se determina la definición de los parámetros necesarios para la voltametría cíclica. Es decir, se establece un potencial inicial, y dos potenciales extremos. Éstos son los parámetros que han variado en el estudio de KCl, antioxidantes y glucosa. Todos ellos comienzan en un potencial de 0 V, pero los potenciales extremos son diferentes en todos los casos. Estos potenciales se han determinado a partir de la experimentación, donde se ha estudiado a qué potenciales aparecían los picos de oxidación y reducción en cada caso, y se han determinado dichos potenciales extremos para ajustar la respuesta voltamétrica obtenida.

Estas condiciones se reflejan en el esquema correspondiente a la *Figura 3.29*.

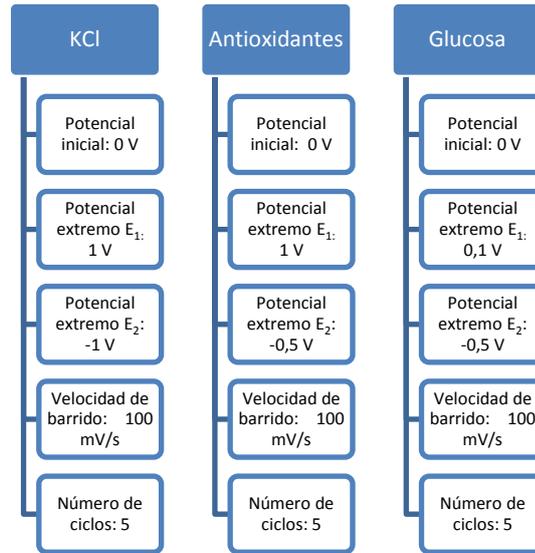


Figura 3.29. Parámetros de la voltametría cíclica para cada medición

Con esos datos se rellenan los parámetros necesarios de la ventana (Figura 3.30).

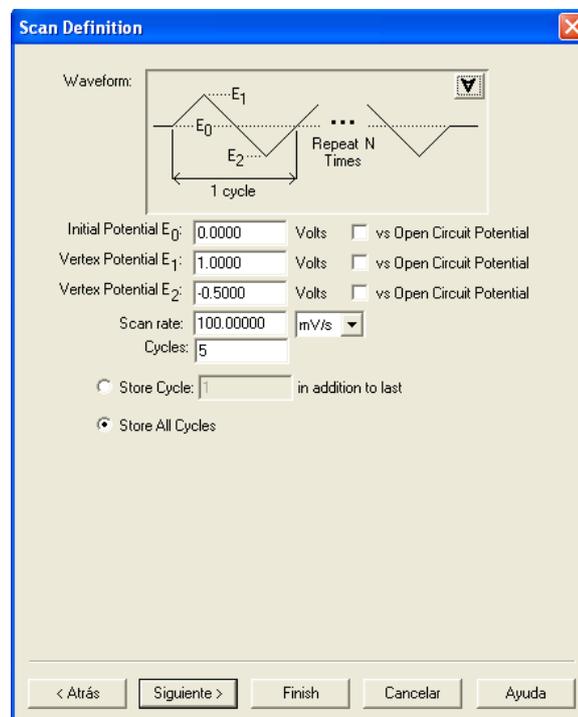


Figura 3.30. Definición de parámetros de la voltametría cíclica

A continuación se establecen las condiciones de estabilización anterior al proceso de medición de la *Figura 3.31*. Se ha establecido la opción “Measure Open Circuit Potential as Required”, con un tiempo de equilibrado de 5 segundos.

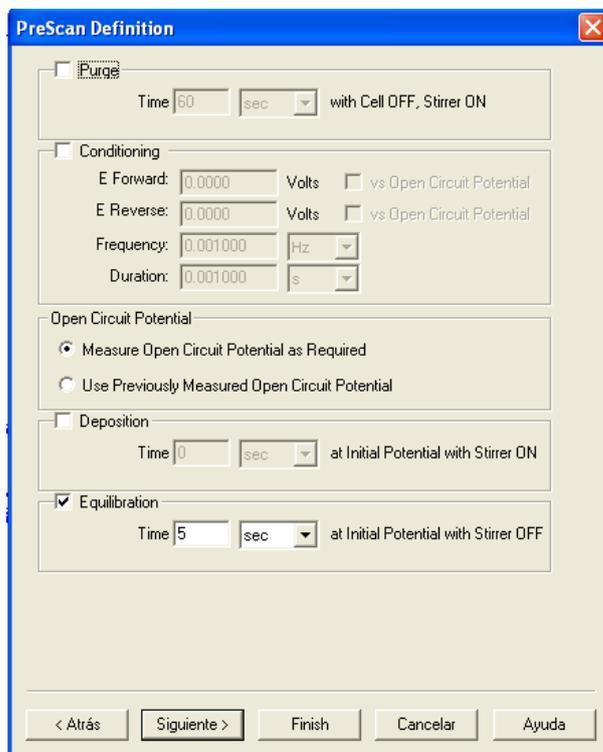


Figura 3.31. Definición de parámetros adicionales de trabajo

Por último, la última ventana que se muestra sería la representada en la *Figura 3.32*. En ella se establecen condiciones avanzadas de operación. En este caso en particular no se ha marcado ninguna de las opciones que ofrece esta ventana.

Una vez que se han determinado todos los parámetros necesarios, ya puede comenzarse el experimento. Para ello, se pulsa la tecla de inicio del experimento, aparecerá una ventana en la que se puede elegir el tipo de celda, en este caso siempre se ha elegido la opción “External Cell”. El programa pedirá habilitar esta celda, a través del potencióstato.

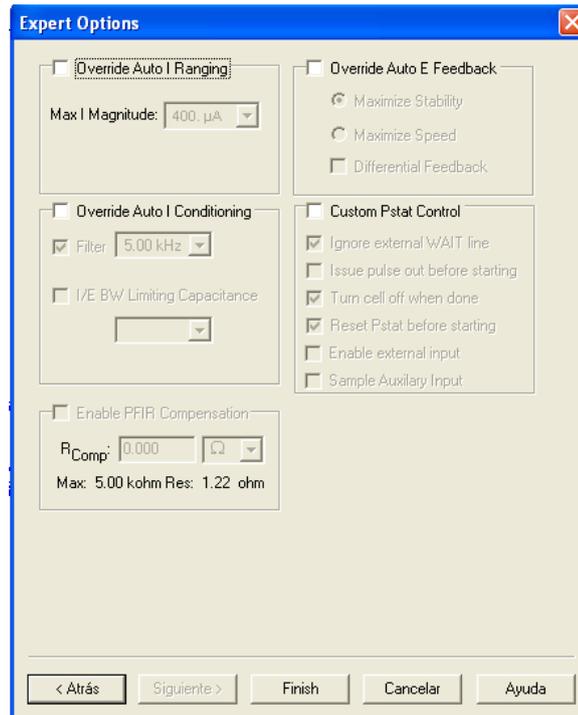


Figura 3.32. Condiciones avanzadas de la voltimetría cíclica

El programa generará entonces el voltamograma de ese caso particular (Figura 3.33). Cuando en pantalla se muestre el mensaje “Cell Off” en sustitución de Cell On, el experimento habrá terminado y se habrá guardado un archivo de texto, otro con formato .hdr y un último archivo de extensión .dll a partir de los que se podrán tratar los resultados obtenidos.

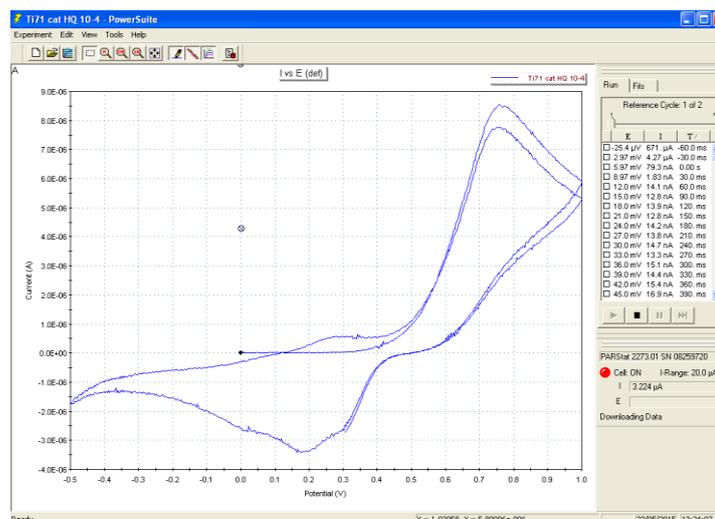


Figura 3.33. Proceso de generación del voltamograma

Este ha sido el proceso seguido para la consecución de toda la parte experimental de este trabajo. A continuación se estudiarán y comentarán los resultados obtenidos en cada uno de los casos, y las comparativas entre las gráficas obtenidas de los electrodos de grafito, y aquellos que se han modificado con nanopartículas de titanio, con objeto de conocer si las nanopartículas de titanio tienen o no, un efecto autocatalítico.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Como último capítulo de caracterización experimental se ha realizado un estudio del comportamiento electroquímico de los electrodos de pasta de carbono con y sin nanopartículas en la detección de cloruro potásico, catecol, hidroquinona y glucosa. En los apartados sucesivos, se estudiará la respuesta voltamétrica obtenida con cada tipo de sensor, las comparativas entre los electrodos modificados y aquellos sin modificar, y la variación de la señal obtenida con el uso de biosensores en relación a la que aportan los sensores sin enzima.

4.1. Estudio de viabilidad

Anteriormente al comienzo de mi Trabajo de Fin de Grado se realizaron unas pruebas comparativas preliminares de los sensores de carbono y sensores modificados con nanopartículas de titanio. El fin de este estudio preliminar fue la determinación de la concentración de nanopartículas en la pasta de grafito que mejores resultados aportaba a los estudios, observar si existían grandes diferencias entre unas concentraciones y otras y comprobar si eran visibles los efectos autocatalíticos de las nanopartículas de titanio.

Debido al interés por la detección de antioxidantes en mostos, el primer estudio fue enfocado a la caracterización de catecol como analito, al ser este uno de los antioxidantes más importantes presentes en el mosto. Por tanto esta parte de la experimentación se realizó con catecol, con objeto de comprobar si existía un efecto autocatalítico por parte de las nanopartículas de titanio. Se realizaron ensayos con los sensores modificados con nanopartículas y sin modificar en una disolución en catecol 10^{-3} M. La cantidad que se añadió de nanopartículas fue de 0,03 gramos por cada cuatro electrodos. Los resultados para ambos electrodos se muestran en la *Figura 4.1*.

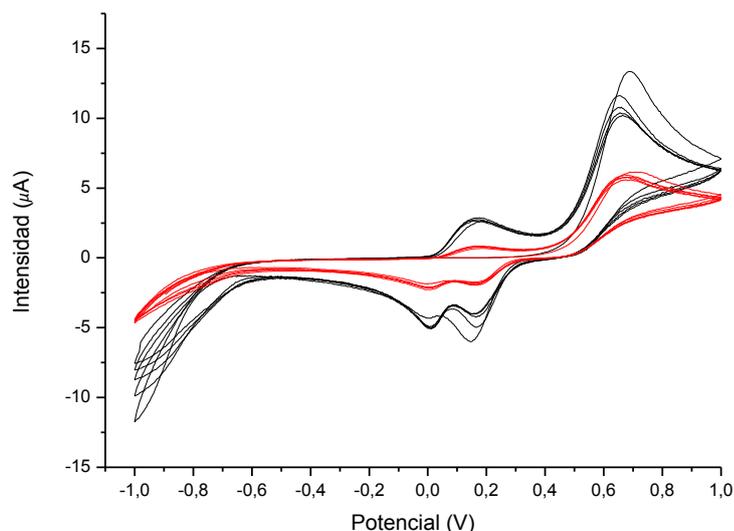


Figura 4.1. Respuesta voltamétrica de los cinco ciclos en catecol 10^{-3} M para CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro).

En el caso del estudio con los dos sensores se visualizan dos picos de reducción (catódicos) y dos de oxidación (anódicos). Es visiblemente apreciable que las nanopartículas aportan una señal de mayor intensidad de corriente y un ligero desplazamiento de los picos, que provoca que la diferencia de potencial entre el pico de reducción y oxidación sea menor y, por tanto, se mejore la reversibilidad del proceso redox. Como primera conclusión, por tanto, se comprueba que las nanopartículas aportan una mejora cualitativa en la detección de catecol.

Se realizó un segundo trabajo preliminar en el cual se estudió la posible influencia en los resultados de la concentración de nanopartículas que contenían los sensores modificados con titanio. Para ello, se fabricaron tres tipos de sensores diferentes, el primero con una cantidad de 0,03 gramos de nanopartículas por cada 4 electrodos, el segundo con 0,06 gramos y el último con 0,09 gramos. El analito utilizado fue el mismo que en el caso anterior y la concentración utilizada tampoco se modificó. En la Figura 4.2 se muestra una comparativa de los cinco ciclos en catecol para todos los tipos de electrodos diferentes.

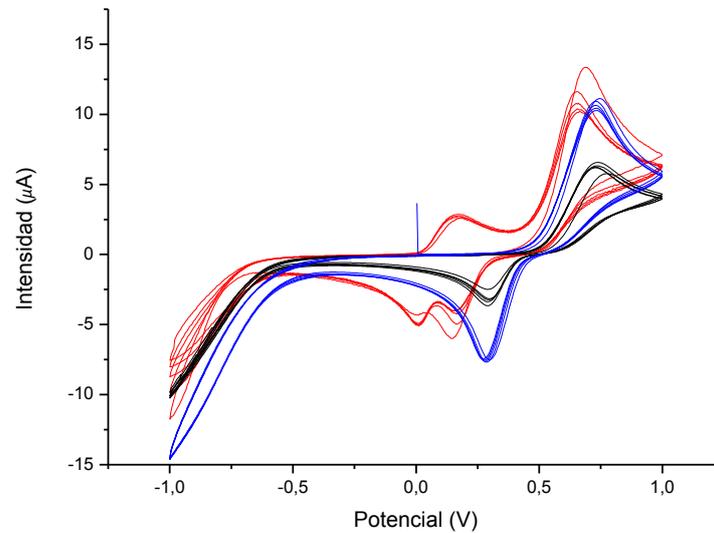


Figura 4.2. Respuesta voltamétrica de los cinco ciclos en catecol 10^{-3} M para CPE-TiNP's con una cantidad de nanopartículas: 0,03 g (rojo), 0,06 g (azul) y 0,09 g (negro).

Como conclusión a este estudio se observó que el aumento de la concentración de las nanopartículas en la pasta no suponía una mejora considerable de los resultados, siendo incluso menores las señales observadas para los electrodos con 0,09 g de nanopartículas que las que se tenían para 0,03 g o 0,06 g. Los sensores con una cantidad de 0,06 g de nanopartículas tienen un comportamiento ligeramente mejor que el CPE de cantidad menor, debido a que el pico de reducción es más intenso y mejora ligeramente la reversibilidad del proceso, pero la diferencia no es sustancial como para determinar la utilización de esa cantidad en los sensores modificados. Por tanto se concluye que la utilización de 0,03 gramos de nanopartículas de titanio para 0,17 gramos de grafito es suficiente para obtener el efecto catalítico deseado.

El tercer y último estudio previo a mi trabajo fue enfocado a la caracterización de antioxidantes con biosensores. La enzima utilizada fue la misma con la que se trabajará en la parte final de este trabajo, siendo ésta tirosinasa (Tyr); se trata de una enzima específica para antioxidantes y se eligió catecol, en una concentración 10^{-3} M; el mismo que se ha utilizado en el caso de sensores sin enzima. Los ensayos se realizaron con los electrodos de grafito y con los electrodos modificados con las tres cantidades diferentes de nanopartículas. Los resultados para todos los ciclos se presentan en la *Figura 4.3*.

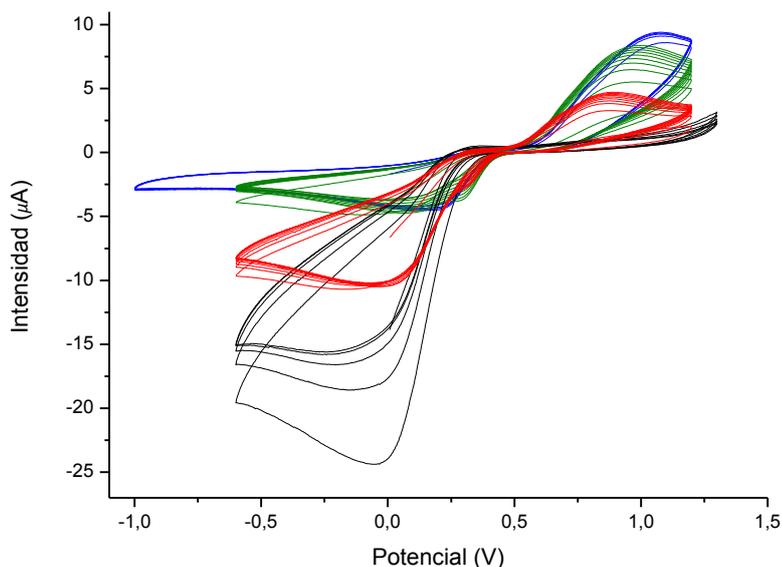


Figura 4.3. Respuesta voltamétrica de los cinco ciclos en catecol 10^{-3} M para CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's con una cantidad de nanopartículas: 0,03 g (verde), 0,06 g (azul) y 0,09 g (negro).

Las mediciones se realizaron entre diferentes potenciales límite, para estudiar si aparecían nuevos picos de oxidación o reducción al verse modificados estos potenciales. A la vista de los resultados la mayor reducción se produce para la mayor cantidad de nanopartículas, aunque no se observa ningún pico de oxidación, por lo que se desechó la utilización de este sensor para futuros estudios. Es probable que la adición de esta cantidad de nanopartículas desplace en exceso hacia potenciales positivos el pico de oxidación ya que el efecto catalítico sí que se observa claramente con un fuerte incremento de la intensidad en el pico de reducción respecto al electrodo no modificado. El electrodo modificado que mejor resultado presentó en cuanto a la reversibilidad del proceso y que además supone un claro incremento de la densidad de corriente en el pico de oxidación fue el que contenía 0,03 g de nanopartículas, ya que es el que mostraba los picos más definidos y un pico de oxidación más intenso que el perteneciente al electrodo no modificado.

Por tanto y como conclusión de este estudio previo de viabilidad se decidió trabajar con electrodos fabricados a partir de una relación fija de nanopartículas/grafito. Por tanto, para la realización de mi trabajo se utilizó una cantidad de 0,03 g de nanopartículas por cada 0,17 g de grafito, cantidad necesaria para la preparación de la pasta de 4 electrodos.

En los apartados sucesivos se estudiará el comportamiento de los sensores CPE-C y CPE-TiNP's en KCl, catecol e hidroquinona y en mezclas de ambos isómeros. También se analizará el efecto del pH en las soluciones obtenidas y la repetibilidad y reproducibilidad de los sensores. Por último se realizará un estudio del comportamiento de biosensores en los mismos antioxidantes y en glucosa.

4.2. Caracterización de sensores en KCl

En una primera instancia se analiza el comportamiento de los sensores de grafito y sensores de grafito modificados con nanopartículas de titanio en un electrolito básico como es el cloruro potásico (KCl).

Las medidas que se realizaron en KCl sirvieron como base para determinar el comportamiento de los electrodos sin analito, así como para analizar posibles fallos del electrodo, detectar un mal comportamiento del electrodo de referencia y/o del contraelectrodo o de cualquier elemento del equipo, y como parte del estudio de los límites de detección calculados, que se explicarán en los siguientes apartados. Por tanto, antes de estudiar el analito en cuestión, en nuestro caso antioxidante, se realizaban siempre las mediciones de todos los electrodos en KCl y se observaba su respuesta; usando este ensayo como referencia previa.

En la *Figura 4.4* se representan las mediciones de los 5 ciclos de los 4 sensores de carbono (CPE-C).

La morfología del voltamograma es similar en cada caso, existiendo alguna diferencia en cuanto a las intensidades alcanzadas para un potencial $E=-1$ V, que varían desde $-5 \mu\text{A}$ a $-18 \mu\text{A}$. Diferencias que son poco significativas, máxime teniendo en cuenta el procedimiento manual de formación de los electrodos de grafito.

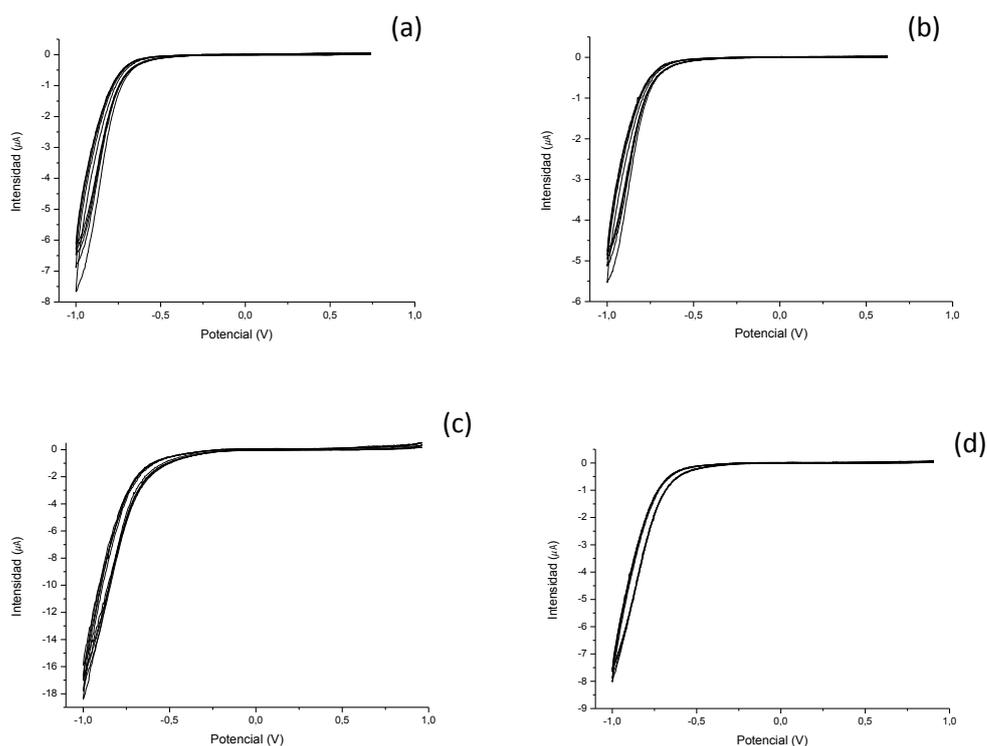


Figura 4.4. Medición voltamétrica en KCl 0,1 M de los 5 ciclos en sensores: a) CPE-C1, b) CPE-C2, c) CPE-C3, d) CPE-C4.

