



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Mecánica

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE SENSORES
POLIMÉRICOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO
PARA LA DETECCIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA
INDUSTRIA DE LA ALIMENTACIÓN**

Autor:

Castrillejo García, Óscar

Tutor:

García Cabezón, Cristina

**Departamento de Ciencia de los
Materiales e Ingeniería Metalúrgica**

Valladolid, Julio 2015.

- AGRADECIMIENTOS -

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora, Cristina, toda la dedicación y esfuerzo que ha puesto ayudándome en la realización de este trabajo. No solo ha sido una gran profesora que me ha enseñado y guiado, sino también una gran persona que ha tenido paciencia conmigo y se ha preocupado por mí. Muchas gracias.

Además, quiero agradecer al resto de personas de los departamentos de Ciencia de Materiales y de Química Inorgánica por haberme prestado su esfuerzo, en especial a Celia y a Fernando.

Y por último agradezco a mis compañeras Elena y Laura, por hacer las horas de trabajo en el laboratorio más amenas.

A todos, GRACIAS.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Introducción	7
1.2. Justificación	7
1.3. Objetivos	8
1.4. Descripción del proyecto	9
2. ASPECTOS GENERALES Y FUNDAMENTOS TEÓRICOS	11
2.1. Sensores químicos	11
2.2.1. Concepto de sensor químico	11
2.2.2. Biosensores	13
2.2. Polímeros conductores	17
2.2.1. Dopantes	19
2.2.2. Pirrol	21
2.3. Técnicas electroquímicas	23
2.3.1. Cronopotenciometría	26
2.3.2. Cronoamperimetría	27
2.3.3. Voltametría cíclica	29
2.4 Nanopartículas de oro	30
2.5. Antioxidantes y azúcares en uvas y mostos	32
2.5.1. Antioxidantes	33
2.5.2. Azúcares	35
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	37
3.1. Introducción	37
3.2. Preparación de sensores	37

3.3. Preparación de las disoluciones	40
3.4. Preparación de la celda	42
3.5. Análisis de antioxidantes	48
3.6. Preparación de biosensores	49
3.7. Medida de mostos	51
3.8. Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1. Estudio de viabilidad, preparación y optimización de sensores poliméricos	57
4.1.1. Técnicas de deposición utiliza	58
4.1.1.1. Cronoamperimetría	58
4.1.1.2. Cronopotenciometría	60
4.1.2. Tiempo de deposición	61
4.1.3. Dopantes	64
4.1.3.1. Dopaje con H ₂ SO ₄	65
4.1.3.2. Dopaje con DBSA	66
4.1.4. Técnicas de adición de nanopartículas	68
4.1.5. Concentración de nanopartículas	72
4.1.6. Sustratos	74
4.1.7. Conclusiones del estudio de viabilidad	74
4.2. Detección de antioxidantes	76
4.2.1. Caracterización electroquímica	76
4.2.1.1. Voltametría cíclica en Cloruro Potásico	76
4.2.1.2. Voltametría cíclica en Buffer Fosfato	82
4.2.1.3. Estudio cinético en Buffer Fosfato	84

4.2.2. Detección de catecol	87
4.2.3. Detección de ácido cafeico	100
4.3. Biosensores de pirrol modificados con nanopartículas de oro	110
4.3.1. Biosensores con tirosinasa	110
4.3.2. Biosensores con glucosa oxidasa	113
4.4. Red de sensores	118
4.4.1. Detección de mostos con sensores sin enzimas	120
4.4.2. Detección de mostos con biosensores modificados con tirosinasa	125
4.4.3. Detección de mostos con biosensores modificados con glucosa oxidasa	127
4.4.4. Tratamiento de datos	130
5. CONCLUSIONES	141
6. BIBLIOGRAFÍA	145

1.1 INTRODUCCIÓN

En este primer capítulo se describirán los motivos que justifican la realización de este trabajo de investigación sobre los sensores poliméricos, que continúa en la línea de pasados estudios acerca de este tema. A continuación se describen los objetivos que se han pretendido conseguir durante el desarrollo de este trabajo. Por último, se describirá brevemente la estructura general del presente trabajo con sus diferentes apartados.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Escuela de Ingenierías Industriales de Valladolid. De manera general, este departamento mantiene una línea de investigación en la que se trabaja en la preparación y caracterización de películas poliméricas y su aplicación como sensores en líquidos; y líneas de investigación aplicadas en las que se diseñan distintos tipos de sensores, creando redes para el análisis y control de bebidas y alimentos. Todo esto se consigue gracias a la colaboración del Departamento de Química Física y Química Inorgánica, en el que tienen líneas de investigación similares, y colabora en la fabricación de los distintos sensores.

Estos equipos de investigación llevan dedicando varios años de esfuerzo al desarrollo de sensores y redes de sensores para el análisis de vinos. Estas investigaciones, en colaboración con diferentes bodegas, han permitido discriminar y clasificar vinos según la variedad del tipo de uva, tipo de crianza, añada, etc. En el presente trabajo, dichas investigaciones se han orientado a la construcción de una red de biosensores que, acoplada a un software de reconocimiento de patrones, sea capaz de analizar y diferenciar mostos.

Por lo tanto, este trabajo se enmarca en la necesidad de desarrollar sistemas que de forma sencilla, rápida y económica permitan conocer la calidad de la uva, así como establecer el momento óptimo para la vendimia lo cual depende en gran medida tanto de la madurez fenólica, como del grado de azúcar. Este trabajo trata, de forma preliminar, un primer sistema capaz de discriminar mostos. Para esto, se desarrollarán diferentes sensores capaces de detectar fenoles y azúcares, y a continuación la red de sensores se utilizará para analizar mostos proporcionados por la Bodega Cooperativa de Cigales.

1.3 OBJETIVOS

De una forma general, el objetivo de este trabajo es desarrollar una red de sensores poliméricos capaz de discriminar mostos de distintas variedades de uvas, basándose en su diferente contenido de antioxidantes y azúcares.

Para llegar a este objetivo general, se ha marcado una serie de objetivos más específicos:

- a) En primer lugar, ser capaces de construir sensores poliméricos modificados con nanopartículas de oro, de modo que den a los sensores propiedades electroquímicas y electrocatalíticas que mejoren las propiedades de los mismos y los conviertan en un nuevo material sensible para nuestra red de sensores.
- b) Estudiar la capacidad de estos sensores para detectar la presencia de polifenoles y azúcares, los cuales se pueden encontrar en mostos y vinos en muy bajas concentraciones. Para ello se utilizarán técnicas voltamétricas que permitirán conocer la respuesta característica de cada distinto tipo de sensor según el analito en el que esté sumergido.

Se pretende realizar un estudio cuantitativo mediante límites de detección

- c) Desarrollar biosensores formados por glucosa oxidasa y tirosinasa para dotar a dichos sensores de mayor selectividad de azúcares y fenoles y con respuesta diferente para conseguir nuevos sensores para nuestra red.
- d) Construir una red de sensores formada por los sensores poliméricos y los biosensores, y estudiar su capacidad de discriminación frente a mostos de distintas variedades de uva.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Después de mostrar los objetivos y la justificación de la realización de este trabajo, se explican de forma más detallada los aspectos teóricos básicos necesarios para entender el desarrollo de este trabajo. Se incluyen los conceptos de sensor químico, electrodos poliméricos, biosensores, técnicas electroquímicas, antioxidantes, etc. En el siguiente capítulo se explica la metodología experimental que se ha seguido en la realización del trabajo en los laboratorios, ambos departamentos, de Ciencia de Materiales y de Química Inorgánica. En primer lugar se describe la construcción de los sensores poliméricos, y cómo se realizan las medidas en distintos analitos. También se hace una descripción de la fabricación de biosensores con enzimas, y el procedimiento estadístico seguido para evaluar los resultados. Por último se muestran los resultados obtenidos, tanto del estudio de viabilidad de los sensores, como los del análisis de mostos, y finalmente se concluye discutiendo las conclusiones a las que se llega con el trabajo realizado y se proponen líneas de futuro.

2.1 SENSORES QUÍMICOS

Los sensores químicos tienen hoy en día un interés renovado debido a las necesidades actuales de disponer de más y mejor información analítica en unas condiciones no convencionales. La combinación de microelectrónica e ingeniería química ha supuesto el desarrollo de este tipo de sensores, hasta ser ampliamente utilizados en aplicaciones tales como control de procesos, seguridad, higiene industrial, control de la calidad de productos, control de emisiones, diagnósticos clínicos, alarmas de seguridad en el hogar, etc. Los sensores químicos cuentan con varias ventajas que harán aún más amplio su campo de desarrollo, éstas son sus pequeñas dimensiones, bajo coste, utilización sencilla y generación de la información en tiempo real [1].

2.1.1 CONCEPTO DE SENSOR QUÍMICO

Mediante una definición de carácter general, los sensores químicos pueden ser descritos como unos dispositivos autónomos capaces de proveer información analítica en tiempo real acerca de una muestra de prueba. Como información química se entiende en este caso la concentración de una o más especies químicas en la muestra. Estas especies a estudiar son normalmente llamadas analitos. Además de especies químicas, existen sensores capaces de detectar virus y microorganismos mediante biocompuestos específicos, como su ácido nucleico o los componentes de la membrana. Los sensores químicos no han de ser confundidos con los sensores físicos, siendo estos últimos dispositivos encargados de medir magnitudes físicas, como la fuerza, presión, temperatura y velocidad, entre muchas otras.