En cuanto a los sensores modificados con nano partículas de Titanio (CPE-TiNP's), el resultado se representa en la *Figura 4.5*.

De la misma forma que en el caso anterior, la señal producida es plana y los voltamogramas son muy similares entre sí, existiendo en este caso menor diferencia en cuanto a las intensidades de los 4 electrodos en relación a las producidas por los electrodos de Carbono al mismo potencial, ya que éstas varían de $-4 \mu\text{A}$ a $-7 \mu\text{A}$. En ningún caso se observan picos correspondientes al electrodo que pudieran interferir después en la detección del analito.

En comparación con los electrodos de grafito se puede concluir una mejor reproducibilidad de los sensores CPE-TiNP's frente a los CPE-C y por tanto, mayor igualdad y fiabilidad en los resultados obtenidos con estos sensores, aunque en ambos casos los resultados son suficientemente reproducibles.

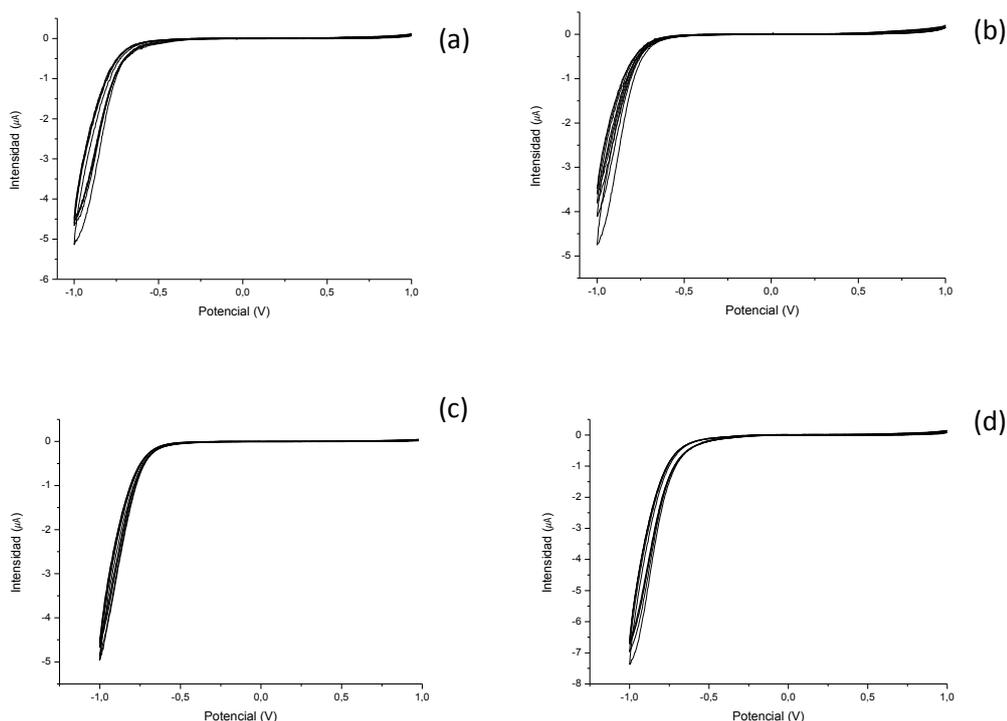


Figura 4.5. Medición voltamétrica en KCl 0,1 M de los 5 ciclos en sensores: a) CPE-TiNP's1, b) CPE- TiNP's2, c) CPE- TiNP's3, d) CPE- TiNP's4.

Como también puede observarse, la repetibilidad de los ciclos del CPE-TiNP's en esta disolución es bastante buena, ya que no existen diferencias considerables entre los 5 ciclos realizados.

Las curvas originadas por los dos tipos de sensores son muy similares, y sus intensidades también lo son. Para poder determinarlo de forma más exacta, en la *Figura 4.6* se presenta una comparación de los dos tipos en el quinto ciclo.

En la figura podemos observar que la señal obtenida en ambos tipos de electrodos es muy similar, no existiendo diferencias significativas en la forma de los picos, y no produciéndose ninguna oxidación o reducción de los mismos al medir con esta disolución.

Por tanto, a continuación se procederá a caracterizar los diferentes analitos con los que se ha trabajado en este trabajo. Esto es la detección de catecol e hidroquinona.

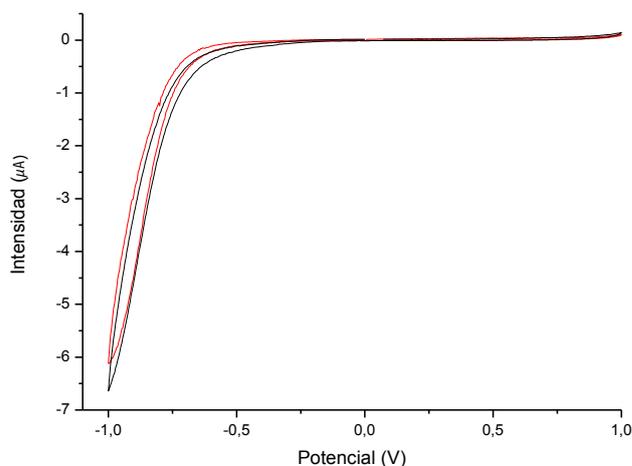


Figura 4.6. Comparativa del quinto ciclo de la medición en KCl 0,1 M de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro).

4.3. Detección de antioxidantes con sensores

En el estudio preliminar ya se ha observado la capacidad que tienen tanto los electrodos de grafito como de grafito modificado con nanopartículas en la detección de antioxidantes como el catecol. En este apartado estableceremos en primer lugar el efecto de la modificación con nanopartículas de titanio en la detección de catecol e hidroquinona; para ello se ha realizado una comparativa en cuanto a las señales obtenidas en ambos tipos de sensores con y sin modificar. A continuación se ha estudiado el límite de detección para cada uno de ellos con objeto de evaluar cuantitativamente el efecto de las nanopartículas de titanio y por último se ha realizado un estudio analítico de la cinética de ambos con objeto de observar diferencias o similitudes entre ambos electrodos.

Como complemento a este estudio se analizará el efecto que supone el pH en la solución obtenida y la repetibilidad de estos sensores a ser reutilizados.

Por último se estudiará la posibilidad de discriminación de diferentes analitos en una mezcla de ambos y se discutirá la capacidad de estos sensores de realizar esta distinción.

4.3.1. Detección de catecol

En cuanto al estudio de detección de catecol, en primer lugar se ha realizado una comparativa en cuanto a las señales obtenidas en ambos tipos de sensores. A continuación se ha estudiado el límite de detección para cada uno de ellos y por último se ha realizado un estudio analítico de la cinética de ambos.

Se realizaron mediciones de catecol con ambos tipos de sensores a 5 concentraciones diferentes, comprendidas entre 10^{-5} M y 10^{-3} M. Para cada concentración se realizaron 5 ciclos, en los que la señal variaba ligeramente, hasta estabilizarse en el quinto y último ciclo.

Con objeto de mostrar estas variaciones se ha representado a modo de ejemplo la *Figura 4.7* con los 5 ciclos de la concentración 10^{-3} M de la medición del CPE-TiNP's en catecol, ya que es representativa de los fenómenos que ocurrían con ambos sensores en las diferentes concentraciones.

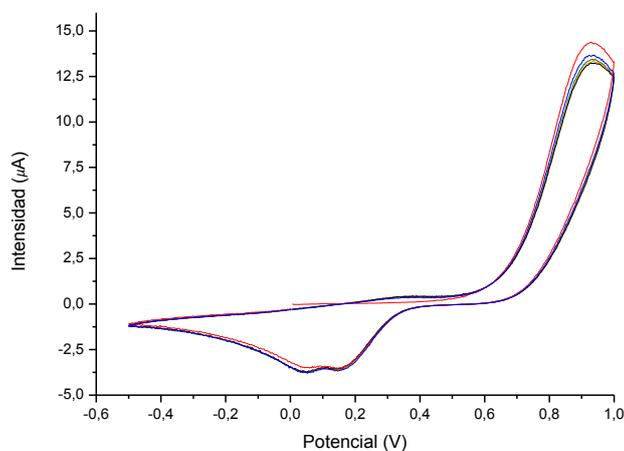


Figura 4.7. Comparativa de los ciclos 1 (rojo), 2 (azul), 3 (verde), 4 (naranja) y 5 (negro) de la medición voltamétrica en catecol 10^{-3} M.

Las diferencias en intensidad entre los cinco ciclos no son importantes, aunque cabe destacar un fenómeno que se apreció durante estos ciclos. En el primer ciclo aparecía un único pico de oxidación, en este caso concreto a un potencial $E=0,9$ V, y dos picos de reducción, a potenciales $E=0,15$ V y $E=0,05$ V respectivamente. A partir del segundo ciclo pudo observarse que aparecía

un segundo pico de oxidación al potencial $E=0,4$ V, que crecía a medida que avanzaban los ciclos. También se apreciaban cambios en el pico de reducción que se encuentra en $E=0,05$ V apreciándose que aumenta su señal con los ciclos. Esto ocurre para todas las concentraciones de analito, siendo tanto más acusadas las diferencias entre el primer y último ciclo cuanto mayor es la concentración de analito en disolución.

Con objeto de justificar estos picos se realizó un estudio bibliográfico [23] que nos permitió asociar estos picos al fenómeno de dimerización del catecol, por lo que los picos redox asociados a la oxidación y reducción del monómero serían los que ocurren a potenciales $E=0,15$ V y $E=0,9$ V y los picos que ocurren a potenciales $E=0,05$ V y $E=0,4$ V se asociarían al dímero. Al aumentar el número de ciclos aumenta la concentración del dímero y disminuye la del monómero. Este proceso de dimerización se observó en todas las mediciones, generalmente para concentraciones superiores a 10^{-4} M. Como veremos en el siguiente apartado, este proceso de dimerización también se observa en el otro isómero del catecol, la hidroquinona, siendo más acusado este fenómeno en este último analito como tendremos ocasión de comprobar más adelante.

En cuanto al efecto de las nanopartículas de titanio se observa en los voltamogramas registrados en catecol un claro aumento de la intensidad de la señal en el caso de los sensores CPE-TiNP's en relación a la obtenida con los sensores de grafito sin modificar. Además se observa igualmente una mejora en la reversibilidad de los picos, ya que los sensores modificados con nanopartículas de titanio tienen los picos a potenciales menores y existen menos diferencias entre el potencial de oxidación y reducción. Por todo ello, el efecto autocatalítico de las nanopartículas es claramente identificable. Para ilustrar estas mejoras en las características se ha realizado una comparativa, correspondiente al primer y quinto ciclo a la menor concentración con la que se ha trabajado (10^{-5} M) en ambos tipos de sensores (*Figura 4.8*).

A la vista de los resultados, las nanopartículas de titanio aportan un claro aumento de la intensidad de corriente tanto en el pico de oxidación como en el de reducción y este aumento es visible en todos los ciclos. En el primer ciclo, los picos redox en el caso del CPE-C aparecen a una intensidad de $-0,20$ μ A y $0,60$ μ A respectivamente y en el caso de CPE-TiNP's las intensidades varían hasta $-0,37$ μ A y $0,80$ μ A. Además los picos de oxidación y reducción están mejor definidos y son más reversibles, ya que aparece desplazado el pico de oxidación hacia la izquierda y el de reducción hacia la derecha, siendo la diferencia de potenciales en el caso del CPE-C igual a $\Delta E=0,80$ V y para el CPE-TiNP's esta diferencia de potencial tomaría un valor $\Delta E=0,65$ V.

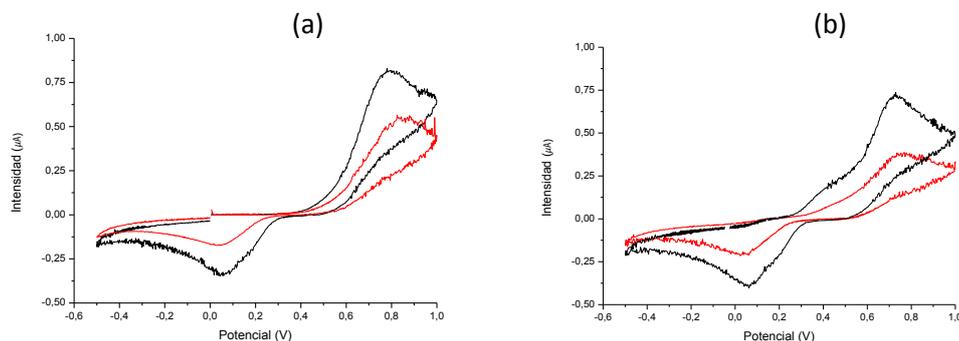


Figura 19. Voltamograma en catecol 10^{-5} M de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

En el quinto ciclo, a diferencia del primero, se aprecia un segundo pico de oxidación. Se observó que este pico aparecía a partir del segundo ciclo y va creciendo en intensidad con el ciclado por lo que tal y como se ha comentado anteriormente se asocia con la dimerización del catecol. Este aumento en la intensidad de corriente de los picos asociados a la dimerización produjo una clara reducción de la intensidad de los picos asociados al monómero, especialmente en el pico de oxidación, con lo que a medida que se realizan los ciclos, el pico de dimerización aumenta y el del monómero disminuye. En los dos sensores con y sin modificar se observan estos efectos pero no de la misma manera. Por ello, la diferencia de intensidades de corriente entre ambos tipos de sensores es más acusada en el último ciclo que en el primero tal y como se observa en la figura, lo mismo ocurre en la reversibilidad lo que se traduce en otra ventaja aportada por la presencia de nanopartículas de titanio, señales más intensas y picos de dimerización claramente más distinguibles que con electrodos de grafito.

En el caso del estudio a una concentración mayor (10^{-3} M), correspondiente a la Figura 4.9, se puede seguir observando la mejora de las características del voltamograma del CPE-TiNP's frente al CPE-C, ya que se detecta una mayor reversibilidad de los picos respecto a concentraciones menores, aunque la diferencia de intensidades en este caso no es tan acusada. Esta observación es coherente si tenemos en cuenta que por su carácter nano el efecto autocatalítico de estas nanopartículas puede ser más notable cuando se trabaja con concentraciones menores. Para mayores concentraciones el grafito por sí sólo es un buen sensor y por tanto el efecto de la modificación es menos notable aunque igualmente evidente.

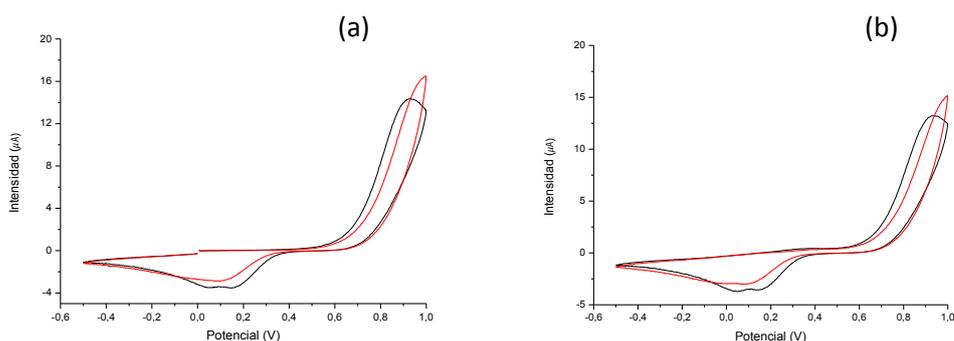


Figura 4.9. Voltamograma en catecol 10^{-3} M de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Una vez que se han observado las diferencias cualitativas entre los dos sensores en la detección de catecol se tratará de cuantificarlas a partir de la determinación del límite de detección. Un límite de detección (LOD) se define como el nivel más bajo de concentración que se puede determinar como estadísticamente diferente del blanco, es decir, de una disolución sin analito presente. Es un parámetro que caracteriza un tipo de sensor determinado, y que lo identifica de forma que cuanto menor sea el límite de detección, mayor capacidad de detección tendrá el sensor a bajas concentraciones. Por tanto, en el campo de la química analítica se buscan sensores con límites de detección de valor pequeño y, por tanto, de gran selectividad.

A continuación se muestran los resultados del estudio del límite de detección realizado con los dos tipos de sensores con los que se ha trabajado, para así poder analizar cuantitativamente el efecto que supone la utilización de nanopartículas en los electrodos de pasta de carbono. Este método consiste en la realización de 5 voltamogramas diferentes, en los que se comienza con una concentración inicial del analito en KCl 10^{-5} M, y se realiza un aumento progresivo de la misma hasta alcanzar una concentración 10^{-3} M. A partir de ellos se realizan los cálculos necesarios, detallados en el próximo apartado, para la caracterización numérica del límite de detección.

❖ Límite de detección

Se comenzará el estudio con la representación y cálculo del límite de detección para el CPE-C. Los 5 voltamogramas obtenidos se indican en la Figura 4.10. Se ha representado únicamente el último ciclo de cada concentración para poder realizar una mejor visualización de la comparativa,

ya que las diferencias entre el primer y quinto ciclo se han explicado anteriormente. Aún así, no debe olvidarse el efecto de dimerización producido a partir del segundo ciclo, que provoca un cambio en la morfología del voltamograma.

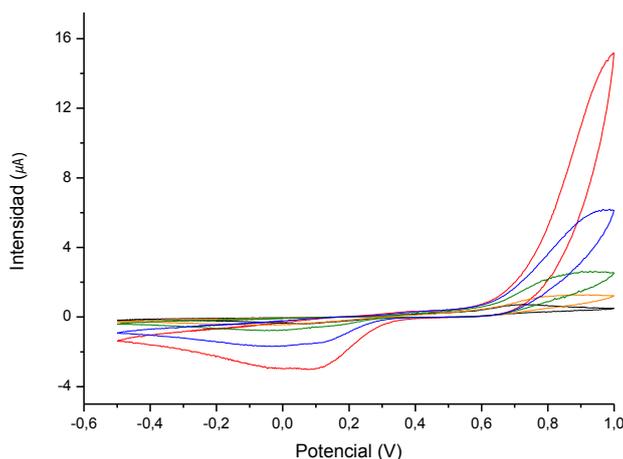


Figura 4.10. Límite de detección de CPE-C en catecol con concentraciones: 10^{-5} M (negro), $0,5 \cdot 10^{-4}$ M (naranja), 10^{-4} M (verde), $0,4 \cdot 10^{-3}$ M (azul) y 10^{-3} M (rojo).

En cuanto a las conclusiones que se aprecian realizando una comparación de voltamogramas, pudo observarse que a medida que aumentaba la concentración de catecol, los picos de oxidación y reducción aumentaban considerablemente en intensidad como era de esperar. Además se produce un desplazamiento del pico de oxidación, que en concentraciones menores aparece a un potencial en torno a 0,80 V y se desplaza hasta un potencial igual a 1 V para las mayores concentraciones. El pico de reducción no sufre un desplazamiento tan acusado, ya que en todo momento se mantiene en torno a un potencial ligeramente inferior a 0,1 V, por tanto la reversibilidad disminuye al aumentar la concentración del analito en el caso de electrodos de carbono sin modificar.

En cuanto al cálculo analítico del límite de detección, se ha realizado tomando como objeto de estudio uno de los dos picos (reducción u oxidación). En este trabajo se ha escogido el pico de oxidación para todos los cálculos (excepto en el caso de la glucosa, por motivos que se comentarán en su apartado

correspondiente), ya que es el pico de mayor intensidad, y se ha calculado el límite de detección de la forma:

$$LOD = \frac{3 \cdot SD}{m} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Siendo SD la desviación típica de las intensidades de los 3 últimos ciclos del blanco (KCl) para el potencial al que aparece el pico de oxidación y m la pendiente de la recta de calibración.

En cuanto al término SD, ya que el potencial al que aparece el pico varía con las concentraciones, se ha establecido un potencial E=0,80 V para la medida de las intensidades del blanco del CPE-C, siendo éste el potencial al que aparece el pico de oxidación para la concentración menor. En la tabla siguiente se presentan estos 3 valores de intensidades de la medición en KCl, junto a su media y desviación típica.

Cálculo SD de CPE-C en catecol			
Valores de intensidad (µA)	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
	8,33·10 ⁻²	8,40·10 ⁻²	7,86·10 ⁻²
Media (µA)	8,19·10 ⁻²		
Desviación típica (µA)	2,95·10 ⁻³		

Tabla 4.1. Cálculo SD de CPE-C en catecol para el cálculo de LOD

Con respecto al cálculo de la pendiente de calibración, se toman las intensidades a las que aparece dicho pico de oxidación en el último ciclo de todas las concentraciones con las que se ha trabajado. Se representa entonces una gráfica de las 5 concentraciones (en mol/L) en función de las intensidades obtenidas en cada caso (en µA), y se obtiene la pendiente de dicha gráfica (Figura 4.11).

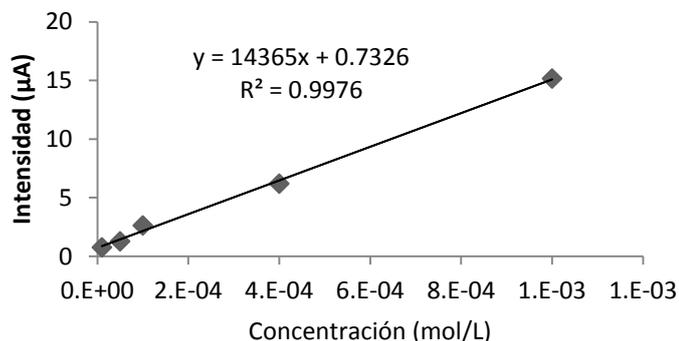


Figura 4.11. Recta de calibración de CPE-C en catecol para el cálculo de LOD.