En funcionamiento, un sensor químico realiza dos distintas funciones: reconocimiento y transducción, como se muestra en el ejemplo de la *figura 1*. En primer lugar, el analito interactúa de un modo más o menos selectivo con el elemento sensor (o elemento de reconocimiento), que muestra cierta afinidad hacia el analito. El elemento sensor ha de estar compuesto por un material capaz de interactuar con el analito.

El transductor se encarga de transformar o convertir la energía de entrada, en otra diferente a la salida. En un sensor químico, las funciones de reconocimiento y transducción están integradas en el mismo dispositivo [2].

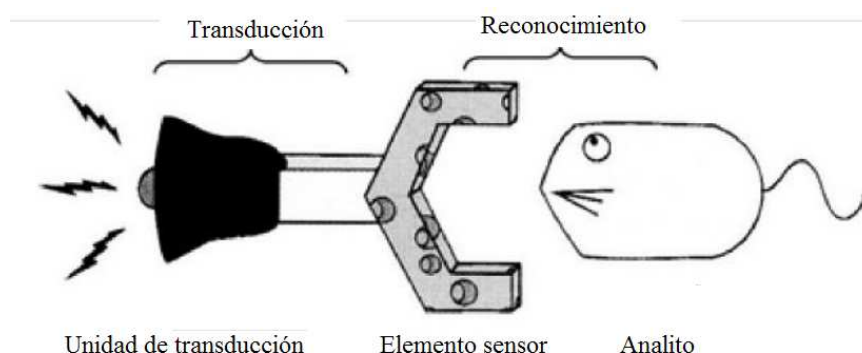


Figura 1: Esquema de un sensor químico. Un sensor es el conjunto de una unidad de recepción y de transducción.

Considerando el tema de la fabricación de los sensores, en este trabajo se destaca la técnica de polimerización electroquímica para la preparación de los sensores poliméricos. La polimerización electroquímica presenta una serie de ventajas frente a los métodos de polimerización químicos. Entre esas ventajas cabe citar que el producto de reacción es una película electroactiva con una conductividad elevada que se fija a la superficie del electrodo y cuyas propiedades pueden controlarse directamente en el transcurso de su preparación, incluyendo el grosor y la masa de la misma.

2.1.2 BIOSENSORES:

Los biosensores son sensores químicos cuyo sistema de reconocimiento está basado en mecanismos bioquímicos o biológicos.

El desarrollo de los biosensores es un campo relativamente nuevo, siendo el primer biosensor un analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962, consistiendo en una enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo para oxígeno. Posteriormente se desarrollaron diferentes sensores enzimáticos especializados para distintas sustancias.

Los biosensores son usados, normalmente, en la determinación de concentraciones de sustancias y otros parámetros de interés biológico, representando un campo en rápida expansión, con un gran uso en la industria de la salud, pero también en la del medio ambiente y en la alimentaria como es el caso de este trabajo.

Es frecuente el uso de la inmovilización de moléculas biológicas, por adsorción física directa, para el desarrollo de los biosensores. Las enzimas inmovilizadas tienen condiciones ventajosas que las hacen aplicables para estos sistemas, donde la respuesta biológica del sensor es determinada por la membrana biocatalítica, lográndose la conversión del reactivo a producto.

La inmovilización de las enzimas consiste en un proceso en el que se confina la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica. El estudio de este trabajo se centra concretamente en biosensores de tipo amperométrico, utilizados para la medida de la corriente resultante de procesos de oxidación y reducción [3].

Pues bien, las enzimas utilizadas en el desarrollo de los sensores en los que se centra este trabajo son las siguientes:

- Glucosa oxidasa:

La enzima glucosa oxidasa (GOX) es una oxidoreductasa que cataliza la oxidación de la glucosa para formar peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -lactona. En las células contribuye a degradar los azúcares hacia sus metabolitos.

La glucosa oxidasa es una de las enzimas más estudiadas, dado el amplio interés en el desarrollo de un sensor fiable para la medida de glucosa en la industria alimentaria. Así mismo es ampliamente utilizada en la determinación y cuantificación de glucosa en fluidos biológicos, como la sangre y la orina.

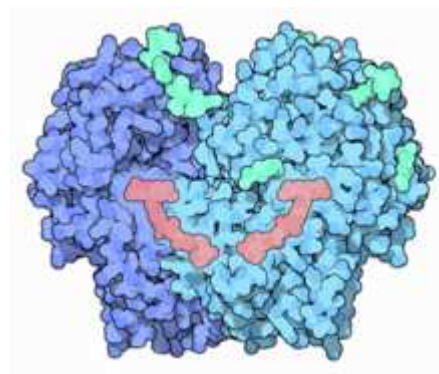


Figura 2: Modelo 3D de la glucosa oxidasa.

En un medio con pH neutro, la glucosa se encuentra disuelta a pH 7, en forma de hemiacetal cíclico, siendo un 63,6% β -D-glucopiranososa y un 36,4% α -D-glucopiranososa. Pues bien, la glucosa oxidasa se une específicamente a la glucosa β y no interacciona con la α , aún así es capaz de oxidar toda la glucosa presente en la disolución ya que el equilibrio entre los anómeros α y β es conducido hacia la forma β según ésta va siendo consumida en la reacción.

La glucosa oxidasa es una proteína dimérica, encargada de catalizar la oxidación de la D-glucosa usando oxígeno molecular para dar lugar a la

formación de D-glucono-1,5-lactona y posteriormente, ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂):



Los biosensores que utilizan esta enzima en el electrodo permiten detectar los niveles de glucosa al llevar un registro de los electrones que pasan a través de la enzima. La enzima se encuentra depositada sobre el electrodo y lo que se mide es la corriente eléctrica generada por la reacción.

La ventaja de utilizar la glucosa oxidasa es que aumenta la selectividad del sensor, es decir, que el sensor se centrará más en detectar los azúcares que haya en la disolución, dándoles más importancia que al resto de elementos presentes la disolución [4].

- Tirosinasa:

La tirosinasa, también llamado monofenol monooxigenasa o catecol oxidasa, es un fenol oxidasa de cobre. Dicho enzima se encarga de catalizar la oxidación de fenoles, concretamente, la oxidación de o-difenoles a o-quinonas, y también la o-hidroxilación de los monofenoles a o-difenoles, de este modo también es utilizada para dar selectividad al sensor.

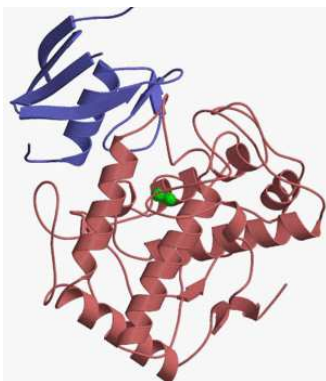


Figura 3: Modelo 3D de la enzima tirosinasa

Se han desarrollado distintos tipos de electrodos amperométricos basados en la inmovilización de la enzima tirosinasa en varios tipos de materiales, como por ejemplo, electrodos de carbono vítreo modificados con polímeros, materiales sol-gel, monocapas autoensambladas en oro, electrodos de Clark, carbono vítreo reticulado, serigrafiado, pasta de carbono y electrodos con otros composites [5].

En este trabajo se hará un estudio del uso del sensor con tirosinasa en disoluciones con catecol y en disoluciones con ácido cafeico. La oxidación de un fenol como es el catecol da lugar a benzoquinona y agua como se muestra en la siguiente reacción:

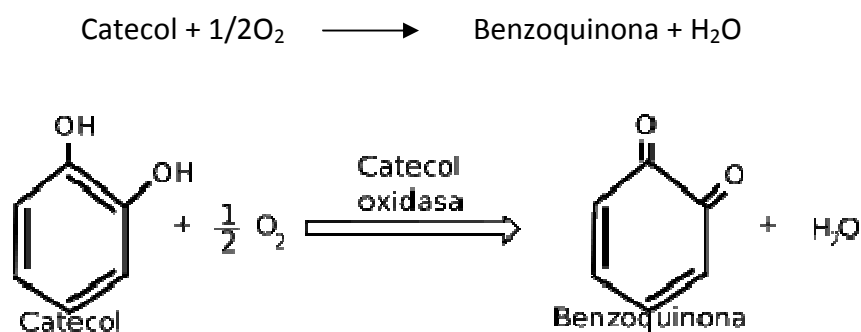


Figura 4: Reacción de oxidación del catecol

Por ello los biosensores de tirosinasa han tenido una amplia aplicación para la determinación de fenoles en medio acuoso, por ejemplo dentro de la industria alimentaria en vinos, té, y agua.

2.2 POLÍMEROS CONDUCTORES:

Como se ha podido observar en el anterior apartado, el campo de los sensores químicos es amplio y abarca diferentes tipos de sensores. Conforme al material en el que se basa el electrodo del sensor, en este trabajo se estudiarán sensores basados en polímeros conductores, concretamente el polipirrol.

Un polímero es la macromolécula resultante de la repetición de unidades monoméricas unidas entre si mediante enlaces covalentes a lo largo de la cadena. Las propiedades físico-químicas y mecánicas del polímero estarán determinadas por la naturaleza del monómero y el tipo de enlace covalente entre ellos.

Normalmente los polímeros han sido considerados como materiales aislantes, que solo podían hacerse conductores o semiconductores cambiando drásticamente su naturaleza química, por ello sus principales aplicaciones en el campo de la electrónica han sido como aislantes o dieléctricos. El descubrimiento en 1977 de la alta conductividad del poliacetileno dopado dio lugar a una serie de investigaciones sobre la síntesis y estudio de polímeros conjugados [6]. De este modo se desarrollaron polímeros conductores que poseen las propiedades electrónicas de los metales y las propiedades mecánicas y de procesamiento propias de los polímeros convencionales.

Los polímeros conductores eléctricos como la polianilina, el polipirrol, etc han sido de un gran interés durante las dos última décadas como una nueva clase de material, gracias a su combinación única de características, tanto electrónicas, ópticas, magnéticas y las ventajas del tratamiento de polímeros. Por ello, el desarrollo de polímeros conductores química y eléctricamente estables ha hecho posible la implementación de dichos polímeros en una gran cantidad de campos, como en el de la protección contra la corrosión, baterías, circuitos impresos, y para el caso de este trabajo, en sensores [7].

Para entender la baja conductividad de los polímeros sin dopar hay que conocer la naturaleza de los enlaces por los que están formados. Los polímeros conductores orgánicos están formados principalmente por átomos de carbono y de hidrógeno, dispuestos en unidades de monómeros repetidos, y en algunos casos estos monómeros puede llevar algún heteroátomo como azufre, oxígeno, o, como en el caso del pirrol, nitrógeno.

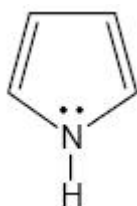


Figura 5: Molécula de pirrol

Este tipo de polímeros utilizan enlaces dobles y sencillos alternos en sus cadenas, que les permiten conducir la electricidad a través del desplazamiento de cargas que pueden atravesar la cadena polimérica. Aunque las estructuras conjugadas de polímeros conductores tienen la propiedad de poseer orbitales electrónicos π extendidos sobre toda la estructura, es decir, los electrones de estos niveles tienen libertad de movimiento, esto no es suficiente para que un polímero pueda conducir la corriente eléctrica. Para ello es necesario provocar una distorsión en su cadena. Esta alteración consiste en extraer electrones (oxidación) o insertar electrones (reducción) en la cadena, mediante un proceso de dopado.

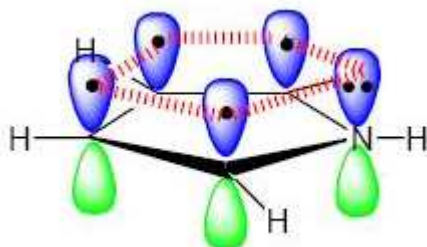


Figura 6: Orbitales π en una molécula de pirrol

2.2.1 DOPANTES:

Aunque clásicamente los polímeros han sido considerados aislantes, pueden adquirir una alta conductividad gracias a la incorporación en su matriz de una pequeña cantidad de dopantes (especies iónicas), obteniéndose materiales con una conductividad típica de semiconductores o metales. El dopado se realiza mediante una oxidación (en el caso del dopado tipo p), o una reducción (en el dopado tipo n) química o electroquímica del polímero. Para mantener la electroneutralidad del material se incorporan dopantes que actúan como contra iones en la matriz polimérica.

El dopado es reversible, mediante la eliminación del dopante (desdopado) se llega a una situación con el polímero con su estructura inicial intacta. El control del grado de dopado abre la posibilidad de preparar una gran variedad de polímeros conductores con distinta conductividad eléctrica.

En los polímeros conductores con unidades monoméricas aromáticas o heteroaromáticas la eliminación de un electrón de la cadena polimérica en su estado neutro da lugar a la aparición de un polarón (radical catión), en este estado al eliminarse un segundo electrón se genera un bipolarón.

En este trabajo se estudiarán tres dopantes diferentes para aumentar la conductividad de la película de polipirrol, el DBSA, el DSA, y el ácido sulfúrico.

Dopantes estudiados:

- DBSA:

Dodecilsulfonato de sodio, su fórmula química es $C_{18}H_{29}NaO_3S$. Sus principales aplicaciones se encuentran de la industria de la limpieza y la

industria alimentaria [8], pero en este caso se utilizará como dopante en la disolución de pirrol, ya que se ha estudiado como el uso de algunas sales de sodio utilizadas como dopantes pueden mejorar la conductividad [9].

- DSA:

Decano sulfonato de sodio, su fórmula química es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$. Al igual que el DBSA, es una sal de sodio utilizada como dopante gracias a que una vez introducida en la matriz de polipirrol, su tamaño molecular ayuda a mejorar más la conductividad de este polímero.

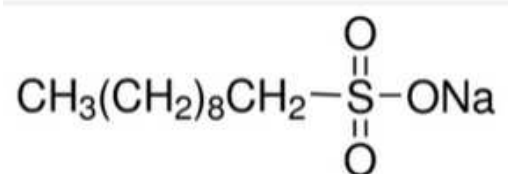


Figura 7: Molécula de DSA

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4):

El dopado del polipirrol puede llevarse a cabo con distintos ácidos a parte del ácido sulfúrico. En este caso el ión sulfato será el contra anión incorporado a la cadena del polipirrol. La conductividad eléctrica del polipirrol dopado con ácido sulfúrico estará en torno a $3,26 \times 10^{-6}$ S/cm, pudiendo variar con la temperatura [7].

Se realizaron ensayos con estos tres distintos dopantes, y estudiando el diferente comportamiento de ellos y su efecto en los sensores de polipirrol, se determinó que el dopante utilizado para posteriores ensayos sobre mostos será el DBSA.

2.2.2 PIRROL

El pirrol es un compuesto orgánico, heterocíclico aromático, formado por un anillo de cinco miembros siguiendo la fórmula C_4H_5N . A temperatura ambiente se presenta como un líquido incoloro con una densidad de 0,97 g/ml. Gradualmente se torna marrón al contacto con el aire, y es ligeramente higroscópico. Tiene una baja solubilidad en agua, en torno al 6%, pero se puede mezclar con la mayoría de disolventes orgánicos [10]. Se comporta como una base muy débil y es susceptible de sufrir sustitución electrófila aromática en las posiciones 2 y 5 del anillo, esta es una de las condiciones que hacen posible su polimerización.

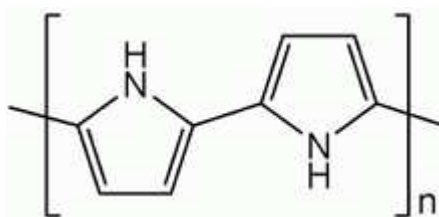


Figura 8: Estructura del polipirrol

El polipirrol es el compuesto resultante de la polimerización del pirrol. El potencial de oxidación del monómero es siempre mayor que el del polímero por lo que tanto la formación del polímero como su oxidación son dos procesos que ocurren en paralelo, y a su vez se produce el dopado, incorporando contraiones en la matriz polimérica. El grado de dopado del Ppy (número de aniones por unidad de monómero) depende tanto de la naturaleza de los aniones como de las condiciones de síntesis. La masa de la película generada es proporcional a la carga usada en el proceso [11].

La oxidación del polipirrol es irreversible, y se produce mediante el acoplamiento oxidativo de las moléculas de monómero, siguiendo el patrón mostrado en la *figura 9*.

En la primera etapa las moléculas del monómero se oxidan dando lugar a cationes radicales con el estado radical deslocalizado sobre el anillo pirrólico. Los cationes radicales dimerizan y se liberan 2 protones. Los dímeros debido a su fuerte conjugación son más propensos a ser oxidados que el monómero. El crecimiento de las cadenas ocurre por adición de los cationes radicales a los oligómeros existentes. La estabilidad de los cationes radicales es un factor importante en la electropolimerización. Los cationes radicales con una estabilidad moderada tienen una selectividad química que favorece el acoplamiento radical en la formación de la película.

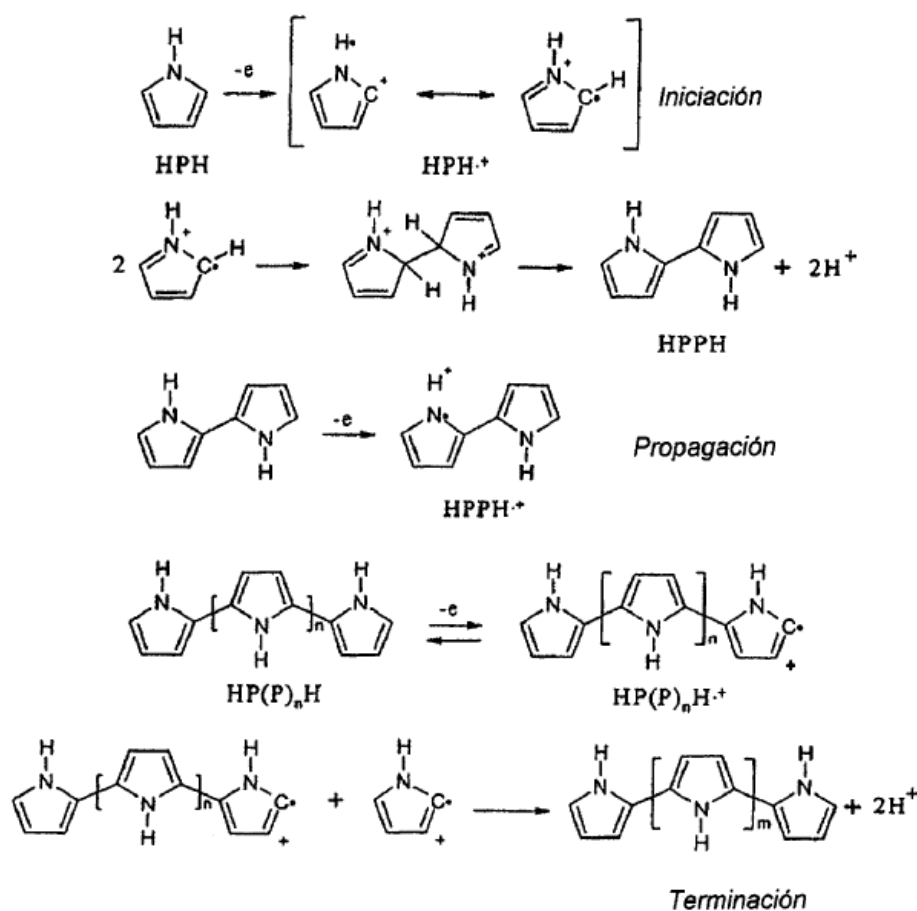


Figura 9: Mecanismo de la polimerización del pirrol para dar lugar a polipirrol.