Ya disponemos de todos los datos para realizar el cálculo del límite de detección, por tanto:

$$\begin{aligned} LOD (CPE - C \text{ en catecol}) &= \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 2,95 \cdot 10^{-3}}{14365} \\ &= 6,17 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \end{aligned}$$

De igual forma se realizó el límite de detección para el electrodo CPE-TiNP's, obteniéndose la *Figura 4.12* con la comparativa de todas las concentraciones. Del mismo modo que en el caso anterior, se tomó sólo el último ciclo para poder realizar mejor la comparativa. También debe tenerse en cuenta el efecto de la dimerización, aunque en el caso de los sensores modificados con nanopartículas es menos acusado que en el de los sensores de grafito, pero también es un fenómeno a tener en cuenta durante el proceso.

En el caso de los electrodos modificados con nanopartículas se observa que también la intensidad de corriente de los picos de oxidación y reducción aumenta considerablemente a medida que aumenta el contenido de catecol en la disolución, de la misma forma que ocurría en el caso del CPE-C. También se observa un pico catódico debido a la oxidación del monómero catecol y otro anódico a causa de la reducción del mismo. De nuevo se aprecia la aparición del fenómeno de dimerización, por el cual aparece un nuevo pico de oxidación y otro de reducción a potenciales más negativos.

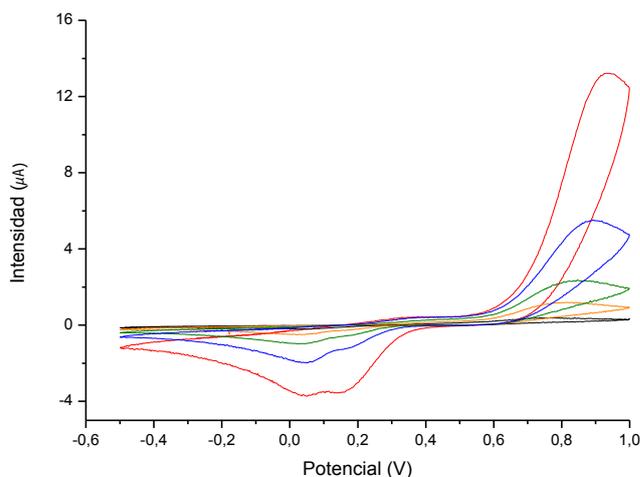


Figura 4.202. Límite de detección de CPE-TiNP's en catecol con concentraciones: 10^{-5} M (negro), $0,5 \cdot 10^{-4}$ M (naranja), 10^{-4} M (verde), $0,4 \cdot 10^{-3}$ M (azul) y 10^{-3} M (rojo).

Una de las diferencias más significativas a la vista de los resultados respecto al CPE-C es el desplazamiento del pico de oxidación a potenciales menores respecto al electrodo sin modificar. También se observa que los potenciales de reducción correspondientes al monómero y dímero se desplazan a potenciales más positivos a medida que aumenta la concentración de catecol. Por ello se observa un claro efecto positivo de las nanopartículas, ya que transforman el proceso en uno más reversible, tanto más cuanto mayor es la concentración del analito. Además, en los voltamogramas se observan mayores intensidades en ambos picos, anódicos y catódicos, para las cinco concentraciones en estudio lo que también nos indica cualitativamente el efecto beneficioso de las nanopartículas de titanio. Por tanto, parece que el comportamiento de los sensores modificados con nanopartículas de titanio es visiblemente mejor que el de los sensores de carbono, especialmente a concentraciones menores. Trataremos de cuantificar este efecto a través de la medida del límite de detección.

De igual forma que en el caso anterior, éste se ha calculado a partir de la Ecuación 4.1 para el CPE-TiNP's. En este caso los valores necesarios para el cálculo de la desviación típica del blanco se presentan en la Tabla 4.2. Se ha elegido como potencial para la medida de las intensidades en KCl aquél al que aparece el pico de oxidación en la concentración más baja, que sería $E=0,75$ V.

Cálculo SD de CPE-TiNP's en catecol			
Valores de intensidad (μA)	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
		5,35·10 ⁻²	5,70·10 ⁻²
Media (μA)	5,49·10 ⁻²		
Desviación típica (μA)	1,85·10 ⁻³		

Tabla 4.2. Cálculo SD de CPE-TiNP's en catecol para el cálculo de LOD.

En la Figura 4.13 se presenta la recta de calibración en este caso de estudio.

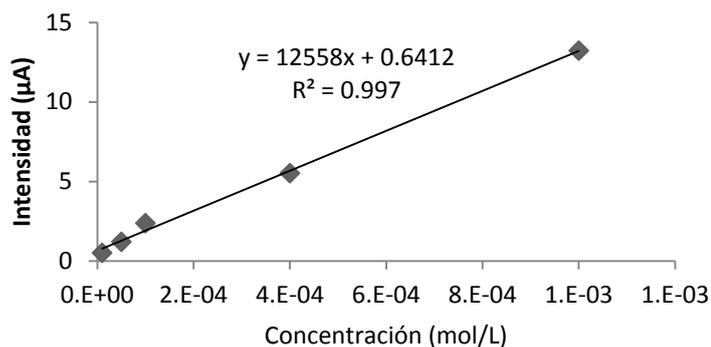


Figura 4.13. Recta de calibración de CPE-TiNP's en catecol para el cálculo de LOD.

Por tanto, el límite de detección para el CPE-TiNP's sería igual a:

$$\begin{aligned}
 LOD (CPE - TiNP's \text{ en catecol}) &= \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 1,85 \cdot 10^{-3}}{12558} \\
 &= 4,42 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}
 \end{aligned}$$

Realizando una comparación entre los valores obtenidos, el límite de detección es menor en el caso de CPE-TiNP's frente al de CPE-C lo que confirma el mejor comportamiento de los sensores modificados en la detección de catecol.

Para concluir este apartado dedicado a la caracterización de los sensores en catecol se ha realizado un estudio cinético con los dos tipos de sensores, con y sin modificar. En él, se ha tomado la mayor concentración objeto de estudio, 10^{-3} M, y se han realizado 6 voltametrías cíclicas aumentando en cada una de ellas la velocidad de barrido respecto a la anterior, pasando así por unas velocidades de 25mV/s, 50 mV/s, 100 mV/s, 200 mV/s, 500 mV/s y 1000 mV/s con objeto de tener una mayor información acerca de los mecanismos de reacción.

❖ Estudio cinético

Se comenzará estudiando los resultados para el sensor CPE-C. La *Figura 4.14* representa los 6 voltamogramas diferentes correspondientes a las diferentes velocidades de barrido, todos ellos representados únicamente en el quinto ciclo para facilitar la comparación de resultados.

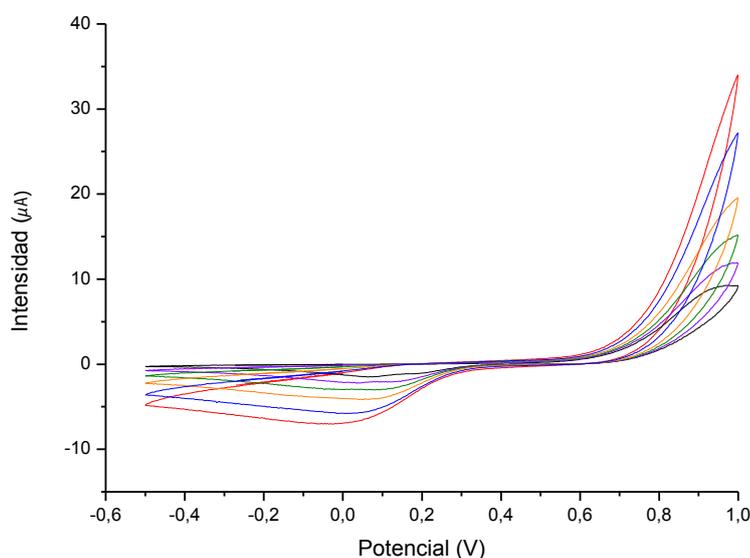


Figura 4.14. Estudio cinético de CPE-C en catecol 10^{-3} M con velocidades de barrido: 25 mV/s (negro), 50 mV/s (morado), 100 mV/s (verde), 200 mV/s (amarillo), 500 mV/s (azul) y 1000 mV/s (rojo).

A la vista de los resultados, es claro el cambio que se produce en los voltamogramas a medida que se modifica la velocidad de barrido. A mayores

velocidades las intensidades de los picos son notablemente mayores, y la reversibilidad de los mismos se reduce, ya que la diferencia de potenciales entre los dos picos cada vez es mayor.

Como caracterización del estudio cinético, se ha tomado la intensidad del pico más intenso (pico de oxidación) en el último ciclo en μA para las 6 velocidades diferentes en mV/s (Tabla 4.3) y se ha representado gráficamente en función de la velocidad y en función de la raíz cuadrada de la velocidad con objeto de determinar en cuál se consigue un mejor ajuste lineal.

Cálculo cinética CPE-C en catecol		
Velocidad ^{1/2}	Velocidad (mV/s)	Intensidad (μA)
5,00	25	9,25
7,07	50	11,88
10,00	100	15,17
14,14	200	19,57
22,36	500	27,86
31,62	1000	34,02

Tabla 4.3. Cálculo estudio cinético CPE-C en catecol 10^{-3} M .

A partir de estos valores se han representado las dos gráficas, en la primera de ellas la intensidad del pico de oxidación en cada caso (en μA) se representa en función de la velocidad de barrido (en mV/s), y en la segunda se grafica en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Realizando una regresión lineal en ambas gráficas, se buscará aquella que mejor se aproxime a una recta, es decir, la que mayor coeficiente de regresión lineal tenga. Ello nos permitirá conocer el mecanismo cinético asociado al proceso de oxidación-reducción del catecol.

Para el CPE-C los datos se representa en la *Figura 4.15*, a partir de la cuál puede comprobarse que se realiza una mejor aproximación lineal a la segunda gráfica (b), siendo esta la que representa la raíz cuadrada de la velocidad en función de la intensidad, con un coeficiente de regresión lineal de $R^2=0,9894$.

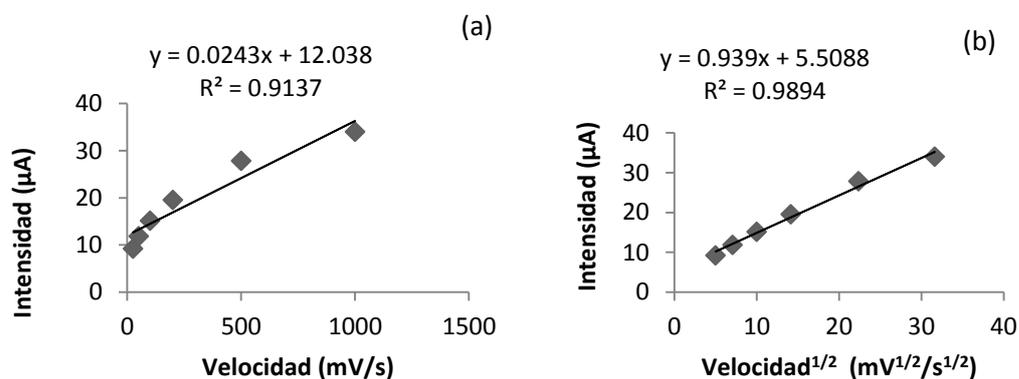


Figura 4.15. Rectas de calibración de CPE-C en catecol para el estudio cinético de: (a) intensidad en función de la velocidad, (b) intensidad en función de la raíz cuadrada de la velocidad.

Se llega a la conclusión con el estudio cinético del CPE-C de que el proceso debe estar controlado por difusión más que por transferencia de carga.

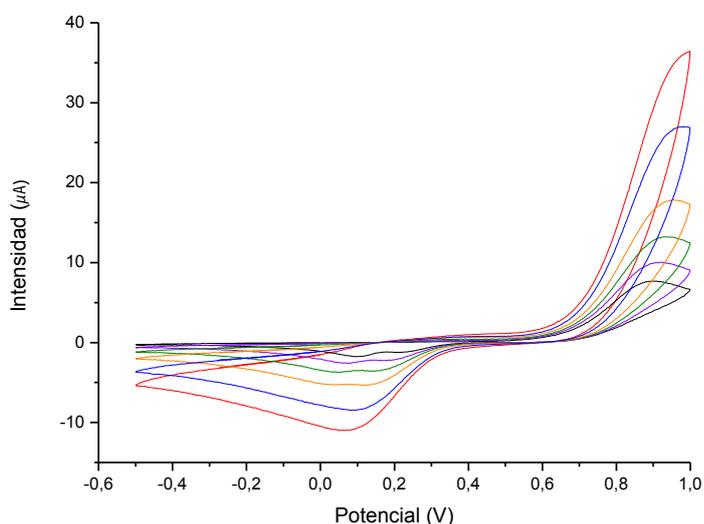


Figura 4.16. Estudio cinético de CPE-TiNP's en catecol $10^{-3} M$ con velocidades de barrido: 25 mV/s (negro), 50 mV/s (morado), 100 mV/s (verde), 200 mV/s (amarillo), 500 mV/s (azul) y 1000 mV/s (rojo).

Del mismo modo, en el caso del CPE-TiNP's, los datos del estudio cinético se representan en la *Figura 4.16*.

Se observan los mismos fenómenos que en el caso anterior en cuanto al desplazamiento de los picos y el aumento de las intensidades de corriente con el aumento de la velocidad. Sin embargo sí se observa que en el caso de los CPE-TiNP's el comportamiento de los picos es más reversible y sus intensidades son mayores que las observadas en los electrodos sin modificar para cualquier velocidad de barrido. La *Tabla 4.4* presenta los valores de la intensidad del pico de oxidación en el quinto y último ciclo para las 6 velocidades de estudio.

Cálculo cinética CPE-TiNP's en catecol		
Velocidad ^{1/2}	Velocidad (mV/s)	Intensidad (μA)
5,00	25	7,67
7,07	50	10,03
10,00	100	13,22
14,14	200	17,82
22,36	500	27,00
31,62	1000	36,43

Tabla 4.4. Cálculo estudio cinético CPE-TiNP's en catecol 10⁻³ M.

Graficando los resultados de la tabla superior, de igual forma que en el caso de los electrodos de grafito no modificados, se obtienen las gráficas representadas en la *Figura 4.17*.

Como en el caso de los CPE-C, en cuanto a los electrodos de grafito modificados con nanopartículas observamos que la última gráfica correspondiente a la representación de la intensidad en función de la raíz cuadrada de la velocidad, *Figura 4.17.(b)*, es la que presenta mejor ajuste, con un coeficiente de regresión lineal $R^2=0,9996$, con lo que se puede

obtener la misma conclusión con los dos electrodos, ya que en ambos casos el proceso está controlado por la difusión.

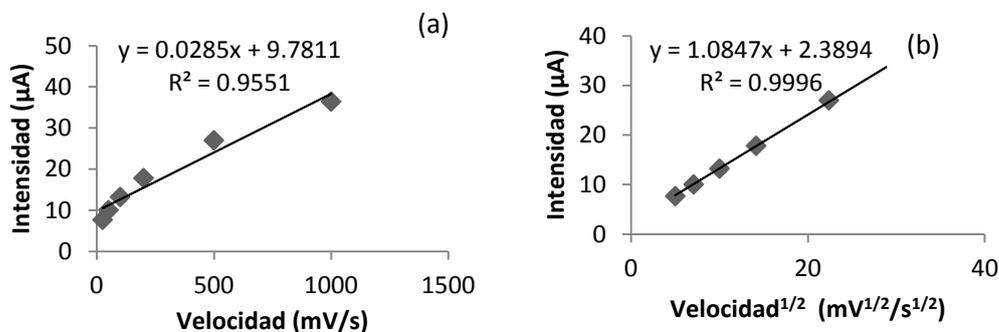


Figura 4.17. Rectas de calibración de CPE-TiNP's en catecol para el estudio cinético de: (a) intensidad en función de la velocidad, (b) intensidad en función de la raíz cuadrada de la velocidad.

A continuación se realizarán los mismos estudios tratados en la caracterización del catecol con el otro isómero del catecol, es decir, con la hidroquinona.

4.3.2. Detección de hidroquinona

En este apartado nos proponemos realizar un estudio similar al realizado anteriormente utilizando como analito el isómero que presenta los grupos hidroxilo en posición para, esto es la hidroquinona. De la misma forma que en el caso del catecol, en primer lugar se han comparado las respuestas obtenidas con los dos tipos de sensores, con objeto de observar el efecto de las nanopartículas para comprobar si existe una mejoría en la respuesta de los sensores modificados con nanopartículas de titanio en relación con los sensores de grafito. A continuación se ha estudiado el límite de detección en ambos casos, y como último punto se ha realizado un estudio cinético y se han comparado los resultados obtenidos con los dos sensores.

En primer lugar en la *Figura 4.18* se muestran las respuestas obtenidas para los dos sensores, con y sin modificación, correspondientes al primer y quinto ciclo en una disolución con una concentración 10^{-5} M de hidroquinona en KCl 0,1 M.

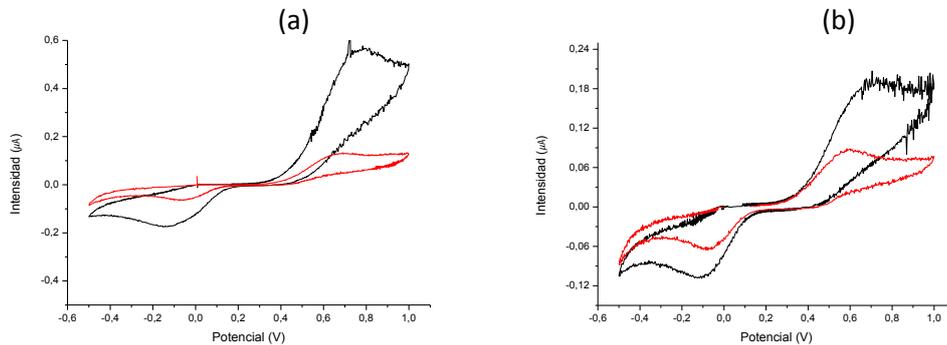


Figura 4.18. Voltamograma en HQ 10^{-5} M de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Para ambos tipos de sensores se observa la aparición de un pico debido a la oxidación de la hidroquinona, que en el primer ciclo se presenta a un potencial $E=0,6$ V para el CPE-C y siendo $E=0,7$ V para el CPE-TiNP's. También se observa en los voltamogramas un pico de reducción a $E=-0,05$ V en el caso del CPE-C, siendo el potencial para el CPE-TiNP's de $E=-0,1$ V para este pico. Para esta concentración los potenciales de oxidación y reducción de los picos no varían notablemente a lo largo de los ciclos siendo semejantes en el primer y quinto ciclo tal y como observamos en la figura.

Al igual que ocurría en el caso del catecol, en la disolución de hidroquinona se observa que las intensidades de corriente son claramente mayores para el electrodo modificado con nanopartículas, hecho constatable en el primer y también en el quinto ciclo. Esto ocurre tanto en reducción como en oxidación. Sin embargo, en el caso de la hidroquinona, la reacción redox es más reversible para el electrodo de carbono, siendo la diferencia de potenciales para el sensor de grafito de $\Delta E=0,65$ V mientras que para el modificado con nanopartículas de titanio de $\Delta E=0,80$ V.

Este comportamiento se observa también para otras concentraciones de hidroquinona. De igual forma que en la caracterización del catecol, el comportamiento de los sensores CPE-TiNP's es notablemente mejor a concentraciones menores, aumentando de forma acusada la intensidad de la señal frente a los sensores CPE-C, que pasa de tomar un valor en el primer ciclo para el pico de oxidación de $0,1 \mu\text{A}$ a $0,55 \mu\text{A}$; es para esta concentración donde las diferencias son máximas. Esta es una conclusión muy positiva en lo que respecta al efecto de las nanopartículas ya que los antioxidantes se encuentran en concentraciones bajas en mostos, y el hecho

de tener un sensor que sea capaz de detectar un antioxidante a bajas concentraciones es algo muy interesante.

En la *Figura 4.19* se comparan las respuestas voltamétricas de ambos sensores en una disolución de concentración mayor (10^{-3} M) en hidroquinona.

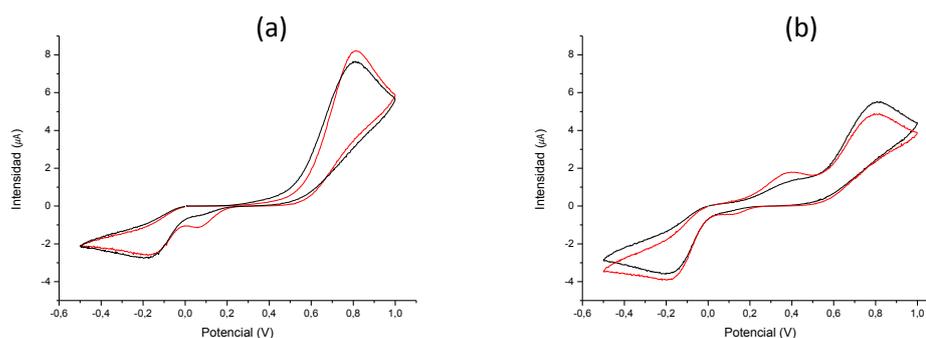


Figura 4.19. Voltamograma en HQ 10^{-3} M de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Se observa que en este caso sí que aparece el fenómeno de dimerización que se ha observado en catecol. Se observa que hay un segundo pico a potenciales $E=0,4$ V para la oxidación y $E=0,1$ V para la reducción. Estos picos tienen intensidades de corriente más acusadas en relación al pico asociado al monómero que los picos asociados a la dimerización del catecol. Al respecto el efecto es más significativo para los sensores de grafito que para los modificados con nano partículas. Teniendo en cuenta que el aumento en la intensidad de los picos asociados al dímero hace disminuir la intensidad de los picos asociados al monómero se observa que los picos asociados al dímero son de intensidad más elevada en el electrodo de grafito mientras que los picos asociados al monómero son más intensos para el electrodo modificado con nanopartículas. En cualquier caso se observa que, como ya ocurría en el caso del catecol, las diferencias entre los dos electrodos son menores para altas concentraciones de analito.