La naturaleza del electrodo es crucial en la preparación de películas de polipirrol. Ya que estas finas capas se producen mediante un proceso de oxidación, es fundamental que el electrodo no se oxide en competencia con el pirrol. Por esta razón se utilizan ánodos inertes, como por ejemplo de platino, aunque desde un punto de vista más económico también es factible utilizar acero o aluminio [12]. En este trabajo nos planteamos trabajar con un material noble como el platino y a la vez usar acero inoxidable austenítico como sustrato mucho más barato.

El polipirrol se puede obtener directamente en su estado conductor, ya que la polimerización tiene lugar con la presencia de sales oxidantes que actúan como agentes dopantes [11]. Esta es una de las ventajas, con la que, además de poder depositar una película de polipirrol sobre un sustrato de manera estable y pudiendo controlar su crecimiento, hace posible y extendido el uso del polipirrol en la fabricación de sensores.

2.3 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Se hará un breve repaso sobre los fundamentos de las técnicas electroquímicas, comentando los principios de las técnicas que se han empleado para el desarrollo de electrodos modificados mediante electropolimerización de polímeros conductores, que serán las utilizadas en este trabajo para el diseño de la red de sensores.

Todas las técnicas requieren el uso de una celda electroquímica formada por tres electrodos, el de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia, como muestra la *figura 10*. Estos electrodos estarán sumergidos en distintas disoluciones, que serán disoluciones de pirrol si se está depositando la película, o

disoluciones con un analito o con el mosto en el caso de estar ensayando el electrodo ya modificado con la película.

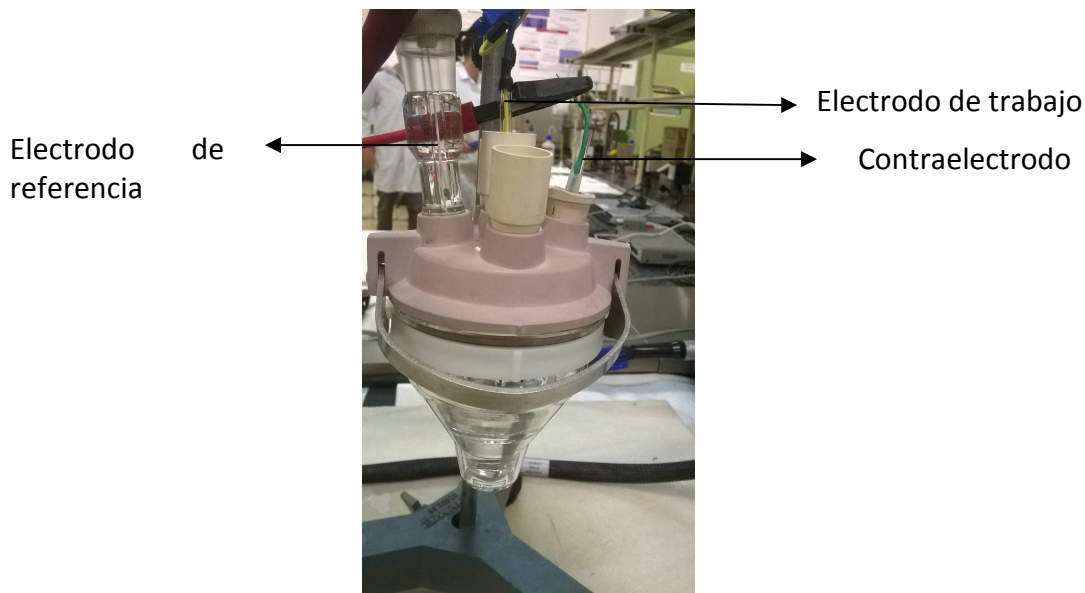


Figura 10: Celda electroquímica con los tres tipos de electrodos usados en este trabajo.

El contraelectrodo está formado por un filamento de platino, y su utilidad es conducir la corriente desde la fuente de la señal a través de la disolución al electrodo de trabajo. El electrodo de referencia (*figura 11*), en este caso de Ag/AgCl, tiene la función de establecer una referencia de potencial para poder medir la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y éste electrodo.



Figura 11: Electrodo de referencia de Ag/AgCl.

En la realización de este trabajo se han utilizado 3 técnicas electroquímicas como se indicó al inicio de este apartado, cronoamperometría, cronopotenciometría y voltametría cíclica para electropolimerizar el pirrol. La cronoamperometría y cronopotenciometría como técnicas de polimerización nos permiten controlar las diferentes etapas de este proceso, como nucleación, formación de película y crecimiento en el tiempo. Con la voltametría cíclica podemos obtener información acerca de los potenciales característicos de los distintos analitos medidos con cada uno de nuestros diferentes sensores.

Los procesos electroquímicos que tienen lugar en la oxidación/reducción de las películas poliméricas se interpretan con el modelo polarón/bipolarón (figura 12), según el cual la oxidación parcial de la cadena polimérica conduce a la formación de un polarón. Si se continúa con la oxidación se puede eliminar un segundo electrón de la cadena polimérica formándose un bipolarón. Durante el primer proceso red-ox, el que ocurre a menor potencial (I), el anión dopante se encuentra atrapado en la matriz polimérica, por lo tanto para mantener la electroneutralidad el polímero intercambia cationes con la disolución. En el segundo proceso red-ox (II) la matriz polimérica intercambia aniones con el medio para mantener la electroneutralidad.

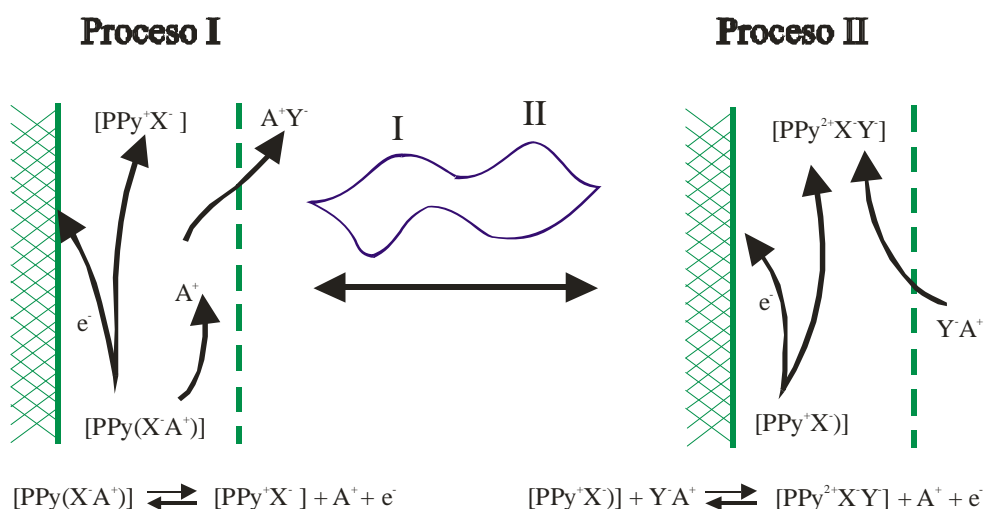


Figura 12: Esquema del modelo polarón/bipolarón.

2.3.1 CRONOPOTENCIOMETRÍA:

La cronopotenciometría es un método electrolítico que consiste en el estudio del comportamiento del potencial de un electrodo indicador con el tiempo. De este modo, al electrodo donde se depositará la película de pirrol (que será el sensor polimérico) le llega una intensidad de corriente eléctrica constante, y se podrá medir la variación del potencial (V) en función del tiempo (t), generando un gráfico que será característico de cada ensayo de cronopotenciometría, como el presentado en la *figura 13*.