Con objeto de constatar de forma cuantitativa el efecto de las nanopartículas de titanio de forma similar al estudio en catecol, se han realizado los cálculos para conocer el límite de detección y se ha realizado el estudio cinético para los dos tipos de sensores. Los resultados obtenidos se analizan en los siguientes apartados.

❖ Límite de detección

Se ha estudiado el límite de detección de ambos electrodos, comenzando por el CPE-C. En la *Figura 4.20* se muestran los voltamogramas obtenidos para el grafito para las cinco concentraciones de hidroquinona en estudio.

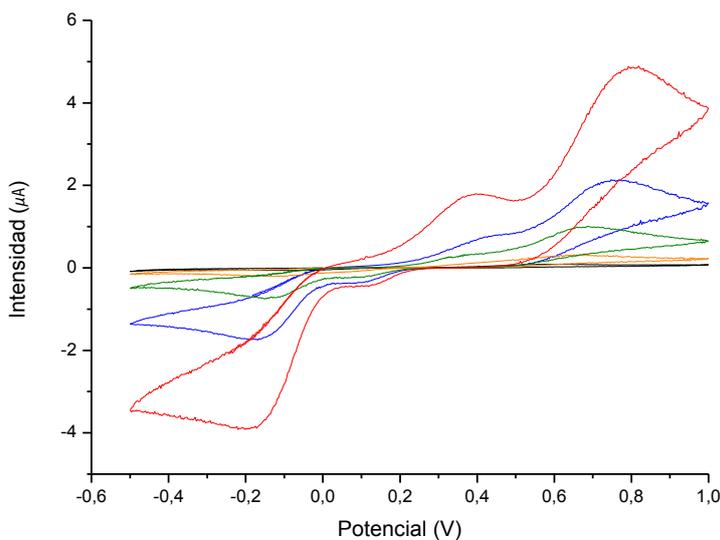


Figura 4.20. Límite de detección de CPE-C en HQ con concentraciones: 10^{-5} M (negro), $0,5 \cdot 10^{-4}$ M (naranja), 10^{-4} M (verde), $0,4 \cdot 10^{-3}$ M (azul) y 10^{-3} M (rojo).

A la vista de los voltamogramas podemos observar como el pico de oxidación de la hidroquinona se desplaza desde un potencial $E=0,6$ V en las concentraciones menores hasta $E=0,8$ V para las mayores concentraciones. También se produce un desplazamiento del pico de reducción, desde un potencial $E=-0,05$ V para la concentración 10^{-5} M hasta alcanzar un valor $E=-0,2$ V para 10^{-3} M. Es claro el aumento de intensidades de ambos picos a medida que la concentración de hidroquinona aumenta, así como también se aprecia la aparición de dimerización en las mayores concentraciones, siendo éste fenómeno todavía más acusado que en el estudio del catecol.

Respecto a la caracterización numérica del límite de detección para el CPE-C se ha utilizado, igual que para los casos anteriores, el pico de oxidación como objeto de estudio. Los valores necesarios para el cálculo de la desviación típica del blanco se presentan en la *Tabla 4.5*, donde se presentan las intensidades en KCl para un potencial determinado $E=0,6$ V, correspondiente

al potencial al que se muestra el pico de oxidación para la menor concentración estudiada (10^{-5} M).

Cálculo SD de CPE-C en HQ			
Valores de intensidad (μA)	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
		$3,95 \cdot 10^{-2}$	$3,33 \cdot 10^{-2}$
Media (μA)	$3,71 \cdot 10^{-2}$		
Desviación típica (μA)	$3,31 \cdot 10^{-3}$		

Tabla 4.5. Cálculo SD de CPE-C en HQ para el cálculo de LOD.

Se ha representado también la recta de calibración con las intensidades del pico de oxidación en el quinto ciclo para cada concentración (Figura 4.21).

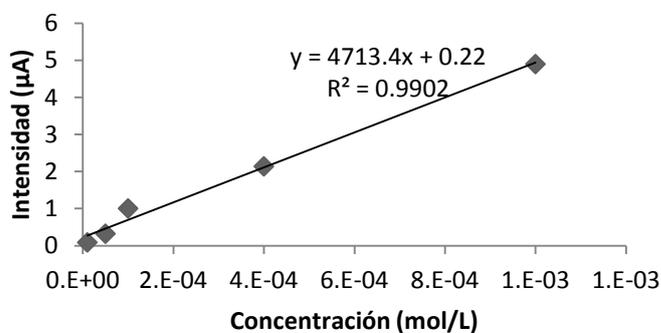


Figura 4.21. Recta de calibración de CPE-C en HQ para el cálculo de LOD.

Con el valor de la pendiente de dicha recta y la desviación típica del blanco se calcula el límite de detección del CPE-C en HQ:

$$LOD (CPE - C \text{ en HQ}) = \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 3,31 \cdot 10^{-3}}{4713,4} = 2,10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

De forma análoga, en el caso de los electrodos modificados con nanopartículas de titanio, se ha calculado también el límite de detección de la hidroquinona. En la *Figura 4.22* se muestra la gráfica comparativa con los voltamogramas registrados para las distintas concentraciones de hidroquinona en KCl.

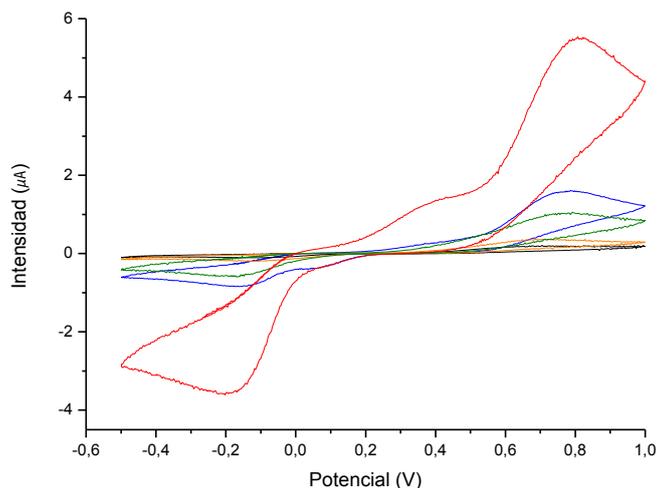


Figura 4.22. Límite de detección de CPE-TiNP's en HQ con concentraciones: 10^{-5} M (negro), $0,5 \cdot 10^{-4}$ M (naranja), 10^{-4} M (verde), $0,4 \cdot 10^{-3}$ M (azul) y 10^{-3} M (rojo).

En este caso de estudio, los potenciales a los que aparecen los picos redox son muy similares a los del CPE-C, aunque la intensidad de la señal es visiblemente mayor debido a la adición de nanopartículas, especialmente para concentraciones menores en las que muestran un efecto más intenso.

Respecto a los cálculos necesarios para el LOD, en la *Tabla 4.6* se presenta la desviación típica de las intensidades de los 3 últimos ciclos del blanco para el potencial al que aparece el pico de oxidación a 10^{-5} M, es decir, $E=0,7$ V.

A partir de este dato, y el valor de la pendiente de la recta de calibración, obtenida en la *Figura 4.23*, ya puede calcularse el límite de detección.

Cálculo SD de CPE-TiNP's en HQ			
Valores de intensidad (μA)	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
	$4,70 \cdot 10^{-2}$	$4,57 \cdot 10^{-2}$	$4,45 \cdot 10^{-2}$
Media (μA)	$4,57 \cdot 10^{-2}$		
Desviación típica (μA)	$1,22 \cdot 10^{-3}$		

Tabla 4.6. Cálculo SD de CPE-TiNP's en HQ para el cálculo de LOD.

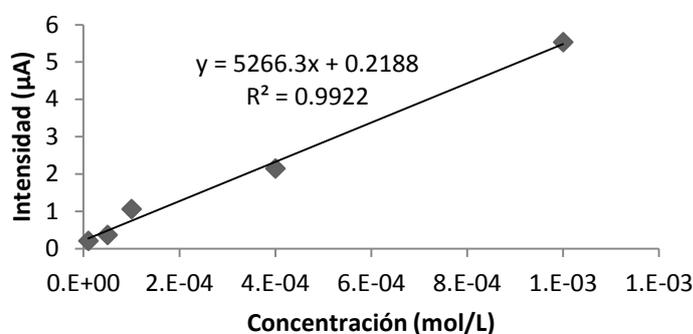


Figura 4.23. Recta de calibración de CPE-TiNP's en HQ para el cálculo de LOD.

El valor del LOD para el electrodo modificado tomaría el siguiente valor:

$$LOD (CPE - TiNP's en HQ) = \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 1,22 \cdot 10^{-3}}{5266,3} = 6,95 \cdot 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$$

Del mismo modo que en la caracterización de catecol se obtiene un menor límite de detección para los sensores modificados con nanopartículas de titanio. En este caso las diferencias son todavía más acusadas que las observadas en catecol con lo que cabe concluir que la utilización de nanopartículas de titanio es favorable en la detección de ambos isómeros.

Por último se ha realizado el estudio cinético para ambos sensores de modo análogo al realizado en el caso del catecol.

❖ Estudio cinético

Se ha comenzado, de la misma forma que en todos los casos anteriores, por el estudio del electrodo de grafito, CPE-C.

La *Figura 4.24* representa la comparativa de los 6 voltamogramas registrados para las seis velocidades de barrido en una disolución 10^{-3} M de HQ en KCl. Se observa el claro aumento de señal acorde al aumento de velocidad de barrido y una mayor irreversibilidad del proceso a velocidades mayores. A La mayor velocidad de barrido (1000 mV/s) se presenta una intensidad del pico de oxidación (anódico) de $15 \mu\text{A}$ y de $-8 \mu\text{A}$ para el pico de reducción (catódico).

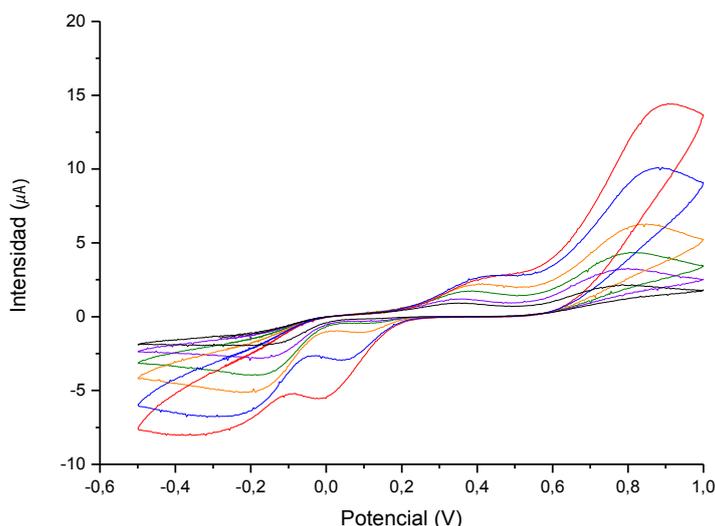


Figura 4.24. Estudio cinético de CPE-C en HQ 10^{-3} M con velocidades de barrido: 25 mV/s (negro), 50 mV/s (morado), 100 mV/s (verde), 200 mV/s (amarillo), 500 mV/s (azul) y 1000 mV/s (rojo).

Las intensidades correspondientes al pico de oxidación para cada velocidad de barrido junto con los valores de velocidades y las raíces cuadradas de cada velocidad se indican en la *Tabla 4.7*, en las unidades indicadas en dicha tabla.

Estos datos son necesarios para la caracterización numérica del estudio cinético. Para ello, se han representado gráficamente en las *Figuras 4.25 (a) y (b)*.

Cálculo cinética CPE-C en HQ		
Velocidad ^{1/2}	Velocidad (mV/s)	Intensidad (μA)
5,00	25	2,16
7,07	50	3,25
10,00	100	4,35
14,14	200	6,27
22,36	500	10,07
31,62	1000	14,42

Tabla 4.7. Cálculo estudio cinético CPE-C en HQ 10⁻³ M.

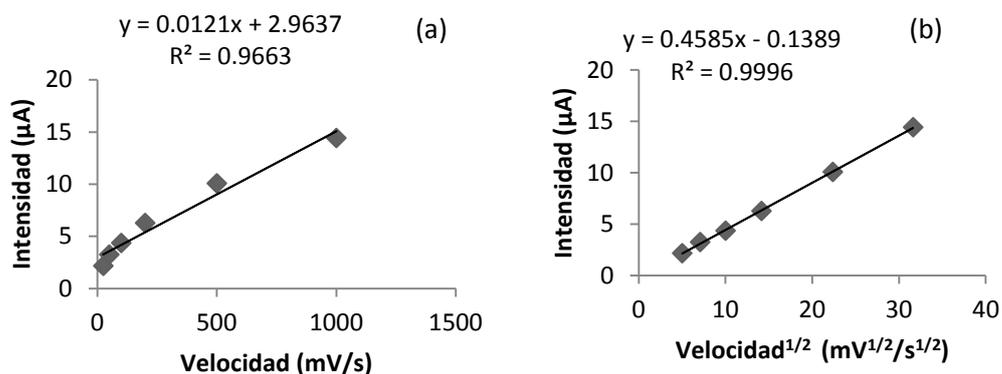


Figura 4.25. Rectas de calibración de CPE-C en HQ para el estudio cinético de: (a) intensidad en función de la velocidad, (b) intensidad en función de la raíz cuadrada de la velocidad.

A la vista de las gráficas resultantes, el mejor ajuste lineal es el correspondiente a la Figura 4.25. (b), con un coeficiente de regresión lineal de $R^2=0,9996$, por lo que el ajuste es mejor con la raíz cuadrada de la velocidad. Por tanto, el mecanismo dominante en el proceso es la difusión como ya ocurría en el caso del estudio en la disolución de catecol.

Por último, se realiza el estudio cinético del electrodo con nanopartículas de titanio. Se muestran los voltamogramas obtenidos en función de la velocidad de barrido para el CPE-TiNP's en la *Figura 4.26*.

Se visualiza el mismo comportamiento que en el CPE-C, a diferencia de que los picos redox se presentan a mayores intensidades, observándose el pico de oxidación para una velocidad de 1000 mV/s a 18 μA y el de reducción a -8 μA . La dimerización en este caso se presenta de forma menos acusada que con los electrodos sin modificar.

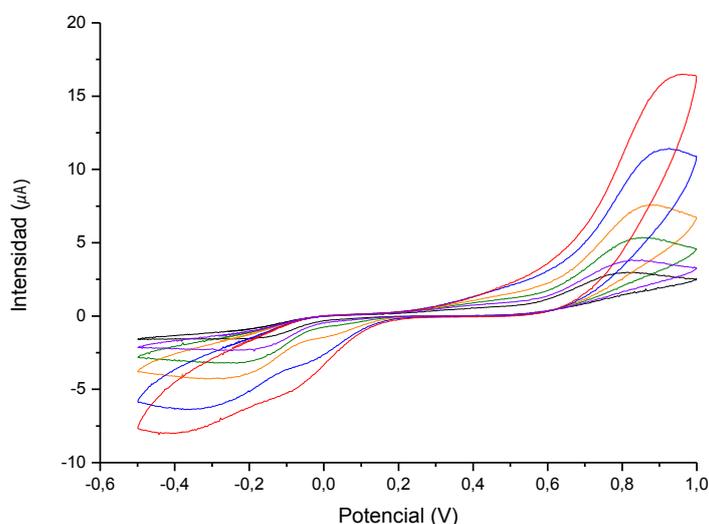


Figura 4.26. Estudio cinético de CPE-TiNP's en HQ 10^{-3} M con velocidades de barrido: 25 mV/s (negro), 50 mV/s (morado), 100 mV/s (verde), 200 mV/s (amarillo), 500 mV/s (azul) y 1000 mV/s (rojo).

La *Tabla 4.8* contiene los valores de la intensidad del pico de oxidación para cada velocidad de barrido, representados respecto a la velocidad de barrido y respecto a la raíz cuadrada de la misma en las dos gráficas de la *Figura 4.27*.

A partir de estas representaciones se obtiene la misma conclusión que en todos los casos anteriores. Se observa una vez más que también para el electrodo CPE-TiNP's en hidroquinona, la intensidad correlaciona mejor con la raíz cuadrada de la velocidad, así se observa una mejor regresión lineal en la representación de la raíz cuadrada de la velocidad en función de la intensidad, con $R^2=0,9993$.

Cálculo cinética CPE-TiNP's en HQ		
Velocidad ^{1/2}	Velocidad (mV/s)	Intensidad (μA)
5,00	25	2,97
7,07	50	3,85
10,00	100	5,37
14,14	200	7,56
22,36	500	11,43
31,62	1000	16,48

Tabla 4.8. Cálculo estudio cinético CPE-TiNP's en HQ 10⁻³ M.

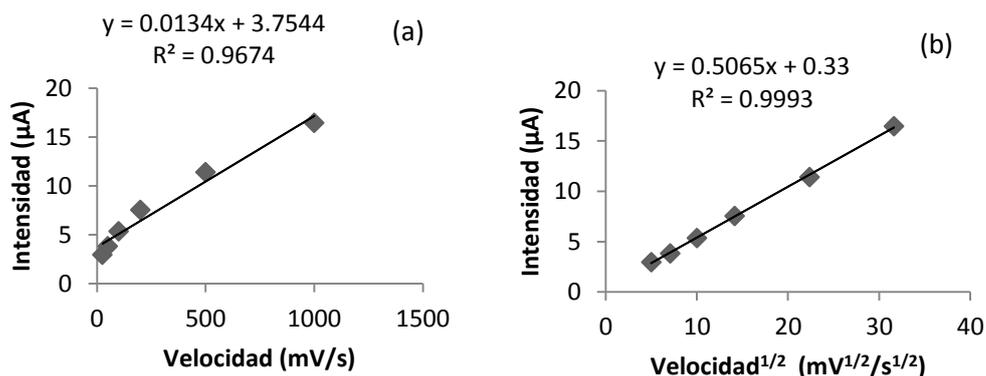


Figura 4.27. Rectas de calibración de CPE-C en HQ para el estudio cinético de: (a) intensidad en función de la velocidad, (b) intensidad en función de la raíz cuadrada de la velocidad.

Por tanto, el mecanismo predominante en la cinética para los dos tipos de sensores y en ambos tipos de isómeros antioxidantes es el de la difusión más que el de la transferencia electrónica.

Los voltamogramas obtenidos en las disoluciones de ambos isómeros, catecol e hidroquinona, son lo suficientemente diferentes como para plantearnos la capacidad que podrían tener nuestros electrodos para detectar mezclas de ambos isómeros, cuestión de alto interés tecnológico y de difícil solución. Por tanto a continuación se planteó un estudio que permitiera conocer la

posibilidad de discriminación de nuestros electrodos en mezclas de catecol e hidroquinona con objeto de comprobar si los electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas eran capaces de discriminar ambos componentes en una misma mezcla. Esta capacidad de discriminación sería muy importante y aportaría un gran valor añadido a los electrodos, ya que el objetivo de los mismos es realizar su aplicación al estudio de mostos y vinos, en los cuáles coexisten una cantidad elevada de compuestos que normalmente se incluyen de forma conjunta ya que usualmente los sensores utilizados no son capaces de discriminar entre ambos isómeros.

Poder fabricar unos electrodos que sean capaces de detectar dos componentes diferentes en una misma muestra es objeto de un gran interés científico, y los resultados previos mostrados en este trabajo muestran la viabilidad de ello debido a la aparición de los picos de reducción de catecol e hidroquinona a potenciales ligeramente diferentes, especialmente tras la adición de nanopartículas de titanio.

En la *Figura 4.28* se comparan el primer y quinto ciclo de la concentración 10^{-5} M para ambos tipos de antioxidantes en el caso del electrodo modificado, CPE-TiNP's.

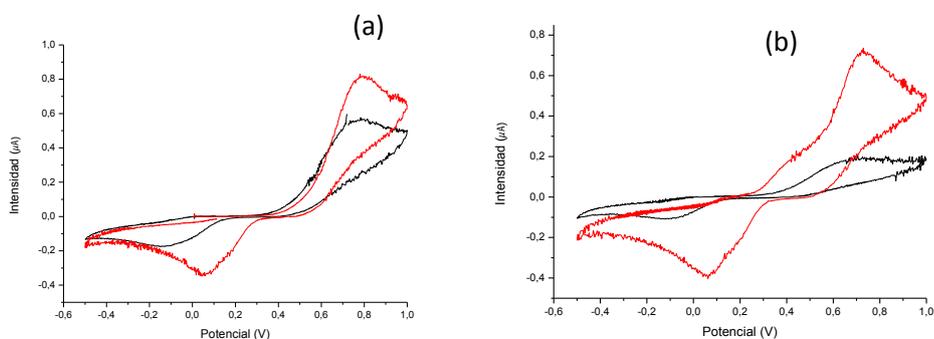


Figura 4.28. Respuesta voltamétrica de CPE-TiNP's para concentración 10^{-5} M de catecol (rojo) e hidroquinona (negro) en: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Se comprueba que el pico de reducción del catecol (rojo) aparece en torno a un potencial de 0,05 V, mientras que el pico asociado a la hidroquinona (negro) se muestra a un potencial negativo, siendo este de -0,1 V. Las intensidades de ambos, sin embargo, sí que son considerablemente diferentes. Esta distinción de potenciales se realiza con los picos de reducción, ya que no sería posible discriminar componentes a partir de los

picos de oxidación por encontrarse a potenciales demasiado próximos. Esta misma conclusión se observa también en el electrodo de grafito sin modificar aunque en este caso las diferencias entre los dos picos de reducción son menores y también lo es la intensidad de corriente asociada a los picos de reducción, especialmente para concentraciones bajas.

De la misma forma, se ha realizado una comparación en la *Figura 4.29* de los mismos ciclos (primero y quinto) pero a una concentración 10^{-3} M, para comprobar que sigue existiendo esa diferencia de potencial a medida que aumenta la concentración, ya que en el estudio anterior hemos podido comprobar que el aumento de concentración origina un desplazamiento de los picos de oxidación y reducción del analito.

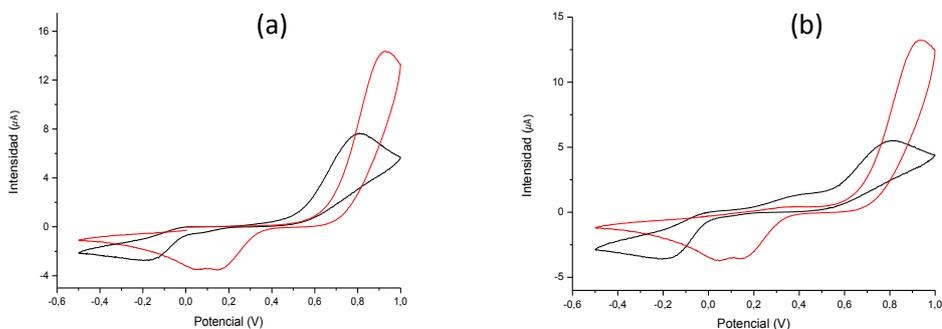


Figura 4.29. Respuesta voltamétrica de CPE-TiNP's para concentración 10^{-3} M de catecol (rojo) e hidroquinona (negro) en: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Como resultado de esta comparación se observa de nuevo una acusada diferencia entre los potenciales a los que ocurre la reducción del analito, encontrándose en torno a un valor igual a 0,15 V en el caso del catecol y de -0,2 V para la hidroquinona. En este caso el rango de intensidades de ambos antioxidantes es mucho más similar, lo cual podría facilitar la distinción de ambos componentes en una mezcla. Para estas concentraciones se observa también una ligera diferencia de potenciales de los picos de oxidación, mucho más intenso y ligeramente desplazado a potenciales más altos en el caso del catecol.

Como conclusión a este estudio inicial se vio posible realizar una discriminación de ambos componentes en una mezcla de los mismos. Este estudio se recoge en el apartado 4.3.5 de esta memoria.

Un aspecto que debe tenerse en cuenta es el posible efecto del pH en los resultados obtenidos. Se ha trabajado con dos tipos de sensores diferentes a lo largo de este trabajo, y cada uno de ellos se ha utilizado en un medio distinto, siendo ácido en el caso de los sensores y neutro en el de biosensores. Se ha creído necesario, por tanto, dedicar el siguiente apartado de este trabajo al estudio del efecto del pH en las soluciones obtenidas, y así poder entender mejor el comportamiento de los sensores en diferentes medios de trabajo.

4.3.3. Efecto del pH

Una vez que ya se ha analizado el efecto de la concentración y de la velocidad de barrido nos proponemos en este apartado, con objeto de completar el estudio de los sensores modificados con nanopartículas en la detección de antioxidantes, conocer el efecto que pudiera tener el pH del medio en los procesos de oxidación y reducción del catecol. Para ello se utilizó una disolución de catecol en KCl 10^{-3} M, cuyo pH es igual a 5, y se aumentó la basicidad adicionando pequeñas cantidades de hidróxido potásico (KOH), consiguiéndose dos disoluciones adicionales, con pH=7 y pH=9.

Esta prueba se realizó para ambos tipos de sensores, a continuación se presentarán los resultados para los electrodos modificados CPE-TiNP's, debido a que las conclusiones en ambos casos fueron similares en lo que al efecto del pH se refiere.

En la *Figura 4.30* se realiza una comparativa de los voltamogramas obtenidos para el primer y quinto ciclo para las tres disoluciones de pH diferentes.

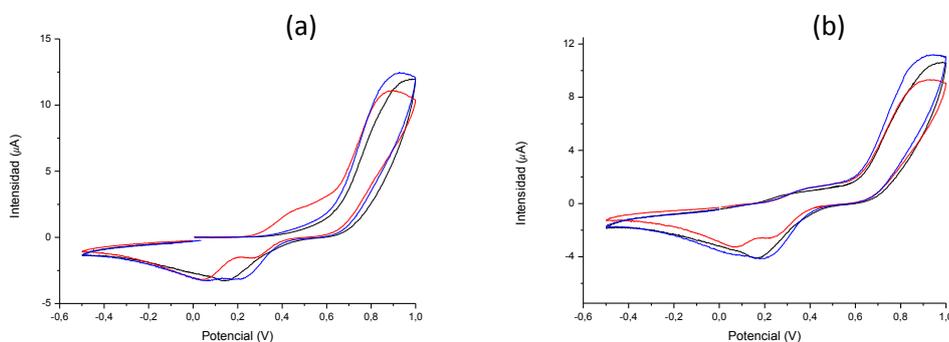


Figura 4.30. Respuesta voltamétrica de CPE-TiNP's en catecol 10^{-3} M para pH=5 (negro), pH=7 (azul), pH=9 (rojo) en: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Una vez más existen diferencias entre el primer y último ciclo consecuencia de un claro efecto del pH en la dimerización así como una diferencia en la intensidad y posición de los picos a medida que el pH aumenta, detalle que es necesario comentar.

En primer lugar, en lo que respecta al fenómeno de dimerización anteriormente comentado, es claramente más acusado cuanto mayor es el pH, viendo que para un pH=9 aparece el pico de oxidación asociado al dímero en el primer ciclo, efecto que no se había observado en el medio ácido en el que hemos trabajado hasta el momento incluso para las concentraciones más altas. Este aumento de intensidad del pico asociado al dímero provoca, por tanto, una disminución de la intensidad de los picos asociada a la reacción redox del monómero catecol, por lo que se observa que para pH=9 los picos son claramente menos intensos que los observados a pH menores; siendo esto especialmente cierto para el último ciclo donde el proceso de dimerización es más acusado.

Otra característica que queda clara a la vista de ambas imágenes, especialmente a partir de la representación del primer ciclo, es el desplazamiento de los picos tanto de oxidación como de reducción hacia potenciales más negativos con el aumento de pH, este desplazamiento es más acusado en el pico de reducción. Esto provoca que la diferencia de potenciales entre los picos de oxidación y reducción sea mayor y la irreversibilidad crezca también a medida que lo hace el pH.

Teniendo en cuenta ambas observaciones se concluye que los sensores tienen un mejor comportamiento a un pH menor, que coincide con el de las disoluciones empleadas en los ensayos anteriores de catecol e hidroquinona en KCl 0,1 M. Sin embargo en el caso de los ensayos de detección realizados con biosensores surge la necesidad de trabajar a pH mayor ya que las enzimas precisan de un medio neutro que evite su degradación. Por ello debemos tener en cuenta este efecto al analizar los resultados de los ensayos realizados con biosensores.

En el caso de los sensores de grafito no modificados, tal y como hemos dicho, el efecto del pH es similar siendo la observación más evidente el acusado aumento de la dimerización cuando aumenta el pH. A continuación se muestran las comparativas entre los electrodos con y sin modificar para las tres disoluciones con pHs distintos (*Figura 4.31*), en las que también se comprueba que las señales son significativamente más intensas para el CPE-TiNP's.

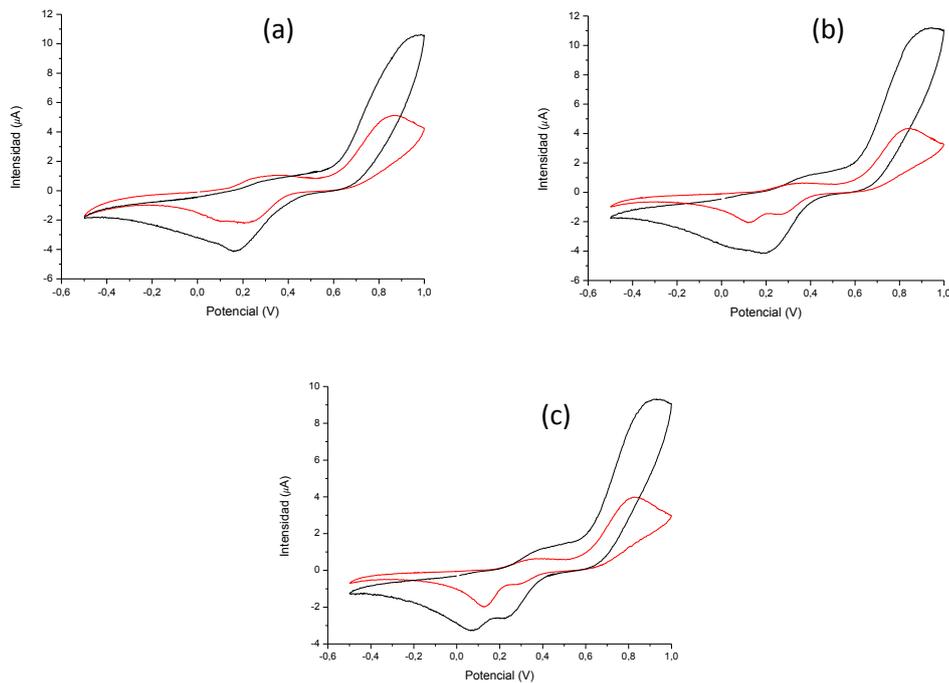


Figura 4.31. Respuesta voltamétrica de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro) en el quinto ciclo de catecol 10^{-3} M para: (a) pH=5, (b) pH=7, (c) pH=9.

Podemos observar que para cualquier valor de pH de la disolución los electrodos modificados presentan intensidades de corriente tanto en oxidación como en reducción mucho más altas que los electrodos de grafito. También se observa que la tendencia a la dimerización al aumentar el pH es todavía mayor en el electrodo con nanopartículas de titanio. Por otra parte el fuerte desplazamiento de los picos de reducción hacia valores más negativos al aumentar el pH en los electrodos modificados hace que la mejora en la reversibilidad como consecuencia de la adición de nanopartículas desaparezca para pHs más elevados.

También se ha realizado un estudio del efecto de pH para la concentración de catecol más baja, esto es 10^{-5} M, con el fin de comprobar si los efectos observados siguen siendo los mismos que para concentraciones mayores. Los resultados obtenidos para el electrodo modificado con nanopartículas de titanio son los siguientes, *Figura 4.32*, para los ciclos 1 y 5 respectivamente.

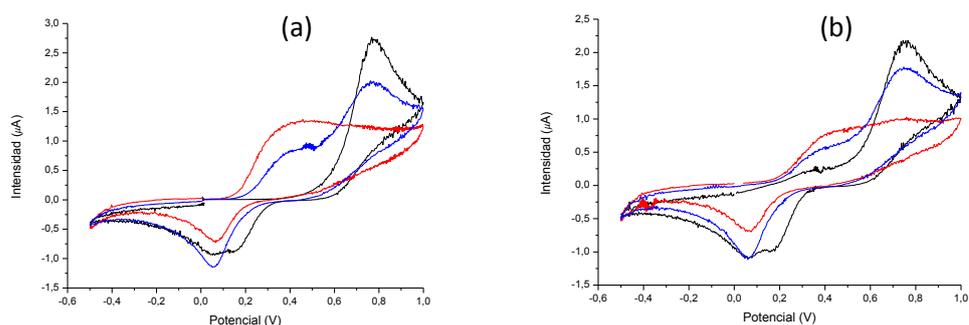


Figura 4.32. Respuesta voltamétrica de CPE-TiNP's en catecol 10^{-5} M para pH=5 (negro), pH=7 (azul), pH=9 (rojo) en: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

La conclusión para esta concentración es similar a la que se observa para concentraciones más altas. El efecto más evidente es la dimerización, para el pH más bajo no se observa el pico de oxidación del dímero ni en el primer ni en el último ciclo. Sin embargo, a medida que aumenta el pH crece el pico de oxidación y reducción del dímero, lo que se traduce en una disminución de intensidad del pico de oxidación y reducción del monómero. De hecho, para pH=9 sólo los picos redox del dímero son evidentes. Esta misma tendencia se observa en el caso del electrodo de grafito sin modificar.

Como siguiente apartado de esta parte de caracterización de antioxidantes se tratará otro tema de gran importancia en cuanto al trabajo con estos sensores fabricados a partir de pasta de carbono, y es la posibilidad de ser reciclados y utilizados de nuevo para la medición de diferentes analitos. Se estudiará, por tanto, el comportamiento de los mismos respecto a su reutilización.

4.3.4. Repetibilidad de los sensores

Otra de las características beneficiosas de la utilización de este tipo de sensores es su posible reciclaje y posterior uso con un nuevo analito, sin que la señal se vea contaminada por mediciones anteriores.

Dicho reciclaje se lleva a cabo presionando el extremo de la jeringuilla con suavidad y limpiando la superficie en la que se encuentra la pasta de carbono con un papel de filtro. A continuación se vuelve a ciclar el electrodo en KCl, para comprobar que durante este proceso no se ha dañado o contaminado de algún componente.

Los resultados de este reciclaje fueron satisfactorios, ya que los electrodos volvieron a dar una señal correcta después de haber sido utilizados como electrodo de referencia de mediciones anteriores.

Como ejemplo gráfico de esta buena repetibilidad, se ha realizado una comparativa en el quinto ciclo (*Figura 4.33*) de un mismo sensor ciclado inicialmente en KCl y volviendo a ser medido en la misma disolución después de ser reciclado.

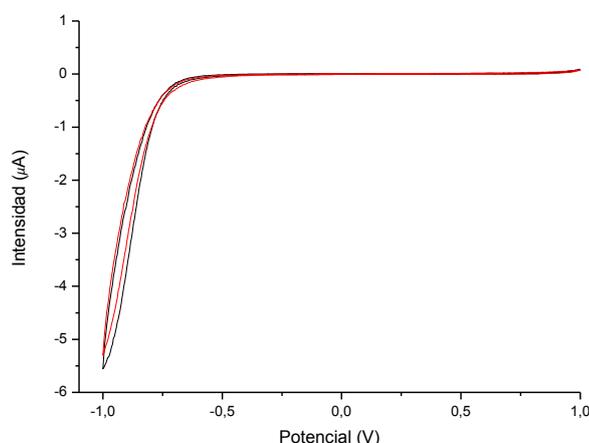


Figura 4.33. Respuesta voltamétrica CPE-TiNP's quinto ciclo en KCl 0,1 M para electrodo sin reciclar (negro) y electrodo reciclado (rojo).

La diferencia entre ambos voltamogramas es insignificante, por lo que puede demostrarse que la repetibilidad de los sensores es suficientemente buena y, por tanto, pueden volver a utilizarse para caracterizar diferentes analitos.

En el apartado siguiente se realizará una caracterización exhaustiva de mezclas de catecol e hidroquinona ya que, como hemos visto anteriormente en este mismo capítulo, creímos posible poder realizar esta discriminación con los sensores de pasta de carbono, debido a la diferencia de potenciales a la que aparecen los picos de reducción de ambos isómeros.

4.3.5. Caracterización de mezclas de hidroquinona y catecol

Con objeto de poder realizar un estudio de la posible discriminación de catecol e hidroquinona en una mezcla de ambos componentes se llevaron a cabo dos tipos de ensayos diferentes.

En primer lugar se realizaron tres voltametrías cíclicas con 3 mezclas diferentes en concentración de ambos analitos, una primera en la que la concentración de ambos componentes en la mezcla era 10^{-5} M, una segunda de concentración 10^{-4} M y una tercera de concentración 10^{-3} M de ambos isómeros.

Como segundo estudio, cuyo objetivo era poder relacionar de forma correcta cada pico con su antioxidante determinado, se partió de una mezcla en la que ambos componentes tenían una concentración 10^{-5} M, y se adicionó progresivamente uno de los dos componentes hasta obtener las concentraciones de ese componente en la mezcla de $0,5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-4} M, $0,4 \cdot 10^{-3}$ M y 10^{-3} M, mismas concentraciones que se utilizaron para los límites de detección anteriores.

Estos dos métodos de caracterización de mezclas se realizaron con los dos tipos de sensores, el electrodo de grafito y el electrodo de grafito modificado con nanopartículas de titanio, y los resultados obtenidos se muestran en los siguientes apartados.

❖ Mezclas de catecol 10^{-5} M/HQ 10^{-5} M, catecol 10^{-4} M/HQ 10^{-4} M y catecol 10^{-3} M/HQ 10^{-3} M

En primer lugar, se realizaron tres ensayos en tres mezclas a concentraciones diferentes, equimolares en ambos isómeros, para comprobar si se observan diferencias entre los picos de oxidación y reducción de los dos analitos para las diferentes concentraciones. Los resultados para el electrodo de grafito (*Figura 4.34*) muestran la variación que sufren los picos acorde al aumento de la concentración de ambos antioxidantes.

Nos fijaremos únicamente en los picos de reducción ya que, como se comentó anteriormente, no será posible distinguir dos picos diferentes en oxidación, por ser los potenciales a los que se oxidan ambos isómeros muy similares.

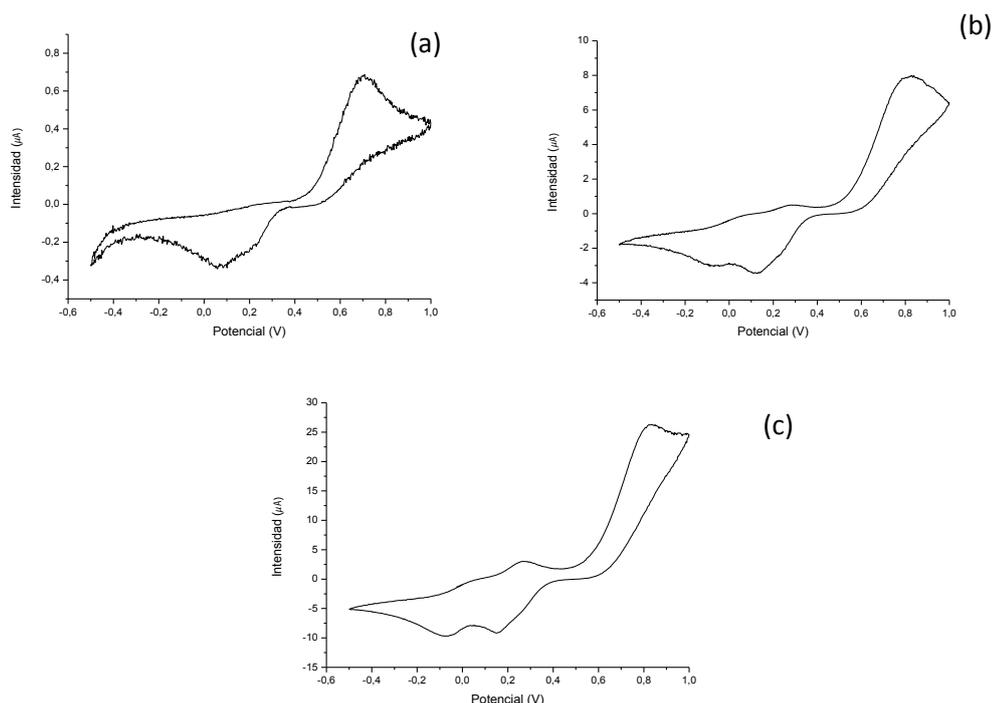


Figura 4.34. Voltamograma quinto ciclo de CPE-C para mezclas: (a) catecol 10^{-5} M/HQ 10^{-5} M, (b) catecol 10^{-4} M/HQ 10^{-4} M, (c) catecol 10^{-3} M/HQ 10^{-3} M.

En el apartado anterior se había observado que el pico de reducción asociado a la hidroquinona aparecía a potenciales más negativos (en torno a $-0,1$ V) y el pico asociado al catecol se producía a un potencial cercano a $0,15$ V. También se vio que las intensidades a las que se producían eran más semejantes a concentraciones mayores, por lo que con estas concentraciones se prevé una mejor discriminación de componentes. Además, la dimerización no influye en la detección de ambos picos, ya que su intensidad asociada es considerablemente menor.

Observando ahora la Figura 4.34 vemos que se siguen observando dos picos de reducción claramente resueltos en las tres mezclas analizadas. Las diferencias entre los picos se observan en cualquier concentración aunque es más notable la diferenciación a concentraciones mayores, en todos los casos los potenciales de aparición de ambos picos correspondiente a los dos isómeros son los esperados. Es para las concentraciones más bajas en las que este electrodo de grafito tiene más dificultades para distinguir entre los dos analitos ya que como podemos observar en la Figura 4.34. (a) no existen dos picos completamente resueltos para la mezcla con concentración 10^{-5} de ambos analitos.

Por tanto, como primera conclusión a este estudio, puede deducirse que los sensores de grafito podrían ser capaces de realizar una discriminación de mezclas de los dos isómeros siempre y cuando estén en concentraciones suficientemente altas. A continuación se estudiará el comportamiento de los sensores modificados con nanopartículas de titanio en las mismas mezclas y se realizará un estudio comparativo con los electrodos de grafito con objeto de dilucidar el papel de las nanopartículas al respecto.

En el caso del electrodo modificado, CPE-TiNP's, la *Figura 4.35* recoge los voltamogramas obtenidos para las mezclas para las tres concentraciones en estudio.