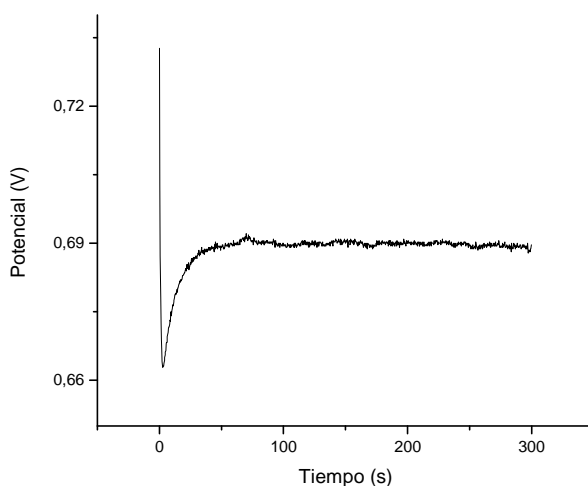


Figura 13: Gráfica de potencial en función del tiempo obtenida en un ensayo de deposición por cronopotenciometría sobre un electrodo de acero inoxidable.

El crecimiento galvanostático permite el control sobre la velocidad de polimerización, por lo tanto tiene la ventaja de poder conseguir una alta reproducibilidad de los experimentos, dado que la velocidad del proceso es siempre constante.

A la vez, el crecimiento galvanostático proporciona una herramienta útil para la caracterización del polímero resultante, simplemente midiendo el potencial del electrodo en función del tiempo. De este modo, el potencial inicial indica el potencial necesario para iniciar el proceso de nucleación, a partir del cual el potencial se mantiene constante, eso indica que la película generada es conductora.

Las propiedades del polímero sintetizado son función del potencial al que está sometido el electrodo de trabajo, por este motivo es necesario controlar las condiciones del experimento (disolución y geometría de la celda), para no permitir la aparición de altos potenciales que pueden dar lugar a la descomposición de los reactivos o de la película que se está generando.

2.3.2 CRONOAMPERIOMETRÍA:

En la cronoamperimetría se aplica un potencial constante, partiendo de un potencial inicial en el que normalmente no puede tener lugar la reducción, hasta un potencial final en el que sí que puede producirse [13]. Cuando se produce este salto de potencial, la doble capa eléctrica debe ajustarse al nuevo potencial, en este momento es cuando se inicia la electropolimerización. De este modo se obtiene la variación de la intensidad en función del tiempo, que será característica de cada electrodeposición.

En la cronoamperimetría al electrodo donde se formará la película (sensor polimérico) le llega una corriente eléctrica que es medida en función del tiempo, generando un gráfico característico, como el presentado en la *figura 14*.

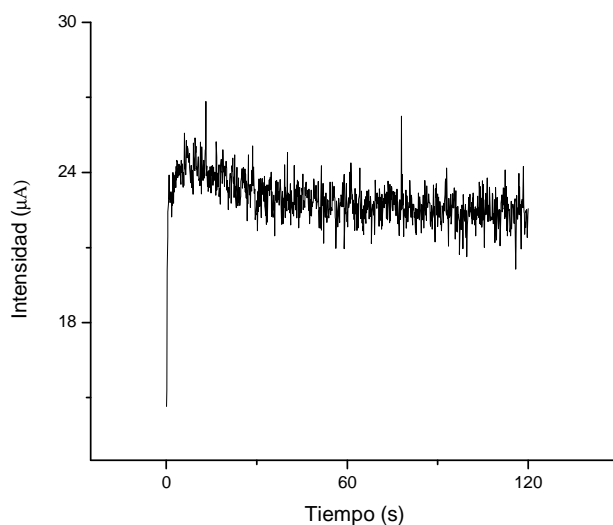


Figura 14: Gráfica de intensidad (en micro amperios) en función del tiempo obtenida en un ensayo de deposición por cronoamperimetría sobre un electrodo de platino.

La carga consumida durante el proceso de polimerización puede ser calculada mediante la integración de la curva registrada en el cronoamperograma (I vs t). Esto permite la determinación del espesor de la película generada. Cuanto mayor es la carga por unidad de superficie mayor es la cantidad de polipirrol depositada sobre el sustrato.

Como contraparte a la cronopotenciometría, esta técnica no permite el control sobre la velocidad de la reacción de polimerización. La principal diferencia entre el crecimiento galvanostático y el ppotenciostático es que en el primero la velocidad de polimerización es siempre constante, sin embargo en el segundo solo lo es si todas las variables de la disolución y del electrodo están estrictamente controladas.

2.3.3 VOLTAMETRÍA CÍCLICA:

En la voltametría cíclica se aplica un potencial que va variando linealmente a partir de un potencial inicial. Esta variación se aplica hasta un potencial límite, a partir del cual se regresa al potencial de partida [13].

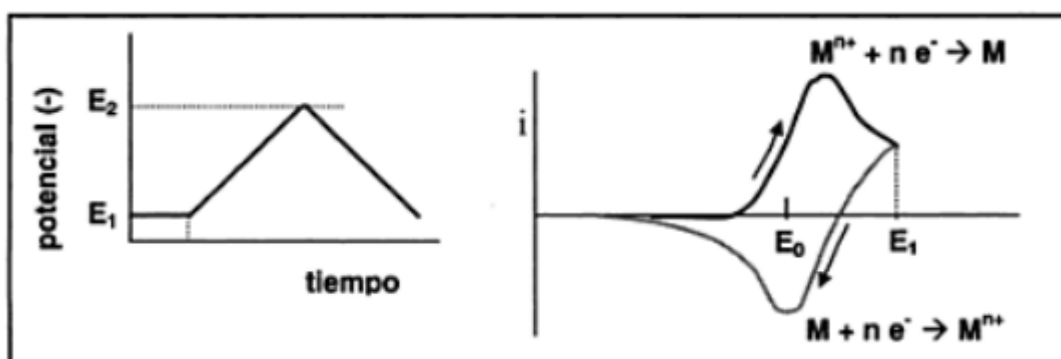


Figura 15: En un experimento de voltametría cíclica, hay una variación lineal del potencial que da lugar a una curva voltamétrica que representa la intensidad en función del potencial. Se producen reacciones de oxidación y de reducción.

De este modo el electrodo ya modificado por la presencia de la película será sometido a dicho potencial variable y puede sufrir un proceso de oxidación y reducción. Los potenciales de oxidación y reducción cambian en función de la disolución donde se encuentre sumergido el sensor.

Aunque con esta técnica también es posible la polimerización y deposición, en este trabajo solo será utilizada para el ensayo de electrodos ya modificados. Se hicieron estudios previos para su uso como técnica de electrodeposición y se obtuvieron películas con peor comportamiento electroquímico que las obtenidas por cronopotenciometría o por cronoamperimetría por lo que fueron descartadas.

2.4 NANOPARTÍCULAS DE ORO:

En los materiales masivos frecuentemente se utilizan unas propiedades características que suelen referirse a la unidad de volumen, suponiendo que dichas propiedades son independientes de la cantidad de volumen del material. Por el contrario, este supuesto deja de ser válido cuando una de las dimensiones se hace tan pequeña que al aumentar la relación superficie/volumen del material, las propiedades cambian respecto al material masivo. Es el caso de, por ejemplo, las partículas de dimensiones muy reducidas (nanopartículas) inmersas en la matriz de otro material [13].

Las nanopartículas de oro (AuNP's) son un material muy atractivo para diversos tipos de sensores, por sus propiedades físicas y químicas únicas, pudiendo mejorar las propiedades de los sensores, mejoras por ejemplo en estabilidad, sensibilidad y especificidad. Estas propiedades dependen en gran parte de su tamaño y forma, que a su vez están determinadas por los procedimientos experimentales por los que se han obtenido. Por ejemplo, se producen cambios considerables en las propiedades ópticas al disminuir el tamaño hasta una dimensión nanométrica, siendo un hecho muy notable en las disoluciones de AuNP's, adquiriendo distinto color en función de su tamaño.



Figura 16: Disolución de la sal de cloruro de oro (III) en agua. Aunque al principio la disolución es amarilla, según se van formando las nanopartículas adquiere un color rojizo.

La preparación de las AuNP's normalmente implica la reducción química de una sal de oro en un medio acuoso u orgánico, en presencia de un agente estabilizante o protector, de modo que al unirse a la superficie de las AuNP's aumente su estabilidad y neutralice las fuerzas electrostáticas. Además, hace que la disolución permanezca estable durante un mayor período de tiempo.

El empleo de AuNP's para la modificación de las superficies de electrodos es aplicable tanto a la fabricación de sensores químicos como de biosensores. En el caso de los sensores químicos, las AuNP's actúan como fase sensora, de forma que catalizan los procesos redox de algunas moléculas de interés, como peróxido de hidrógeno u oxígeno, que participan en reacciones bioquímicas que resultan útiles desde el punto de vista analítico y que pueden ser monitorizadas mediante el uso de técnicas electroquímicas [14].

Dentro del campo de los biosensores, las AuNP's han sido ampliamente usadas en su desarrollo gracias a su excelente capacidad de de inmovilizar biomoléculas. Muchos tipos de biosensores, como los sensores de enzimas, inmunosensores, y sensores de ADN han sido preparados en base a la aplicación de las AuNP's.

Las AuNP's son capaces de controlar el micro medio del electrodo. El uso del oro como nanopartículas tiene ciertas ventajas comparado con usarlo como macroelectrodo. En primer lugar, crean una gran superficie efectiva con un menor coste. Además, con solo una pequeña adición de AuNP's se puede conseguir un incremento en la señal electroquímica.

Recientemente también se ha sintetizado un sensor híbrido de nanopartículas de oro con glucosa oxidasa. Las AuNP's pueden actuar con aceptores de electrones. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa y produce electrones que son transferidos hacia el electrodo a través de las

nanopartículas. Este sistema se utiliza en sensores amperométricos, y una de las aplicaciones ha sido la detección de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos [15].