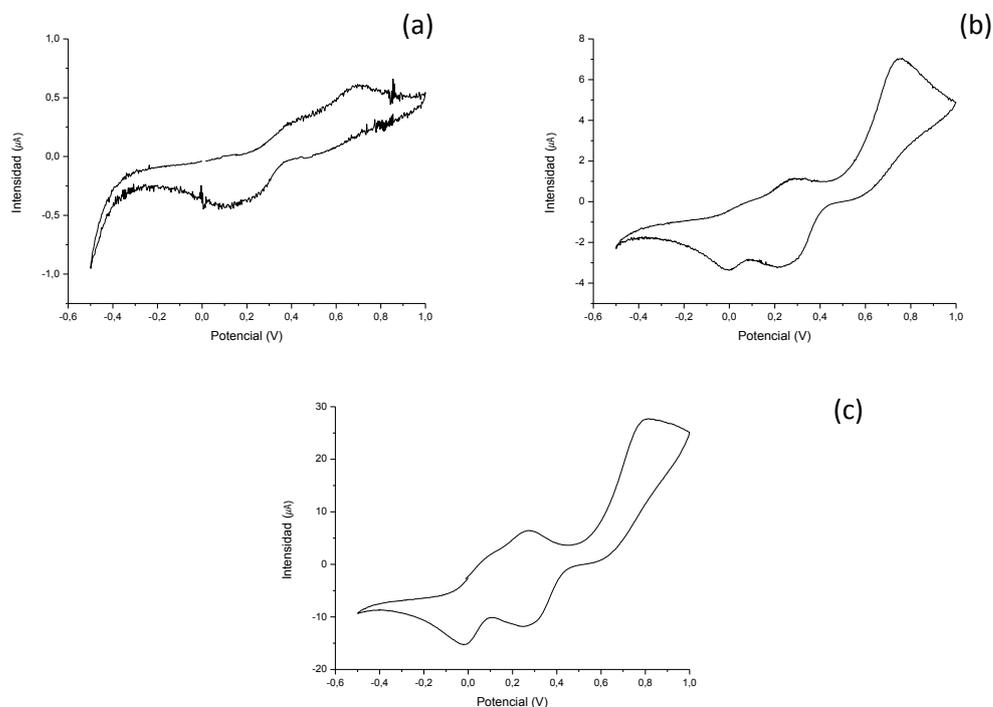


Figura 4.35. Voltamograma quinto ciclo de CPE-TiNP's para mezclas: (a) catecol 10^{-5} M/HQ 10^{-5} M, (b) catecol 10^{-4} M/HQ 10^{-4} M, (c) catecol 10^{-3} M/HQ 10^{-3} M.

La figura correspondiente al quinto ciclo muestra de manera clara esos dos picos relacionados con ambos antioxidantes, que en este caso aparecen a unos potenciales ligeramente desplazados, siendo el asociado a la reducción de la hidroquinona en torno a $E=0$ V, y el pico producido por la reducción de catecol a $E=0,25$ V. Como una ventaja detectable en estos sensores modificados con nanopartículas, puede advertirse la mejor capacidad de

detección de los picos, ya que ambos son mucho más claros a la concentración intermedia (10^{-4} M) e incluso pueden detectarse a la menor concentración con la que se ha trabajado (10^{-5} M), algo que no son capaces de hacer los electrodos de grafito no modificados.

De esta forma, la primera conclusión de este estudio de mezclas sería la verificación de la capacidad de los electrodos de detección de catecol e hidroquinona en una mezcla de ambos a partir del pico de reducción y, en segundo lugar, la mejora de capacidad de detección observada con la adición de nanopartículas a la pasta de grafito.

Como última parte de este primer estudio se ha realizado la comparación respecto a la señal voltamétrica obtenida entre los electrodos de grafito CPE-C y los electrodos modificados, CPE-TiNP's. Observando las intensidades de cada sensor se puede comprobar que, además de convertir el proceso en uno más reversible, los electrodos CPE-TiNP's aportan mayor resolución en los picos y dan lugar a una señal de mayor intensidad de corriente. A modo de ejemplo se presenta la *Figura 4.36* con el primer y quinto ciclo de la concentración 10^{-3} M, en la que se observa claramente el efecto positivo de las nanopartículas. Cabe destacar que a la concentración 10^{-5} M también es más intensa la señal para los sensores modificados, aunque se ha preferido representar el voltamograma de mayor concentración por mostrar mejor la mezcla de ambos monómeros.

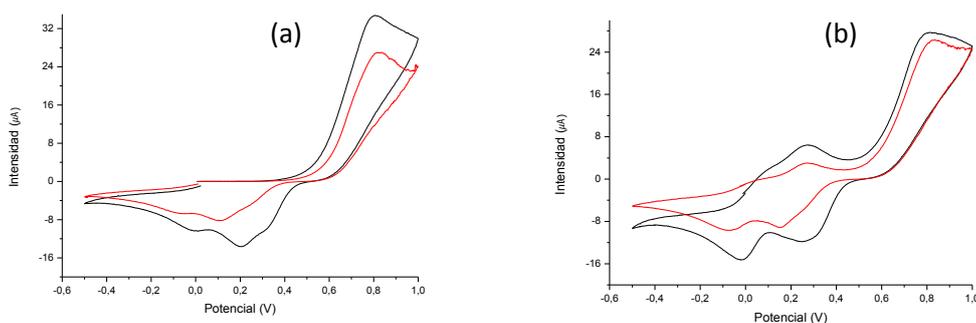


Figura 4.36. Respuesta voltamétrica en mezcla catecol 10^{-3} M/HQ 10^{-3} M de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Con objeto de realizar una correcta caracterización de los picos y poder, por tanto, asegurar que cada pico de reducción pertenece a un antioxidante diferente, se realizó un segundo experimento en relación a las mezclas. Esto

es necesario teniendo en cuenta que además de los picos de los monómeros contamos con el proceso de dimerización que dificulta la interpretación de los voltamogramas. Este consistía en partir de una mezcla de ambos componentes, en la que la concentración de cada uno de ellos era la más baja de las utilizadas, 10^{-5} M (mismos voltamogramas, por tanto, que los referentes a las Figuras 4.34. (a) y 4.35. (a)), y aumentar progresivamente la concentración de uno de ellos. De esa forma, el pico de reducción asociado a ese componente sería el que crecería con el aumento de concentración del analito, y podrían caracterizarse de esta forma los picos sin ningún tipo de duda por la posible interferencia del proceso de dimerización. El desarrollo de este estudio se realiza en el apartado siguiente.

❖ **Mezclas de catecol e hidroquinona manteniendo la concentración de hidroquinona en 10^{-5} M y aumentando la concentración de catecol hasta 10^{-3} M**

En los apartados anteriores se ha podido comprobar que la señal se ha mejorado debido a la adición de nanopartículas, y se ha visto que estos sensores son capaces de realizar una discriminación de ambos antioxidantes en una mezcla. En este apartado se ha trabajado exclusivamente con electrodos modificados, CPE-TiNP's ya que se ha visto que presentaban mayor capacidad de resolución de picos en reducción. El fin de realizar el experimento de este apartado es poder asociar de forma correcta los picos a cada componente de la mezcla, caracterizándolos de forma adecuada ya que también aparecen picos procedentes de la dimerización de los analitos, que podrían dar lugar a confusión.

Para ello se comenzó con una mezcla de catecol e hidroquinona de concentración de ambos en la misma 10^{-5} M, y se realizó una adición sucesiva de catecol en la mezcla hasta alcanzar una concentración de ésta de 10^{-3} M, como si de un límite de detección se tratara. Así pudo estudiarse qué pico de reducción estaba asociado a cada isómero, ya que a la menor concentración deberían aparecer los picos asociados a ambos y, conforme la concentración de catecol aumentaba en la mezcla, el pico asociado a ella aumentaría de igual forma.

En la Figura 4.35. (a) ya pudo estudiarse la mezcla de catecol e hidroquinona con una concentración de ambas 10^{-5} M, por lo que no se ha incluido en este apartado, por tratarse de un voltamograma similar.

Por tanto, para comprobar la posición de los picos a mayores concentraciones de catecol se presentan en la Figura 4.37 las gráficas correspondientes al

quinto ciclo para la concentración intermedia (10^{-4} M) y la mayor concentración utilizada (10^{-3} M). Así podrá estudiarse la variación de los picos a lo largo de los ciclos y el posible desplazamiento en función de la concentración. No se ha representado gráficamente la variación entre el primer y quinto ciclo porque, como bien pudo observarse en el apartado de caracterización de catecol, este analito apenas sufre dimerización y la variación entre los ciclos es mínima.

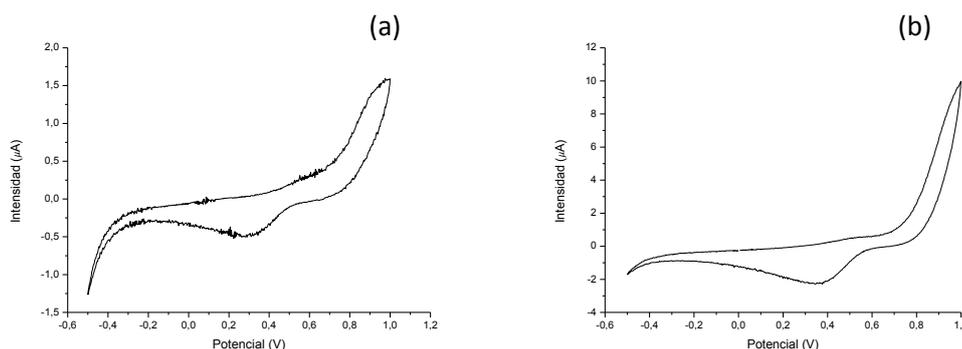


Figura 4.37. Respuesta voltamétrica de CPE-TiNP's en quinto ciclo de mezcla: (a) HQ 10^{-5} M/catecol 10^{-4} M, (b) HQ 10^{-5} M/catecol 10^{-3} M.

En la Figura 4.37. (a), correspondiente a la concentración 10^{-4} M, el pico que se define mejor con mayor intensidad es el que aparece a un potencial de 0,30 V. En la Figura 4.37. (b) el potencial al que aparece el pico de mayor intensidad se desplaza ligeramente a 0,35 V aunque se mantiene en torno a ese valor, y la intensidad del mismo es visiblemente mayor que a menor concentración. Se puede confirmar entonces que el pico que se encontraba a potenciales mayores en el apartado anterior se puede asociar a la reducción del catecol.

Como última comprobación se realizará este mismo proceso a la inversa, aumentando en este caso la concentración de hidroquinona para así poder estudiar el potencial al que aparece la reducción del otro isómero

❖ **Mezclas de catecol e hidroquinona manteniendo la concentración de catecol en 10^{-5} M y aumentando la concentración de hidroquinona hasta 10^{-3} M**

El proceso seguido se define de la misma forma que en el apartado anterior, aumentando en este caso la concentración de hidroquinona hasta obtenerse una mezcla de catecol 10^{-5} M/hidroquinona 10^{-3} M. De igual forma que en el apartado anterior, se ha representado el quinto ciclo de la concentración intermedia y la mayor concentración de hidroquinona en la mezcla (*Figura 4.38*).

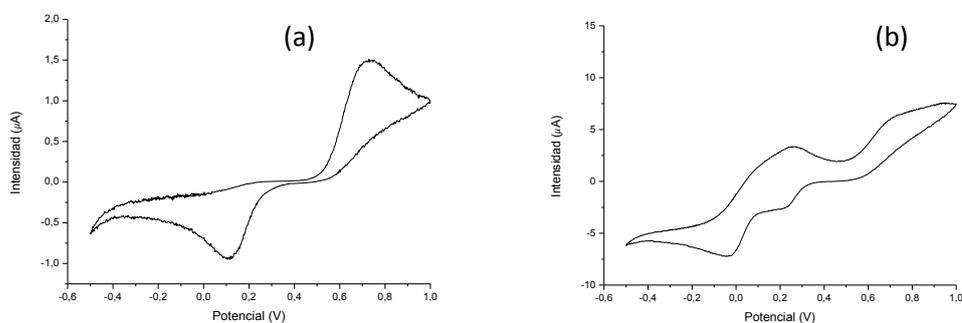


Figura 4.38. Respuesta voltamétrica de CPE-TiNP's en quinto ciclo de mezcla: (a) catecol 10^{-5} M/HQ 10^{-4} M, (b) catecol 10^{-5} M/HQ 10^{-3} M.

A estas concentraciones ya sólo se aprecia un pico de reducción, lógicamente el de reducción del catecol tiene una intensidad muy baja y queda englobado debido a que la intensidad del pico de reducción de la hidroquinona experimenta un claro aumento de intensidad con el aumento de concentración del analito, y por tanto este pico a potenciales claramente menos positivos puede asociarse sin lugar a dudas a la reducción de la hidroquinona. Como el potencial al que aparece se encuentra en torno a los 0 V y, por tanto, a un potencial menor que el asociado al catecol puede concluirse que los picos obtenidos en el primer apartado de caracterización de mezclas pertenecen cada uno de ellos a un isómero diferente y, por tanto, estos sensores son capaces de discriminar entre ambos analitos cuando aparecen como componentes en una mezcla.

Ya se comentó anteriormente que la hidroquinona sufre un proceso de dimerización más acusado que el catecol, especialmente a concentraciones altas. Para visualizarlo, se ha representado el primer y quinto y ciclo de la respuesta voltamétrica en 10^{-3} M como ejemplo de este comportamiento

(Figura 4.39). Se observa que, como resultado de la dimerización, la morfología del voltamograma cambia especialmente en la zona de oxidación. En el quinto ciclo el pico correspondiente al dímero, a potenciales más negativos, aumenta de intensidad mientras que el asociado al monómero, a potenciales mayores, se reduce. Por ello, en el primer ciclo la intensidad del pico de oxidación del monómero es mayor que en el quinto ciclo y a la inversa, la intensidad del pico de oxidación del dímero es mayor en el quinto ciclo que en el primero. En la reducción para el quinto ciclo se observa un fuerte desplazamiento del pico de reducción hacia potenciales más negativos como consecuencia de la mayor reducción del dímero.

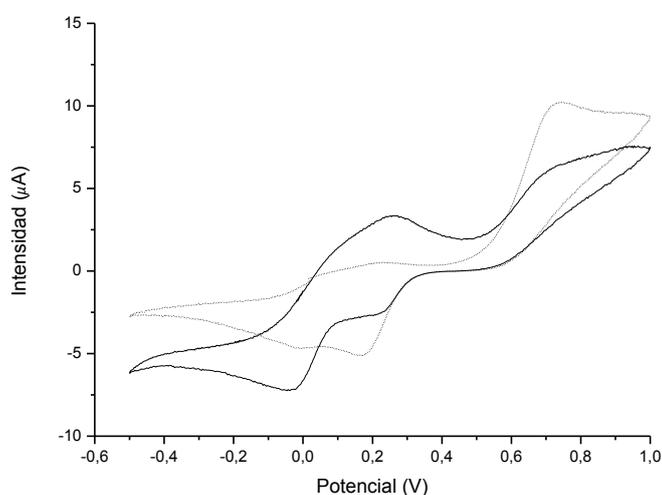


Figura 4.39. Respuesta voltamétrica de CPE-TiNP's en mezcla catecol 10^{-5} M/HQ 10^{-3} M para primer ciclo (línea punteada) y quinto ciclo (línea continua).

Por último se abordará en el siguiente apartado el comportamiento de los biosensores con y sin nanopartículas de titanio en los que, como ya se ha comentado anteriormente, todas las mediciones deben realizarse en medio neutro, por lo tanto se han utilizado disoluciones en buffer fosfato en lugar de cloruro potásico, lo que sin duda influirá en los resultados obtenidos.

4.4. Detección de antioxidantes y azúcares con biosensores

En este apartado se detallan los resultados que se han obtenido utilizando biosensores sin modificar y modificados con nanopartículas de titanio. En primer lugar se comentarán los estudios realizados con biosensores en los que se ha depositado como enzima tirosinasa (Tyr). Con esta enzima, específica para la detección de antioxidantes, se ha realizado en primer lugar la detección del catecol, junto con el cálculo de los límites de detección y la comparación de señales entre sensores y biosensores para este analito. A continuación se ha trabajado de la misma forma con el otro isómero, es decir, con la hidroquinona. Se ha visto la posibilidad de distinguir entre ambos isómeros con la utilización de estos biosensores, por lo que se ha realizado un estudio de mezclas de catecol e hidroquinona en una línea semejante a la realizada con sensores sin enzima; finalmente se han comparado los resultados obtenidos con biosensores con tirosinasa con los aportados por los sensores sin enzima.

Como última parte de este apartado, se estudiará la detección de la glucosa, otro de los componentes básicos de mostos y vinos, para la cual resulta imprescindible la utilización de una enzima específica que es la glucosa oxidasa (GOx).

4.3.2. Detección de catecol

En primer término cabe señalar que la morfología de los voltamogramas obtenidos con la enzima es diferente a la obtenida sin ella, tanto para los sensores de grafito como para los sensores de grafito modificados con nanopartículas de titanio. En primer término se observa un importante incremento de densidad de corriente, no se observa dimerización y las posiciones de los picos de oxidación y reducción se desplazan a potenciales más negativos.

Como primer estudio de la caracterización de catecol con biosensores se presenta la *Figura 4.40* con el límite de detección realizado con el CPE-TiNP's/Tyr.

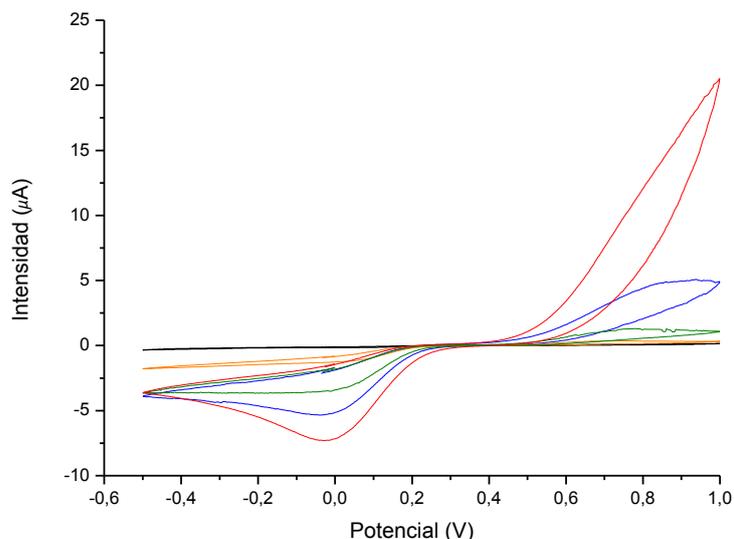


Figura 4.40. Límite de detección de CPE-TiNP's/Tyr en catecol con concentraciones: 10^{-5} M (negro), $0,5 \cdot 10^{-4}$ M (naranja), 10^{-4} M (verde), $0,4 \cdot 10^{-3}$ M (azul) y 10^{-3} M (rojo).

Como primera observación de este estudio se constata que, en todas las pruebas realizadas, los biosensores no fueron capaces de detectar el antioxidante a bajas concentraciones, ya que el voltamograma no muestra ninguna reacción redox a la concentración 10^{-5} M, por lo que la morfología del mismo es plana. A mayores concentraciones, por ejemplo $0,5 \cdot 10^{-4}$, sí que se observa una reacción redox; con un pico de oxidación y reducción claramente definido. El aumento de la concentración produce un desplazamiento del pico de oxidación hacia potenciales más positivos lo que hace que para la mayor concentración (10^{-3} M) apenas sea visible; se ha utilizado la misma escala con objeto de hacer las comparaciones oportunas con y sin enzima. Las conclusiones obtenidas a partir de la respuesta voltamétrica del CPE-C/Tyr son similares a éstas.

Se han calculado, de igual forma que en apartados anteriores, los valores numéricos del límite de detección en ambos tipos de sensores con y sin nanopartículas de titanio añadidas. Para ello, se ha calculado en primer lugar para el CPE-C/Tyr el valor de la desviación típica de las intensidades de los tres últimos ciclos del sensor medido en el blanco (que en el caso de los biosensores es buffer fosfato) para un potencial $E=0,9$ V, que es el potencial al que aparece el pico de oxidación para la concentración $0,5 \cdot 10^{-4}$ M. Además se ha representado la curva de calibración tomando la intensidad del último

ciclo para el pico de oxidación en todas las concentraciones. En la *Figura 4.41* se presenta la recta de calibración para el electrodo CPE-C/Tyr.

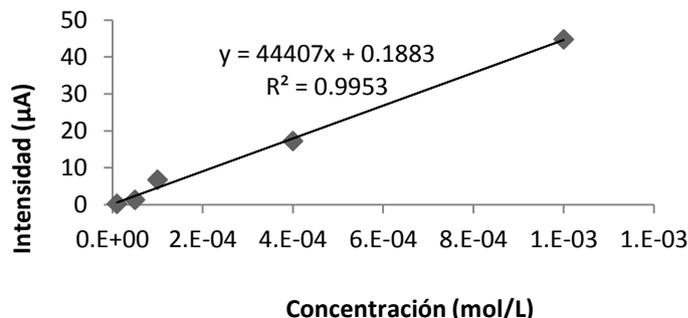


Figura 4.41. Recta de calibración de CPE-C/Tyr en catecol para el cálculo de LOD.

El límite de detección del electrodo CPE-C/Tyr se calcularía como:

$$\begin{aligned}
 LOD \text{ (CPE - C/tyr en catecol)} &= \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 8,33 \cdot 10^{-3}}{44407} \\
 &= 5,63 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot L^{-1}
 \end{aligned}$$

Este valor obtenido es menor que el que se había calculado para el caso del sensor CPE-C en catecol, por lo que es un resultado positivo en cuanto al uso de enzimas.

De igual forma, la recta de calibración correspondiente al CPE-TiNP's/Tyr sería la correspondiente a la *Figura 4.42*.

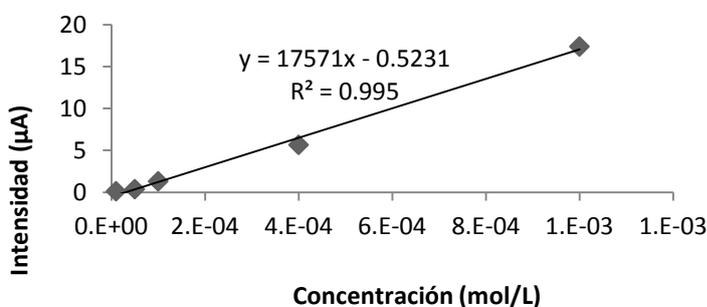


Figura 4.42. Recta de calibración de CPE-TiNP's/Tyr en catecol para el cálculo de LOD.

El límite de detección en este caso sería igual a:

$$\begin{aligned} LOD (CPE - TiNP's/Tyr \text{ en catecol}) &= \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 2,03 \cdot 10^{-3}}{17571} \\ &= 3,46 \cdot 10^{-7} mol \cdot L^{-1} \end{aligned}$$

Este valor obtenido también es inferior al que se había calculado para el mismo sensor modificado con nanopartículas pero sin enzima, por lo que se muestra en este caso también un efecto positivo de las enzimas. Además el valor obtenido para el CPE-TiNP's/Tyr también es menor que el calculado para el CPE-C/Tyr, por lo que se sigue observando un comportamiento mejorado de los sensores con nanopartículas de titanio.