Por todo esto es interesante el estudio de cómo afectan las AuNP's en el funcionamiento de la red de sensores poliméricos desarrollada en este trabajo, ya que esta red contará tanto como con sensores químicos como bioquímicos.

2.5 ANTIOXIDANTES Y AZÚCARES EN UVAS Y MOSTOS:

El objetivo de la red de sensores desarrollada en este trabajo es analizar y diferenciar mostos en función de su contenido en fenoles y azúcares. Por ese motivo, en este apartado se explicarán los aspectos fundamentales de los antioxidantes y su presencia en las uvas y mostos.

Los antioxidantes son un grupo de sustancias biológicamente activas, capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes en los alimentos son de gran interés debido a que resultan beneficiosos para la salud humana ya que disminuyen los riesgos de ciertas enfermedades cardiovasculares. Esto es así ya que las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan a las células.

Los azúcares son carbohidratos solubles, presentes en muchos alimentos y responsables de su sabor dulce. Pero su principal característica nutricional es su importancia como fuente de energía, ya que es el combustible para la respiración celular. Dentro de los azúcares provenientes de la uva, se pueden desatacar como los de mayor incidencia en el gusto dulce del vino, la glucosa, fructosa, arabinosa y xilosa.

2.5.1 ANTIOXIDANTES:

Los antioxidantes se encuentran entre los analitos que deben ser analizados y controlados para garantizar la calidad de los productos finales en la industria alimentaria. Aunque existen diferentes tipos de antioxidantes, este trabajo se centra en los compuestos fenólicos y polifenólicos, que son antioxidantes que resultan interesantes debido a que inhiben o retrasan los procesos de oxidación bloqueando el inicio de las reacciones de oxidación en cadena [16]. Además este tipo de compuestos tienen un papel importante en la enología, contribuyendo en los atributos sensoriales del mosto o del vino como el color, las propiedades gustativas y su capacidad de envejecimiento. Hay que tener en cuenta que la composición fenólica de los mostos depende en gran medida de las condiciones de maduración.

Aunque la familia de los compuestos fenólicos es responsable del sabor amargo en los vinos, no todos los compuestos fenólicos tienen este sabor. Los antocianos, que son un grupo de fenoles, componen una parte importante de la materia colorante de los vinos jóvenes y no resultan amargos, al menos mientras se encuentren libres.

Como se ha comentado en anteriores apartados de este trabajo, es frecuente el uso de biosensores amperométricos basados en la enzima tirosinasa para la determinación de fenoles debido a su alta estabilidad. La detección y análisis de la reacción por el biosensor puede ser llevada a cabo mediante varios principios, como la detección del oxígeno consumido o la reducción de la o-quinona liberada, ya sea una reducción directa o utilizando un mediador redox como por ejemplo polímeros conductores.

En este trabajo se han elegido dos antioxidantes como objeto de investigación, el catecol y el ácido cafeico.

El catecol, también denominado pirocatecol, 1,2-dihidroxibenceno, 1,2-bencenodiol, o-dihidroxibenceno, es utilizado como antioxidante en diversas industrias, y será objeto de experimentación en este trabajo. Es un compuesto orgánico cuya fórmula química es $C_6H_4(OH)_2$. Las uvas y los vinos son ricos en compuestos funcionalizados que contienen el grupo catecol, estos compuestos imparten la actividad antioxidante.



Figura 17: modelos de la estructura de la molécula de catecol.

El catecol se produce mediante la reducción de la benzoquinona (figura 15). Es un proceso reversible, por ello la oxidación del catecol puede ser analizada mediante los sensores con la enzima tirosinasa.

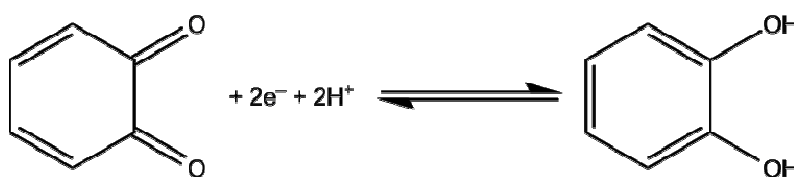


Figura 18: Proceso de reducción de la benzoquinona (izquierda) en catecol (derecha)

Otro antioxidante polifenólico que se tratará es el ácido cafeico, un antioxidante que también tiene aplicación en la industria farmacéutica dado a que presenta actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria.

El ácido cafeico es un compuesto orgánico de fórmula química $C_9H_8O_4$. Tiene grupos funcionales fenólicos y acrílicos. Puede ser encontrado en las plantas ya que es una pieza clave en la biosíntesis de la lignina, uno de los principales materiales en los tejidos vegetales.

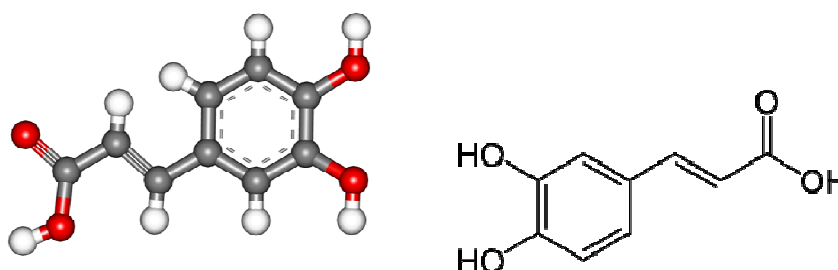


Figura 19: modelos de la estructura de la molécula del ácido cafeico.

2.5.2 AZÚCARES:

Los azúcares son uno de los principales compuestos de los mostos, aunque su concentración varía según la madurez de la uva. Una vez que la uva está madura, su concentración de azúcares es elevada, de la cual el 99% son hexosas y el 1% restante pentosas. Las hexosas, divididas en glucosa y fructosa, son ambas reductoras, y el sabor dulce del vino depende en gran medida de la proporción en las que estén presentes.

En este trabajo la glucosa ha sido analizada en los mostos mediante técnicas electroquímicas utilizando electrodos enzimáticos con glucosa oxidasa.

3.1 INTRODUCCIÓN:

Este capítulo trata sobre las metodologías y condiciones experimentales implementadas durante el desarrollo de una red de sensores poliméricos destinada a la detección de antioxidantes, que implican desde la síntesis de materiales electroactivos, pasando por la fabricación y estudio electroquímico de los sensores, hasta el ensayo de esta red de sensores en los mostos. Como mejora a la red de sensores poliméricos se expondrán las estrategias llevadas a cabo para la introducción de nanopartículas de oro y enzimas en dichos sensores.

3.2 PREPARACIÓN DE LOS SENSORES:

- Preparación del sustrato

Los sensores se han preparado sobre superficies de distintos materiales, tanto en un sustrato de platino como de acero inoxidable, consistiendo el electrodo en conjunto en una estructura tubular.

Para preparar los sensores, se parte un hilo de platino de 1 mm de diámetro en trozos de una longitud en torno a 10mm. Posteriormente, cada uno de estos fragmentos de Pt se une a un hilo de cobre de aproximadamente 130 mm de longitud, soldándolos mediante una pequeña gota de estaño. Para el caso de los sensores de acero inoxidable, se corta directamente un hilo de acero de 140mm, sin necesidad de soldarlo a un hilo de cobre.

El hilo preparado se introduce en el interior de un tubo de vidrio de 100mm de longitud y 2mm de diámetro interno. Para preparar estos tubos de vidrio partimos de un tubo de gran longitud, que se corta en el tamaño deseado, y se lijan los extremos.

Luego, para que el hilo de acero o de platino quede fijo en el interior del tubo, se prepara una mezcla 1:1 de Nural21 A y B que actuará como cementante. Se introduce el hilo de platino-cobre o acero en el tubo de vidrio de tal manera que quede centrado y se va metiendo la mezcla de Nural en el tubo hasta que el tubo quede sellado. De esta forma se impide que la disolución donde se introduzca el sensor entre en contacto con el resto del hilo, así se consigue que el polipirrol se deposite solo en la superficie circular del extremo del hilo. Una vez hecho esto se deja secar la resina en estufa durante 5 horas a 70°C.



Figura 20: Electrodo con Nural sellando el extremo del tubo (derecha). El electrodo de platino (superior) está soldado a un cable de cobre mientras que el electrodo inferior está constituido por un hilo de acero inoxidable.

Cuando la resina queda bien sólida y dura, la superficie se lija con un paño de 320 de tamaño de grano, para eliminar en primer lugar la mezcla de Nural sobrante hasta que el hilo de Pt o acero alcanza la superficie. Posteriormente se realizan una serie de pulidos con paños de carbono/silicio de diferente tamaño (600, 1000 y 4000) para que la superficie donde se deposite el polipirrol quede libre de imperfecciones.



Figura 21: Pulidora utilizada en este trabajo. Permite regular la velocidad de giro del paño.

El último pulido se realiza utilizando una suspensión de sílice. Estos electrodos ya preparados se limpian por inmersión parcial en agua desionizada en un baño de ultrasonidos durante unos minutos.

- Síntesis de polímeros conductores:

Los sensores se generan por electropolimerización con un potencióstato/galvanostato modelo PARSTAT 2273 (*figura 22*) en una celda de 3 electrodos, formada por el electrodo de trabajo de Pt o de acero inoxidable descrito en el apartado anterior, un contraelectrodo de hilo de Pt de área 1 mm^2 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3M. En esta celda se ha de añadir la disolución con la que se quiere trabajar, que en este caso dicha disolución ha de contener cierta concentración de pirrol para su deposición sobre los electrodos.



Figura 22: Uno de los potenciostatos del laboratorio de química inorgánica de la Escuela de Ingenierías Industriales de Valladolid.

3.3 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES:

Se prepararán dos disoluciones distintas:

-Disolución de pirrol: esta disolución contendrá una concentración de pirrol, de modo que sea posible su polimerización y deposición en el electrodo de trabajo, y una concentración del dopante que haga que la película de polipirrol depositada tenga suficiente conductividad.

Preparación:

Se utilizará como dopante el DBSA. Por ello se preparará primero la disolución con DBSA 0,1M.

Se coloca un vaso de precipitados de 50ml limpio en la microbalanza. Con una espátula se añaden 1,7424g de DBSA. A continuación se añaden 40ml de agua desionizada en el vaso de precipitados con el DBSA. El DSBA es difícil de disolver en agua, por lo que se dejará el vaso de precipitados en un agitador por ultrasonidos hasta que esté completamente disuelto.

A continuación, con una micropipeta se añaden 0,750ml de pirrol en un matraz de 50ml, y en este mismo matraz se añade la disolución de DBSA previamente preparada. Posteriormente se enrasa con agua desionizada hasta los 50ml, de esta forma se obtiene una disolución de pirrol 0,2M y DBSA 0,1M.

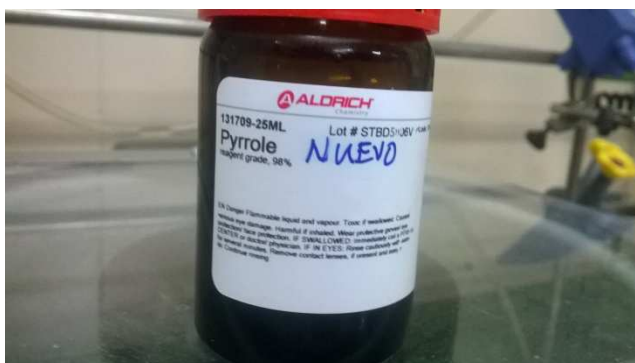


Figura 23: Frasco de 25 mL de pirrol al 98%, marca ALDRICH.

Hay que tener en cuenta que esta disolución ha de ser utilizada en un intervalo de tiempo próximo a su preparación, ya que con el tiempo se oxida, adquiriendo un tono más oscuro, y perdiendo entonces su utilidad para la preparación de sensores.

-Disolución de cloruro de oro: esta disolución contendrá una cantidad de oro necesaria para la adición de nanopartículas de oro a la matriz del polipirrol durante la electrodeposición.

De esta disolución solo se prepararán 10ml, con una molaridad de 10^{-3} M. Se debe ser muy cuidadoso con la preparación de esta disolución, ya que al pesar el soluto, cloruro de oro (III), en la microbalanza puede absorber humedad de modo que la balanza indique un peso que no sea el correcto.

Una vez preparados los 10ml de esta disolución, se echan en una probeta, y se añaden otros 10ml de una disolución de pirrol 0,4M y DBSA 0,2M, para que de esta forma al diluirse a la mitad, quede una disolución de 20ml con una concentración de pirrol de 0,2M y DBSA 0,1M. Así es posible comparar el efecto de una disolución en la que intervienen las nanopartículas de oro con otra en la que no están presentes, teniendo en ambas la misma concentración de dopante y pirrol.

Estas disoluciones son las que se colocarán en la celda electroquímica para los distintos ensayos de deposición.

3.4 PREPARACIÓN DE LA CELDA:

Una vez se tienen las disoluciones preparadas, hay que preparar los electrodos y su disposición para que el ensayo sea correcto.

Es importante que los electrodos estén limpios. Para ello el contraelectrodo de platino se sumergirá en una disolución de ácido sulfúrico, y se calentará mediante un mechero de modo que se elimine cualquier tipo de suciedad. Posteriormente tanto el contraelectrodo como el electrodo de referencia se limpiarán con agua desionizada.

Una vez limpios, los electrodos se disponen de tal manera que el electrodo de trabajo quede en el centro de la celda, y el contraelectrodo y el electrodo de referencia a los laterales y alineados con el electrodo de trabajo. Se sumergirán aproximadamente un centímetro en la disolución, y a su vez deben estar al menos separados un centímetro entre sí.



Figura 24: Electrodos sumergidos en una disolución de pirrol: De izquierda a derecha, el electrodo de referencia, el de trabajo, y el contraelectrodo.

Una vez conectados los electrodos al potenciostato, se establecerán las condiciones del ensayo mediante un programa informático, en este caso PowerSuite™.

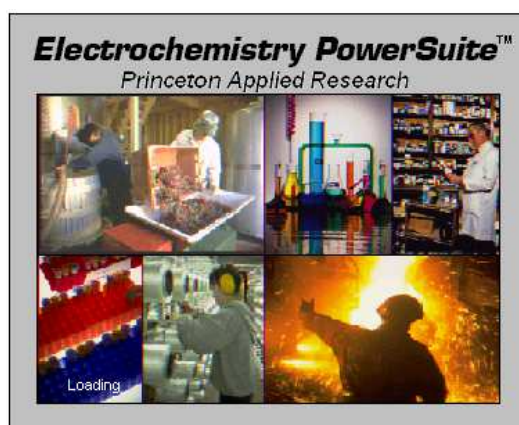


Figura 25: Imagen de PowerSuite™.

Seleccionando un ensayo de cronopotenciometría, se pueden ajustar sus distintas condiciones, en este caso:

- Tiempo de deposición: 300s
- Velocidad de barrido: 100mV/s
- Intensidad = 0,02mA

Una vez finalizado el ensayo, se limpia con agua desionizada el electrodo de trabajo, ahora con la película de polipirrol depositada, y se hace una primera inspección visual para comprobar si la película está dañada o mal depositada.



Figura 26: Electrodo con sustrato de platino. En la parte superior se puede observar la película de polipirrol, de color negro.

Para una comprobación más exhaustiva del correcto funcionamiento del sensor, se puede hacer un ensayo de voltametría cíclica en una disolución de KCl 0,1M. En el caso de que el ensayo de deposición haya sido correcto, el sensor ya estará preparado para su uso en experimentos de detección de antioxidantes.

- Estudio de las distintas variables:

Hay que tener en cuenta que el procedimiento explicado es el de la fabricación de los sensores definitivos con los que se hizo los ensayos en mostos. Previamente a eso, se realizaron ensayos de deposición de la película de polipirrol variando las distintas condiciones del proceso. Por ejemplo, la concentración del pirrol y las nanopartículas de oro en la disolución.

Dentro de los dopantes, se prepararon disoluciones de pirrol con ácido sulfúrico, con DSA y con DBSA. Los electrodos que utilizaban como dopante el DSA y el DBSA daban similares resultados, y a la vez mejores que los electrodos de H_2SO_4 , por lo que el estudio continuó descartando el uso del H_2SO_4 como dopante. Y dado que el DBSA es más económico que el DSA y daban unos resultados parecidos, se descartó el uso de DSA.

Respecto a las técnicas electroquímicas de deposición, se ha utilizado tanto cronopotenciometría como cronoamperimetría.

La adición de las nanopartículas de oro a la matriz de polipirrol se llevó a cabo por dos métodos diferentes, por cogeneración y por atrapamiento:

- Por cogeneración:

La estrategia de incorporación de las nanopartículas de oro consiste en una electrogeneración conjunta de polímero y las nanopartículas. El ácido cloroáurico (HAuCl_4) es una especie oxidante que es susceptible de oxidar al pirrol presente en la disolución y por lo tanto en este método se produce tanto polimerización electroquímica, como polimerización química. De esta forma cuando se está realizando el ensayo de deposición de polipirrol las nanopartículas se generan simultáneamente a la película de polipirrol.

- Por el método de atrapamiento:

Se preparan 25 mL una disolución 10^{-3} M de HAuCl_4 que será el precursor de las nanopartículas y 10 mL de citrato sódico $38,8 \cdot 10^{-3}$ M que será el reductor. En un vaso de precipitados de 50 mL se añaden 20 mL de la disolución de HAuCl_4 y se calienta hasta ebullición con

agitación, en ese momento se añaden 0,2 mL de la disolución de citrato, produciéndose un cambio de color de amarillo a incoloro. La agitación ha de mantenerse durante todo el proceso. La disolución experimenta diferentes cambios de color a lo largo del proceso desde amarillo inicialmente a incoloro cuando se añade el reductor, luego pasa a gris, azul oscuro, morado y por último a rojo vino (*figura 27*). De esta forma se crean las nanopartículas y se quedan suspendidas en la disolución. Así cuando se hace el ensayo de deposición, las nanopartículas son atrapadas mientras se deposita la película de polipirrol.



Figura 27: Cambio de color de la disolución con nanopartículas después de ser calentada y agitada durante varios minutos.