Por último se muestra una comparativa para el electrodo CPE-TiNP's con y sin enzima, para observar las diferencias asociadas al uso de sensores y biosensores (Figura 4.43). No se ha realizado una comparación a la menor concentración (10^{-5} M) ya que, como hemos comentado, a simple vista no se han observados picos de oxidación-reducción definidos con el uso de biosensores para estas concentraciones.

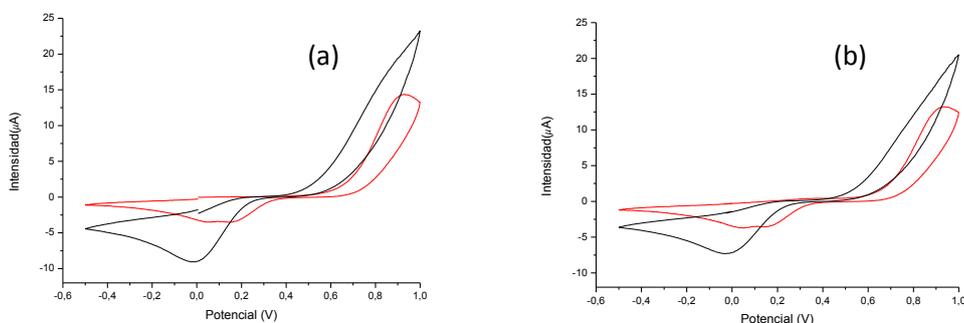


Figura 4.43. Voltamograma en catecol 10^{-3} M de CPE-TiNP's (rojo) y CPE-TiNP's/Tyr (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Tal y como se ha comentado se observa un incremento en la intensidad de corriente en los voltamogramas con el uso de biosensores, especialmente para el pico de reducción. El pico de oxidación también sufre un aumento de intensidad, aunque se ve muy desplazado a potenciales mayores. Este desplazamiento también ocurre en el pico de reducción que se desplaza a potenciales más negativos; la diferencia de potencial entre los picos es

considerablemente mayor que sin el uso de la enzima tirosinasa, por lo que la irreversibilidad de los picos también aumenta sustancialmente.

A continuación se ha procedido de igual forma en la caracterización de la hidroquinona, por lo tanto se realizará un análisis similar en el siguiente apartado.

4.4.2. Detección de hidroquinona

En este caso se procederá de la misma forma que en el apartado anterior. En primer lugar se muestran los voltamogramas obtenidos en las distintas concentraciones de hidroquinona con objeto de calcular el límite de detección del electrodo modificado CPE-TiNP's/Tyr (Figura 4.44), a continuación se compararán los límites de detección obtenidos en ambos tipos de sensores con los que se había calculado para los sensores y por último se comparará la diferencia existente en los voltamogramas obtenidos con biosensores con las respuestas obtenidas por los sensores sin enzimas para las mismas concentraciones de analito.

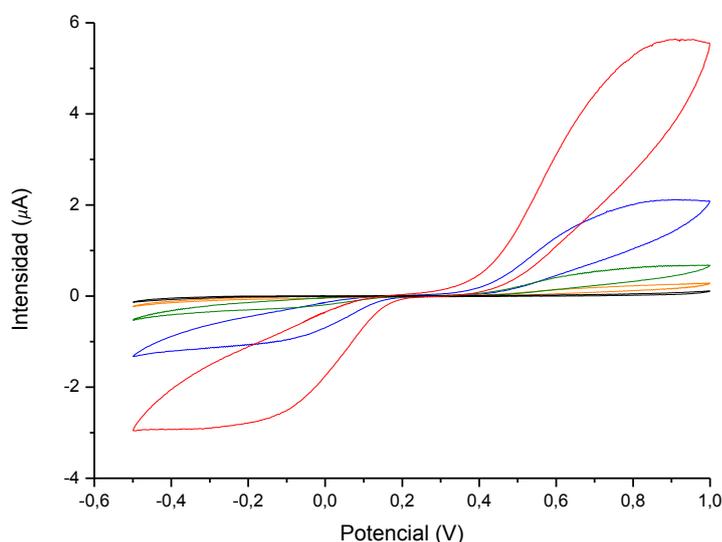


Figura 4.44. Límite de detección de CPE-TiNP's/Tyr en HQ con concentraciones: 10⁻⁵ M (negro), 0,5·10⁻⁴ M (naranja), 10⁻⁴ M (verde), 0,4·10⁻³ M (azul) y 10⁻³ M (rojo).

A la vista de los voltamogramas obtenidos, se observa un único pico de oxidación y reducción en todas las concentraciones, con lo que tampoco se observa dimerización en este caso. A diferencia de lo que ocurría en los sensores sin enzima en este caso no hay apenas diferencia entre el primer ciclo y los siguientes. El potencial al que aparece el pico de oxidación se encuentra en torno a un valor $E=0,8$ V y el pico de reducción a $E=-0,1$ V y, de la misma forma que en el caso del catecol, no se observa ningún pico redox de relevancia para la menor concentración (10^{-5} M).

Para el cálculo del límite de detección, de igual forma que en el caso del catecol, se ha escogido el pico de oxidación, ya que es el pico más intenso. El valor de la desviación típica del blanco se ha calculado a partir de las intensidades del sensor ciclado en buffer fosfato para el potencial en el que aparece el pico de oxidación cuando existe analito en una concentración $0,5 \cdot 10^{-4}$ M, que corresponde a $E=0,85$ V, en el CPE-C/Tyr y $E=0,75$ V para CPE-TiNP's/Tyr. No se ha utilizado el pico de la concentración más baja ya que, como hemos comentado, no existen picos cuando se trabaja con concentraciones reducidas con biosensores.

A continuación (Figura 4.45) se muestra la recta de calibrado para el biosensor de grafito sin modificar.

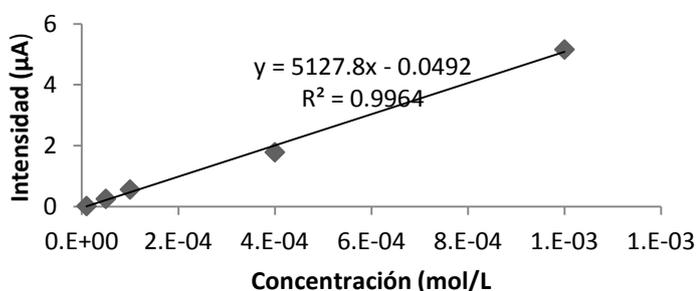


Figura 4.45. Recta de calibración de CPE-C/Tyr en HQ para el cálculo de LOD.

El límite de detección asociado al electrodo CPE-C/Tyr sería el siguiente:

$$LOD (CPE - C/Tyr \text{ en HQ}) = \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 2,95 \cdot 10^{-3}}{5127,8} = 1,73 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot L^{-1}$$

Este valor obtenido es muy similar, aunque ligeramente más bajo, que el que se había calculado para la hidroquinona en el electrodo de grafito sin enzima, por lo que en este caso se sigue observando, al igual que con el catecol, que

el uso de la enzima supone una ligera mejora en lo que respecta al límite de detección cuando se trata de la determinación de hidroquinona. Este efecto beneficioso es menos importante que el observado en el otro isómero.

Se hizo el mismo estudio para el sensor de grafito modificado con nanopartículas de titanio con tirosinasa como enzima. De igual forma, la recta de calibración del CPE-TiNP's se representa en la *Figura 4.46*.

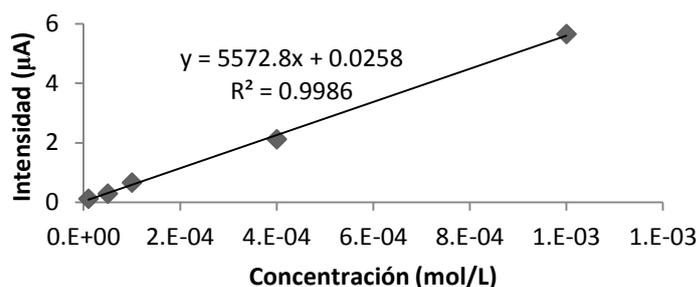


Figura 21. Recta de calibración de CPE-TiNP's/Tyr en HQ para el cálculo de LOD.

El límite de detección en este último tomaría el valor siguiente:

$$LOD (CPE - C/Tyr \text{ en HQ}) = \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 1,10 \cdot 10^{-3}}{5272,8} = 5,91 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot L^{-1}$$

Una vez más se observa que el valor del límite de detección es menor que en el electrodo sin modificar, con lo que las nanopartículas están realizando un efecto de transferencia electrónica efectivo en el proceso. Si se realiza una comparación con respecto a los sensores modificados sin enzima, el biosensor tiene una mayor capacidad de detección, aunque las diferencias son poco significativas. En todos los casos se obtienen límites de detección muy bajos.

Como conclusión tanto para el catecol como para la hidroquinona, lo que sí se deduce del comportamiento de los biosensores es que los menores límites de detección y los mejores ajustes se consiguen con los biosensores modificados con nanopartículas. Esto también ocurre con los sensores sin enzima con lo que podemos concluir que, desde el punto de vista cuantitativo, en todos los casos el uso de nanopartículas supone una mejora de resultados respecto a los sensores de grafito sin modificar.

Por último se ha incluido una comparativa entre el sensor CPE-TiNP's y el biosensor CPE-TiNP's/Tyr para comprobar si la deposición de la enzima induce cambios a los voltamogramas obtenidos como ya se ha visto que ocurría en el caso de la detección del catecol. Esta comparativa (*Figura 4.47*) se ha realizado en el primer y quinto ciclo de la concentración más alta, ya que es donde se ha comprobado que el biosensor tiene los picos más definidos y son más intensos.

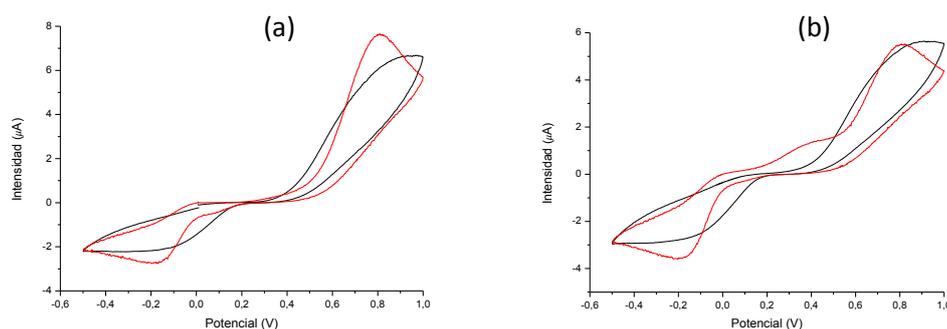


Figura 4.47. Voltamograma en HQ 10^{-3} M de CPE-TiNP's (rojo) y CPE-TiNP's/Tyr (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Se observa un comportamiento similar entre ambos sensores, ya que las intensidades son muy similares en este caso, lo que confirma que apenas exista diferencia en el límite de detección. De la gráfica correspondiente al último ciclo queda clara la diferencia entre sensor y biosensor en lo que respecta al fenómeno de dimerización, que no se observa cuando se trabaja con enzimas como la tirosinasa, lo cual provoca una señal más clara y un desplazamiento del pico de reducción hacia potenciales más positivos aumentando la reversibilidad del proceso.

Por último se ha realizado un estudio de mezclas de catecol e hidroquinona, para comprobar si estos biosensores con tirosinasa eran capaces de detectar diferencias entre los dos isómeros y así comparar el estudio en disoluciones hechas con estas mezclas con el realizado con sensores sin enzima. También se analizará el efecto de las nanopartículas al respecto. Este tema se abordará en el siguiente apartado.

4.4.3. Caracterización de mezclas de hidroquinona y catecol

Con el objetivo de observar las diferencias de comportamiento de los sensores y biosensores en el estudio de antioxidantes, se llevó a cabo la misma experimentación en cuanto a las mezclas que en apartados anteriores. Se realizaron tres mezclas de catecol e hidroquinona, cuyas concentraciones en la mezcla fueron equimolares, y de valores 10^{-5} M, 10^{-4} y 10^{-3} M. La primera conclusión obtenida de estas pruebas es la constatación de que a concentraciones menores (10^{-5} M) los biosensores no son capaces de detectar antioxidantes. En la *Figura 4.48* se presentan los resultados obtenidos a las dos concentraciones mayores, ya que de la primera no puede extraerse ninguna información del voltamograma.

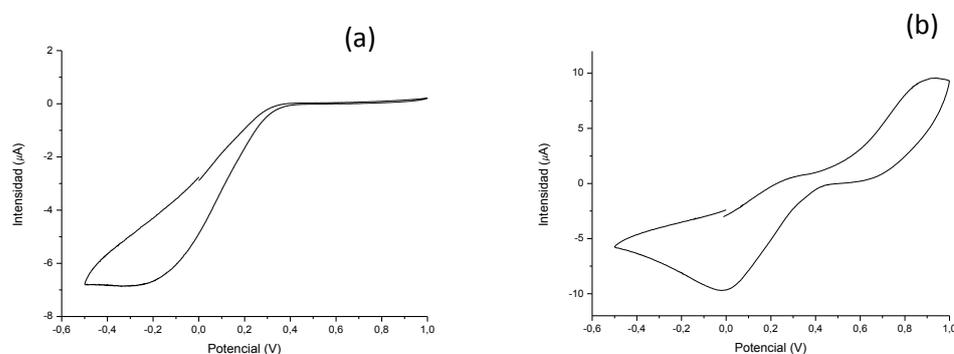


Figura 4.48. Voltamograma quinto ciclo de CPE-TiNP's para mezclas: (a) catecol 10^{-4} M/HQ 10^{-4} M, (b) catecol 10^{-3} M/HQ 10^{-3} M.

A la vista de los resultados y observando el voltamograma correspondiente a la mayor concentración, que es el que presenta unos resultados más claros, únicamente se observa un pico de oxidación a un potencial $E=0,9$ V y otro pico de reducción a $E=0$ V, por lo que los resultados difieren de los obtenidos sin enzima. Ya se había comentado en anteriores apartados que en el estudio de biosensores no aparecía el fenómeno de dimerización, lo cual se puede comprobar también en este caso, al no aparece un segundo pico de oxidación y reducción cuando se trabaja con concentraciones mayores. Tampoco se observa un pico asociado a cada isómero, por lo que se puede deducir que el biosensor engloba ambos componentes en el mismo pico de oxidación y reducción. Por lo tanto, se comprueba que el sensor sin enzima tiene un mejor comportamiento en cuanto a la caracterización de mezclas de catecol e hidroquinona.

Como última comparativa en cuando al estudio de mezclas con sensores se presenta la *Figura 4.49*, con una comparativa en el último ciclo a la concentración más alta de ambos analitos, que es la concentración a la que mejor comportamiento se ha visto de los biosensores.

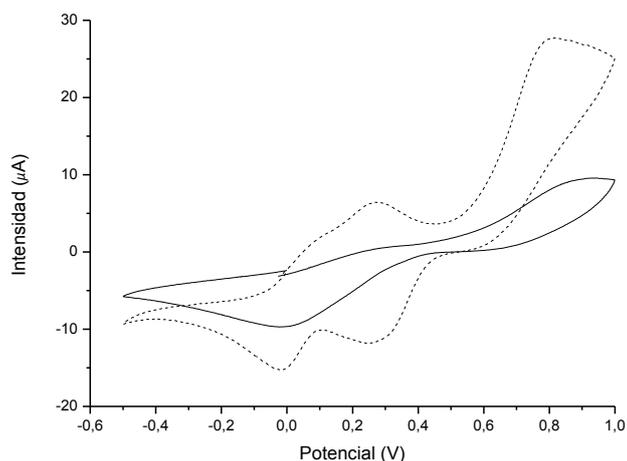


Figura 4.49. Voltamograma del quinto ciclo de mezcla catecol 10^{-3} M/HQ 10^{-3} M de CPE-TiNP's (línea discontinua) y CPE-TiNP's/Tyr (línea continua).

Existe una notable mejora de intensidad de señal para los sensores sin enzima (línea discontinua), además de la clara diferenciación de componentes en la mezcla, por la aparición de dos picos de reducción a potenciales visiblemente diferenciados.

Por último, aunque no se hayan presentado los resultados para el CPE-C/Tyr con el objeto de centrarnos en la comparativa acerca del comportamiento de sensores con y sin enzima, cabe destacar que sí que se realizaron estas pruebas con los sensores sin nanopartículas con la enzima tirosinasa, obteniéndose unos picos mejor definidos y más reversibles para el CPE-TiNP's. Un ejemplo de este resultado se refleja en la *Figura 4.50*, en la que se realiza una comparación de voltamogramas en el quinto ciclo a la concentración 10^{-3} M para los dos analitos.

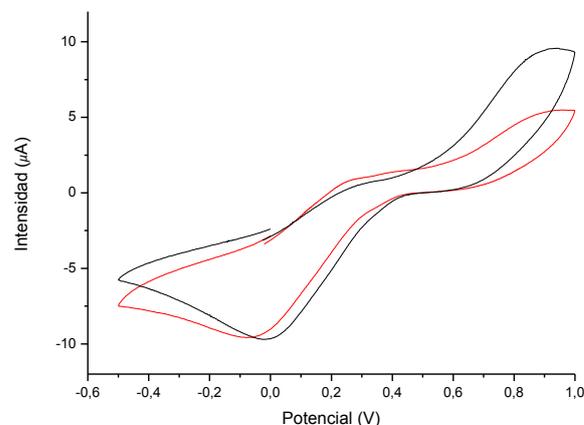


Figura 4.50. Respuesta voltamétrica quinto ciclo de mezcla catecol 10^{-3} M/HQ 10^{-3} M para CPE-C/Tyr (rojo) y CPE-TiNP's /Tyr (negro).

4.4.4. Detección de glucosa

Como último apartado de este trabajo se muestran los resultados obtenidos en biosensores fabricados con enzima de glucosa oxidasa con objeto de conocer su viabilidad para la detección de glucosa, que como es conocido necesita de esta enzima para su detección. El objetivo principal de la investigación es la detección de antioxidantes, sin embargo nos ha resultado interesante conocer si el efecto beneficioso de las nanopartículas de titanio observado en la detección de antioxidantes es también visible para la detección de azúcares, en concreto glucosa, que es sin duda otro de los componentes esenciales de vinos y mostos.

Para comprender el comportamiento de estos biosensores debemos tener en cuenta el esquema de la reacción enzimática y la detección electroquímica mostrados en la Figura 4.51.

La enzima electrocataliza la reducción del oxígeno disuelto lo que hace que aparezca un pico de reducción; en presencia de oxígeno la enzima reducida se oxida en la superficie y retiene la actividad catalítica. Esta regeneración disminuye la reversibilidad y aumenta el pico de reducción. Al añadir glucosa en la solución aireada el pico de reducción disminuye cuando aumenta la concentración de glucosa, al ocurrir las reacciones 1 y 2 de la figura. La glucosa es el sustrato de la enzima, su presencia dará lugar a una reacción catalizada por la enzima y una disminución de la forma oxidada en la

superficie del electrodo, consecuencia de la competencia entre los dos mecanismos.

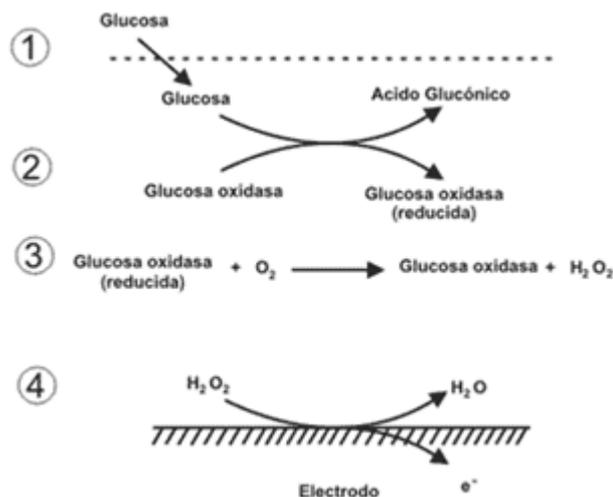


Figura 4.51. Reacción enzimática de la Glucosa Oxidasa (GOx).

Por tanto es esperable que un aumento en la concentración de glucosa genere una disminución del pico de reducción. La disminución de intensidad del pico de reducción se puede usar para detectar la glucosa y probar por tanto la actividad enzimática de la glucosa oxidasa.

Con objeto de comprobar lo anterior se trabajó con un electrodo de grafito no modificado y se realizaron ensayos de voltametría cíclica en soluciones de buffer fosfato aireadas a las que progresivamente se incrementa la concentración de glucosa desde $2 \cdot 10^{-4}$ M como concentración más baja hasta $2 \cdot 10^{-2}$ M como máximo. En la Figura 4.52 se muestran los voltamogramas obtenidos en los ensayos.

Se aprecia notablemente que en el voltamograma correspondiente a la concentración menor, esto es $2 \cdot 10^{-4}$ M, se observa un pico de reducción muy intenso a un potencial de $-0,3$ V que corresponde a la reducción del oxígeno; el correspondiente pico de oxidación se encuentra a $-0,22$ V. Cuando aumentamos la concentración de glucosa hasta $2 \cdot 10^{-3}$ M se observa claramente que el pico de reducción se desplaza ligeramente a potenciales más positivos y, sobre todo, que disminuye su intensidad de corriente. Ulteriores incrementos de la concentración de glucosa originan el mismo efecto, el pico de reducción se desplaza y disminuye de intensidad, mientras el pico de oxidación apenas se desplaza ligeramente hacia valores más

positivos al aumentar la concentración de glucosa y su intensidad de corriente, en lugar de disminuir como en el pico catódico aumenta ligeramente.

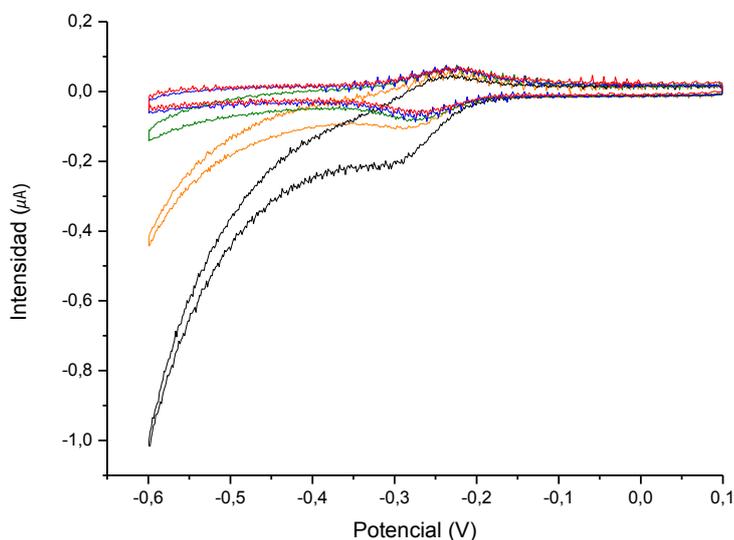


Figura 4.52. Efecto de la concentración de glucosa en el electrodo CPE-C/GOx en: $2 \cdot 10^{-4}$ M (negro), 10^{-4} M (naranja), $2 \cdot 10^{-3}$ M (verde), 10^{-3} M (azul) y $2 \cdot 10^{-3}$ M (rojo).

Por tanto la disminución de la intensidad de corriente correspondiente al pico de reducción podría utilizarse para calcular el límite de detección del electrodo.

De igual forma que en anteriores casos, se ha calculado la desviación estándar de la intensidad de los tres últimos ciclos del blanco (buffer fosfato) para un potencial $E = -0,3$ V, que se presenta en la ecuación final, y se ha representado la Figura 4.53 con la recta de calibración.

Cabe destacar que para la obtención de la recta de calibración únicamente se tomaron los puntos a concentraciones menores ya que, según aumentaba la concentración se perdía la tendencia lineal, cuyo motivo ha podido ser la sobresaturación debido a una concentración demasiado grande de analito. Aún así, el resto de cálculos son similares al de todos los casos.

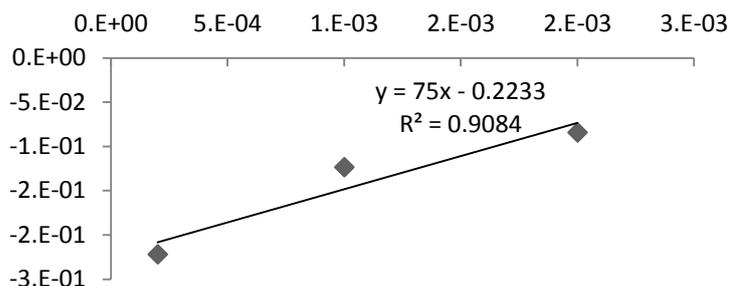


Figura 4.53. Recta de calibración de CPE-C/GOx en glucosa para el cálculo de LOD.

El límite de detección sería igual a:

$$\begin{aligned} LOD (CPE - C/GOx \text{ en glucosa}) &= \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 2,16 \cdot 10^{-3}}{75} \\ &= 8,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot L^{-1} \end{aligned}$$

Se observa que este límite de detección es de un orden menor que el obtenido para los biosensores de tirosinasa.

A continuación se muestran los voltamogramas obtenidos en el electrodo de grafito modificado con nanopartículas de titanio cuando se aumenta la concentración de glucosa en el mismo rango que se ha utilizado en el electrodo no modificado. En la Figura 4.54 se muestran los resultados obtenidos.

La figura muestra que el electrodo modificado tiene un comportamiento similar al observado para el electrodo de grafito, ya que se comprueba cómo éste es sensible a las variaciones de glucosa en el medio e incluso los cambios son más acusados, lo que indica que las nanopartículas de titanio parecen tener también un efecto en este caso. Así, se observa que para la concentración de glucosa menor, $2 \cdot 10^{-4}$ M, en el voltamograma se observa un pico de reducción claro a un potencial de -0,28 V, ligeramente desplazado hacia valores más positivos en comparación con el electrodo sin modificar; el pico de oxidación se encuentra en -0,25 V, con lo que hay una mejora en la reversibilidad con la adición de nanopartículas. Cuando se incrementa la concentración de glucosa a $2 \cdot 10^{-3}$ M se observa claramente el desplazamiento del potencial del pico de reducción a valores más positivos a la vez que disminuye su intensidad de corriente. El efecto de adiciones sucesivas de glucosa sobre el electrodo con nanopartículas es más evidente incluso que el observado en el electrodo no modificado.

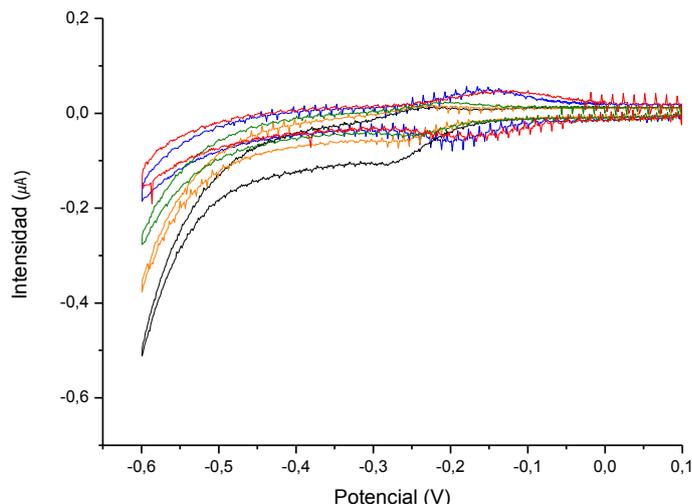


Figura 4.54. Efecto de la concentración de glucosa en el electrodo de CPE-TiNP's/GOx en: $2 \cdot 10^{-4}$ M (negro), 10^{-4} M (naranja), $2 \cdot 10^{-3}$ M (verde), 10^{-3} M (azul) y $2 \cdot 10^{-3}$ M (rojo).

También en este caso la disminución de la intensidad de corriente correspondiente al pico de reducción podría utilizarse para calcular el límite de detección del electrodo.

Se ha procedido de la misma forma que para el electrodo de carbono, se ha calculado la desviación típica de la intensidad de los tres últimos ciclos del electrodo en buffer fosfato, tomándose en este caso para el potencial $E = -0,28$ V. También se representa en la Figura 4.55 la recta de calibración para las tres concentraciones menores, debido al mismo motivo que en el caso anterior.

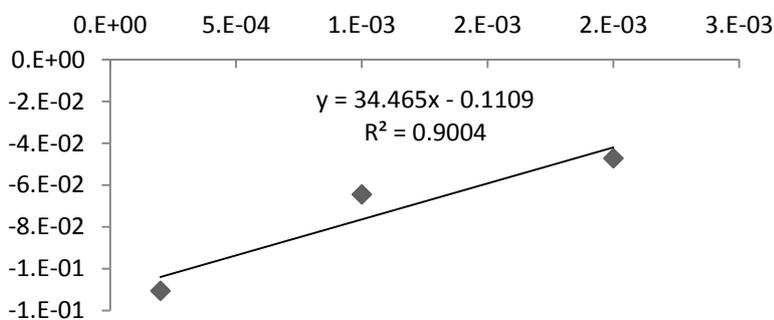


Figura 4.55. Recta de calibración de CPE-TiNP's/GOx en glucosa para el cálculo de LOD.

El límite de detección para el CPE-TiNP's/GOx se calcula a continuación:

$$\begin{aligned} LOD (CPE - TiNP's/GOx \text{ en glucosa}) &= \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 8,60 \cdot 10^{-4}}{34,465} \\ &= 7,49 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot L^{-1} \end{aligned}$$

Se ha obtenido un resultado del mismo orden de magnitud que para el electrodo sin modificar, pero menor para el caso del electrodo con nanopartículas de titanio. Por tanto, una vez más se muestra el comportamiento mejorado que supone la adición de nanopartículas.

Con objeto de comparar ambos sensores se muestra en la *Figura 4.56* el comportamiento de los dos electrodos con y sin modificación para dos concentraciones de glucosa. En el caso de la concentración de glucosa $2 \cdot 10^{-4}$ M se observa que la intensidad del pico de oxidación es similar en ambos electrodos, sin embargo la intensidad del pico de reducción es claramente menor en el caso del electrodo modificado con nanopartículas. Esto podría indicar que las nanopartículas están activando el proceso de oxidación-reducción de la glucosa con lo que queda menos cantidad de oxígeno disponible para su reducción y la intensidad del pico disminuye. Por otra parte este hecho es visible tanto en el primer como en el último ciclo.

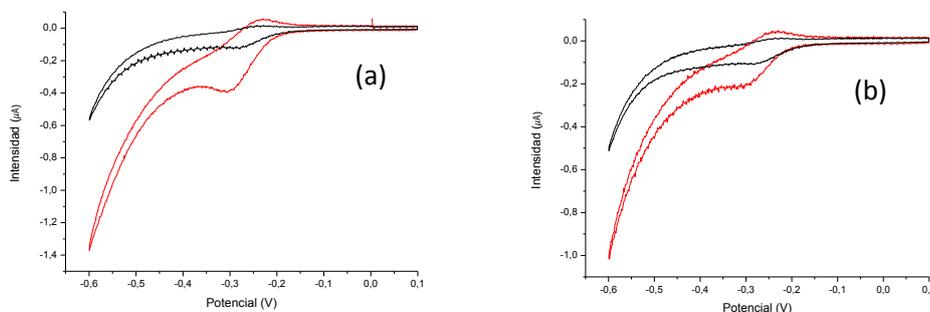


Figura 4.56. Voltamograma en glucosa $2 \cdot 10^{-4}$ M de CPE-C/GOx (rojo) y CPE-TiNP's/GOx (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

Cuando la concentración de glucosa en la disolución aumenta hasta $2 \cdot 10^{-2}$ M (*Figura 4.57*) se observa que en los electrodos modificados los picos de oxidación y reducción se desplazan a potenciales positivos y disminuyen las intensidades de los picos de oxidación y reducción. El comportamiento es similar en todos los ciclos. Por tanto podemos concluir que, una vez más, las diferencias entre los electrodos modificados y sin modificar son menores

cuando se incrementa la concentración de analito en la disolución. Esto podría implicar que las nanopartículas tienen un efecto electrocatalítico especialmente visible para concentraciones bajas de analito.

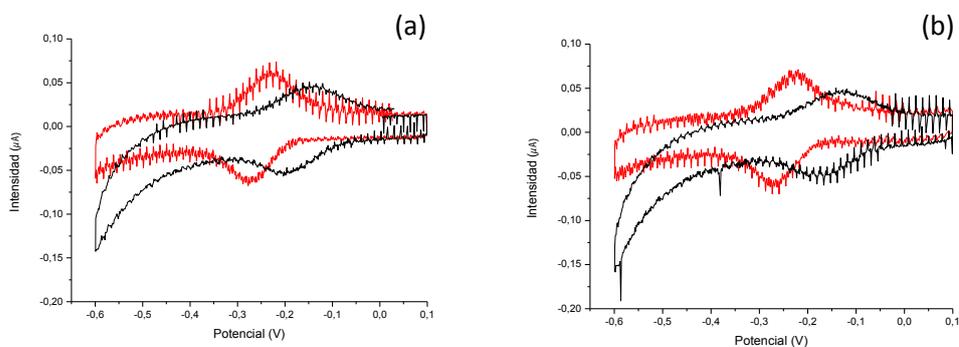


Figura 4.57. Voltamograma en glucosa $2 \cdot 10^{-2}$ M de CPE-C (rojo) y CPE-TiNP's (negro) para: (a) primer ciclo, (b) quinto ciclo.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

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

- ❖ Los electrodos fabricados a partir de pasta de carbono han demostrado tener un buen comportamiento en cuanto a la detección de antioxidantes y azúcares, por lo que se comprueba que como ya se conocía son una buena herramienta de análisis.
- ❖ El uso de los sensores modificados con nanopartículas de Titanio aporta una clara mejora de la intensidad de la señal respecto a los sensores de carbono en la detección de antioxidantes, especialmente a concentraciones menores, donde se observa la mayor diferencia entre las señales de ambos electrodos.
- ❖ La modificación con nanopartículas tiene un efecto beneficioso en cuanto a la reversibilidad de los picos asociados a la oxidación-reducción de catecol consiguiéndose una aproximación mejor con la diferencia de potencial a la ecuación de Nernst.
- ❖ Los límites de detección calculados para los CPE-TiNP's son inferiores en todos los casos a los calculados para los CPE-C, por lo que se comprueba que existe un comportamiento mejorado de los sensores modificados con nanopartículas de titanio para la detección de antioxidantes. En todos los casos se obtienen límites de detección muy bajos comparados con otros sensores típicos utilizados en este campo siendo incluso más bajos que los obtenidos con biosensores.
- ❖ El efecto de dimerización que se observa especialmente para alta concentración de antioxidantes es menos acusado en los sensores CPE-TiNP's, por lo que los picos de interés, referentes a la oxidación y reducción del analito, son mayores y están más diferenciados. Este fenómeno de dimerización no se observa cuando se trabaja con biosensores, por lo que únicamente se advierte un pico de oxidación y otro de reducción.
- ❖ El comportamiento de los sensores modificados con nanopartículas es similar al de los biosensores utilizados para detectar antioxidantes cuando se trabaja con concentraciones altas (10^{-3} M), observándose una mejor respuesta de los sensores sin enzima a las menores concentraciones (10^{-5} M).

- ❖ Para los dos tipos de sensores (CPE-C y CPE-TiNP's) y en ambos antioxidantes (catecol e hidroquinona) el mecanismo cinético que controla el proceso es el de difusión.
- ❖ Los sensores fabricados con pasta de carbono tienen la capacidad de discriminar dos isómeros en una mezcla de ambos, siendo los picos más intensos y mejor diferenciados los de los electrodos modificados, CPE-TiNP's.
- ❖ El estudio del efecto del pH presenta una mejora en las características del voltamograma cuando se trabaja en un medio ácido que si se aumenta la basicidad de la disolución, ya que a mayor pH se produce mayor dimerización, por lo que los picos redox se muestran menos definidos y con menor intensidad.
- ❖ Los sensores de pasta de carbono presentan una buena repetibilidad, ya que pueden volver a reutilizarse para medir diferentes analitos, limpiando previamente la superficie de contacto de la pasta de carbono con la disolución.
- ❖ La reproducibilidad de los sensores CPE-TiNP's es mejor que la de los CPE-C, teniendo en cuenta que los coeficientes de variación en su respuesta electroquímica en KCl son menores a los detectados en el caso de los sensores sin nanopartículas.
- ❖ Los biosensores de glucosa oxidasa modificados con nanopartículas de titanio son adecuados para la detección de glucosa siendo especialmente recomendables para bajas concentraciones.
- ❖ En general el efecto beneficioso de las nanopartículas de titanio en sensores y biosensores es más visible a escala más reducida, esto es en la detección de bajas concentraciones de analito, lo que es lógico teniendo en cuenta su carácter nanométrico.

Por último se ha decidido plantear posibles líneas futuras de investigación de acuerdo con los resultados que se han obtenido con este estudio. Éstas se resumen en los siguientes puntos:

- ❖ Aplicar estos sensores fabricados a partir de pasta de carbono modificados a la medición directa de mostos y vinos, creando de esta forma una lengua (bio)electrónica que sea capaz de discriminar diferentes variedades de mostos acorde a su contenido en polifenoles y azúcares.

- ❖ Utilizar los CPE-TiNP's para realizar estudios de otros polifenoles y azúcares diferentes que puedan resultar de interés así como a otros componentes de diferente naturaleza presentes en los mostos y vinos, como pueden ser los ácidos.
- ❖ Siguiendo esta misma línea de investigación, utilizar nanopartículas de otros metales diferentes, como pueden ser de níquel, cerio u oro para realizar detecciones de los mismos componentes y así obtener una red de sensores que sean capaces de discriminar polifenoles y azúcares en mostos o en otros productos alimenticios.
- ❖ Trabajar con disoluciones todavía más diluidas de antioxidantes y azúcares a las usadas en esta investigación con objeto de delimitar el rango de sensibilidad de estos sensores y así determinar los rangos de concentraciones óptimos en los pueden ser utilizados estos (bio)sensores.
- ❖ Utilización de otras enzimas como lacasa y fructosa en electrodos de grafito para poderlos utilizar en una red mixta de sensores y biosensores de grafito y de grafito modificados con titanio.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hulanicki, A., Głab, S and Ingman, F., (1991), “Chemical Sensors definitions and classification”, *Pure&App/Chern.*, Vol. 63, pp 1247-1250.
2. Salvador Alegret, Manel del Valle, Arben Merkoçi, (2004) “Sensores electroquímicos”, *Universitat Autònoma de Barcelona*, pp 13-21.
3. Flores, D.A., Sandoval, J., Valdivia B. and Aguilar, C.N., (2010), “Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos”, *Investigación y Ciencia*, Vol. 18, N. 40, pp. 20-25.
4. Sochor, J., Dobes, J., Krystofova, O., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., Pohanka, M., Jurikova, T., Zitkz, O., Adam, V., Kledjus, B. and Kizek, R., (2013), “Electrochemistry as a Tool for Studying Antioxidant Properties”, *Int. J. Electrochem. Sci.*, Vol. 8, pp. 8464 – 8489.
5. Richard G. Compton, Craig E. Banks, (2011), “Understanding Voltammetry”, *London Imperial College*, 2ª edición, pp 107-126.
6. Cabaj, J. and Sołoducho, J., (2014), “Nano-Sized Elements in Electrochemical Biosensors”, *Materials Sciences and Applications*, Vol. 5, pp 752-766.
7. Medina-Plaza, C., García-Cabezón, C., García-Hernández, C., Bramorski, C., Blanco-Val, Y., Martín-Pedrosa, F., Kawai, T., De Saja, J.A., Rodríguez-Méndez, M.L., (2015), “Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir-Blodgett films based on functionalized nanoparticles”, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 853, pp 572-578.
8. Ziyatdinova, G., Galandova, J. and Labuda, J., (2008), “Impedimetric Nanostructured Disposable DNA-based Biosensors for the Detection of Deep DNA Damage and Effect of Antioxidants”, *Int. J. Electrochem. Sci.*, Vol. 3, pp 223-235.
9. Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W. and Pilloton R., (2010), “A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine”, *Journal of Molecular Catalysis B*, Vol. 64, pp 189-194.
10. Apetrei, C., Apetrei, I.M., De Saja, J.A. and Rodríguez-Méndez, M.L., (2011), “Carbon Paste Electrodes Made from Different Carbonaceous Materials: Application in the Study of Antioxidants”, *Sensors*, Vol. 11, pp 1328-1344.
11. Carralero, V., Mena, M.L., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P. and Pingarrón, J.M., (2005), “Development of a tyrosinase biosensor based on

gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines”, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 528, pp 1-8.

12. C. Apetrei, C., Rodríguez-Méndez, M.L. and De Saja, J.A., (2005), “Modified carbon paste electrodes for discrimination of vegetable oils”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 111-112, pp 403-409.

13. Apetrei, I.M., Rodríguez-Méndez, M.L., Apetrei, C. and De Saja, J.A., (2013), “Enzyme sensor based on carbon nanotubes/cobalt (II) phthalocyanine and tyrosinase used in pharmaceutical analysis”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 177, pp 138-144.

14. Sharpe, E., Bradley, R., Frasco, T., Marsh, D.J.A. and Andreescu, S., (2014), “Metal oxide based multisensor array and portable database for field analysis of antioxidants”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 193, pp 552-562.

15. Medina-Plaza, C., Revilla, G., Muñoz, R., Fernández-Escudero, J.A., Barjas, E., Medrano, G., de Saja, J.A. and Rodríguez-Méndez, M.L., (2013), “Electronic tongue formed by sensors and biosensors containing phthalocyanines as electron mediators. Application to the analysis of red grapes”, *J. Porphyris Phthalocyanines*, Vol. 17, pp 1-11.

16. Lin, X., Ni, Y. and Kokot, S., (2013), “Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants”, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 765, pp 54-62.

17. Huang, J., Zhang, X., Liu, S., Lin, Q., He, X., Xing, X., Lian, W. and Tang, D., (2011), “Development of molecularly imprinted electrochemical sensor with titanium oxide and gold nanomaterials enhanced technique for determination of 4-nonylphenol”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 152, pp 292-298.

18. Yang, J., Lee, J. and Choi, S., (2009), “Tyrosinase-Immobilized Biosensor Based on the Functionalized Hydroxyl Group-MWNT and Detection of Phenolic Compounds in Red Wines”, *Journal of Sensors*, pp 1-10.

19. Huang, Y., Zhang, W., Xiao, H. and Li, G., (2005), “An electrochemical investigation of glucose oxidase at a CdS nanoparticles modified electrode”, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 21, pp 817-821.

20. Robledo, S.N., Tesio, A.Y., Ceballos, C.D., Zon, M.A. and Fernández, H., (2014), “Electrochemical ultra-micro sensors for the determination of synthetic and natural antioxidants in edible vegetable oils”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 192, pp 467-473.

21. Da Silva, P.S., Gasparini, B.C., Magosso H.A. and Spincelli, A., (2013), “Electrochemical behaviour of hydroquinone and catechol at a silesquioxane-modified carbon paste electrode”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 24, N. 4, pp 1-7.

22. Zhang, Y., Xiao, S., Xie, J., Yang, Z. and Pang, P., (2014), “Simultaneous electrochemical determination of catechol and hydroquinone based on graphene-TiO₂ nanocomposite modified glassy carbon electrode”, *Sensors and Actuators B*, Vol. 204, pp 102-108.

23. Šmejkalová, D., Conte, P. and Piccolo, A., (2007), “Structural Characterization of Isomeric Dimers from the Oxidative Oligomerization of Catechol with a Biomimetic Catalyst”, *Biomacromolecules*, Vol. 8, pp 737-743.