Con ambos métodos el tamaño de las nanopartículas está en torno a 30-40 nanómetros. Además se realizaron distintos ensayos variando la concentración de nanopartículas en la disolución de pirrol, concretamente mezclando a partes iguales la disolución de pirrol con una disolución de cloruro de oro de 10^{-3} M, y mezclando una parte de disolución de pirrol con tres partes de cloruro de oro 10^{-3} M.

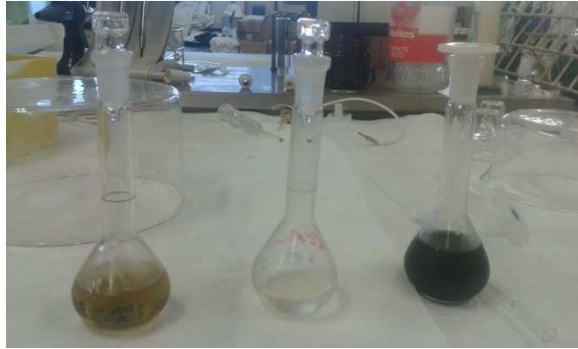


Figura 28: Cuando se mezcla la disolución de pirrol (izquierda) con la de cloruro de oro (centro) la disolución resultante adquiere un color muy oscuro (derecha).

Otra de las variables que hay que tener en cuenta es el tiempo de deposición, por ello se realizaron ensayos con tiempos de 60, 120, 300 y 800 segundos.

Por lo tanto, la red de sensores con la que se estudiará los mostos tiene la siguiente base:

- Sustrato de platino o de acero inoxidable.
- Concentración de pirrol en la disolución de deposición: 0,2 M
- Concentración de DBSA en la disolución: 0,1 M
- Con o sin nanopartículas de oro.
- Incorporación de las nanopartículas mediante cogeneración.
- Concentración de cloroáurico en la disolución: $5 \times 10^{-4} \text{M}$
- Deposición mediante cronopotenciometría.
- Tiempo de deposición: 300s.

De este modo quedan cuatro tipos de sensores diferentes, a los que se llamará: PlatinoPirrol, InoxPirrol, PlatinoGeneración e InoxGeneración.

3.5 ANÁLISIS DE ANTIOXIDANTES:

Para comprobar que los sensores se generan de manera correcta, se analizó la respuesta voltamétrica de cada uno de ellos en una disolución de KCl 0,1M en el intervalo de potencial comprendido entre -0,8 V y 0,8 V, a una velocidad de barrido $v = 100 \text{ mV/s}$.

Después de las medidas en KCl los sensores se utilizaron para analizar unas especies con actividad redox para así estudiar el comportamiento electroquímico de los sensores. Se analizaron varios antioxidantes, concretamente el catecol (concentración de 10^{-3} M en KCl 0,1 M y en buffer fosfato 0,01 M) y el ácido cafeico (concentración de 10^{-3} M en KCl 0,1 M). Las uvas y los vinos son ricos en compuestos funcionalizados que contienen el grupo catecol, estos compuestos imparten la actividad antioxidante.

También se utiliza como electrolito de referencia el buffer fosfato debido a los problemas que el acero inoxidable presentaba de corrosión por picaduras en KCl.

El estudio del comportamiento de los electrodos también incluye la capacidad para detectar dichos antioxidantes en distintas concentraciones, para ellos se ensayaron límites de detección. En los límites de detección, se estudia la respuesta de cada electrodo al hacer voltametría cíclica en disoluciones de diferente concentración de los antioxidantes mencionados. Para ello, en primer lugar se prepara una disolución de buffer fosfato buffer 0,01 M. A dicha disolución se añadirá progresivamente una disolución del antioxidante con una concentración de 10^{-3} M . De este modo se realizarán ensayos con estas concentraciones del antioxidante en buffer fosfato:

- 10^{-5} M
- 5×10^{-5} M
- 10^{-4} M
- 5×10^{-4} M
- 10^{-3} M

Una vez obtenidos los datos de estos ensayos se realiza el análisis cuantitativo de la intensidad de los picos anódicos y catódicos correspondientes al analito para la determinación de los límites de detección, que se explicará de una forma más detallada en el apartado de resultados y discusión.

Otra de las variables a tener en cuenta es la velocidad de barrido. Para el estudio cinético de los sensores se hicieron ensayos en el electrolito de referencia diferentes velocidades de barrido y se estudiaron las relaciones entre la intensidad de los picos redox con la velocidad de barrido con objeto de conocer detalles sobre el mecanismo de reacción.

3.6 PREPARACIÓN DE BIOSENSORES:

Sobre la base de distintos sensores explicada anteriormente se desarrollará la adición de enzimas para aumentar su especificidad. Como se ha comentado en apartados anteriores de este trabajo, ensayaremos con dos enzimas diferentes, glucosa oxidasa (GOx) y tirosinasa.

La incorporación de las enzimas en los sensores se hará siguiendo este procedimiento:

1º- Se limpia el electrodo sumergiéndolo parcialmente en una disolución de buffer fosfato 0,01M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) durante dos minutos.

2º- Se coloca una gota (5 microlitros) de la disolución con la enzima (5mg/ml) mediante una micropipeta sobre la película de polipirrol del electrodo.

3º-Se deja secar al aire durante quince minutos.

4º-Se repiten los pasos 2 y 3, es decir, que se añade una segunda gota y se vuelve a dejar secar.

5º-Se colocan los sensores sobre una disolución de glutaraldehído. Esto sirve para crear enlaces entre las enzimas y aumentar su estabilidad.

6º-Se dejan secar los sensores al aire durante quince minutos.

7º-Se humedecen los sensores sumergiéndolos durante treinta segundos en la disolución de buffer fosfato.

8º-Finalmente se guardan en una nevera a cuatro grados, para conservar la enzima frente al calor.

De este modo se tendrá una red de 12 sensores diferentes:

- PlatinoPirrol, InoxPirrol, PlatinoGeneración e InoxGeneración sin enzimas.
- PlatinoPirrol, InoxPirrol, PlatinoGeneración e InoxGeneración con glucosa oxidasa.
- PlatinoPirrol, InoxPirrol, PlatinoGeneración e InoxGeneración con tirosinasa.

3.7 MEDIDA EN MOSTOS

Con cada uno de estos sensores se ensayara en seis mostos diferentes utilizando la voltametría cíclica como técnica de análisis. Por lo que en total se prepararán 72 sensores con objeto de determinar su comportamiento en el mosto y su capacidad para distinguir diferentes variedades de uvas de los mostos.

Las seis variedades de mostos estudiadas son: Garnacha, Cabernet, Mencía regadío, Mencía seco, Juan García y Prieto Picudo, proporcionados por la bodega cooperativa de Cigales. Se realizaron los ensayos mediante voltametría cíclica, sumergiendo los tres electrodos (referencia, trabajo, y contraelectrodo) en el mosto sin diluir. Los resultados obtenidos mostraban una baja intensidad, dado a la baja conductividad del mosto.

Por este motivo, para realizar los siguientes ensayos en los mostos, se decidió diluirlos en KCl 0,3M, mezclando 10 ml de cada mosto con 10 ml de disolución de KCl.



Figura 29: Muestras de los distintos mostos utilizados.

En un principio los ensayos se realizaron por voltametría cíclica, con 3 ciclos comprendidos entre -0,8 V y 0,8 V. Dado que el número de ciclos resultó insuficiente para realizar el análisis estadístico, se decidió incrementar el número de ciclos a 5, y ampliar la ventana de la voltametría entre -1,0 V y 0,8 V.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como herramienta de análisis estadístico se ha utilizado el análisis de factores paralelos, Parafac.

El Parafac (PARAllelFACTORanalysis) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (reducción de variables). Con este método es posible reducir a una pequeña cantidad de variables la cantidad global de variables que describen la señal voltamétrica. Gracias a esta técnica es posible estudiar la capacidad de discriminación de la red de sensores.

Dado que la cantidad de información generada en los ensayos de voltametría cíclica es muy alta, con un gran número de datos, se dificulta el análisis, incrementándose el costo computacional y el tiempo de procesado.

Por este motivo hay que realizar una reducción en el número de datos que describen la señal a una serie de valores representativos que capturan la característica dinámica de la respuesta global por medio de unas funciones matemáticas denominadas kernels.

En primer lugar se realizó una reducción en el número de datos seleccionando solamente el barrido anódico de la voltametría cíclica, que resulta más interesante ya que contiene la información más significativa (*figura 30*).

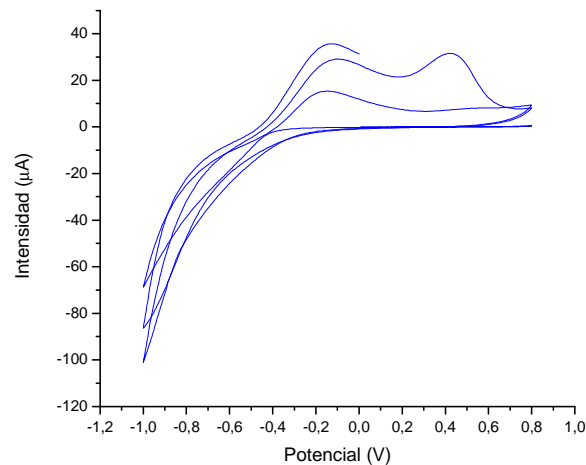


Figura 30: Gráfica obtenida mediante voltametría utilizando un sensor de Platino Generación en un mosto de Prieto Picudo. Se puede observar que en la parte anódica aparecen unos picos, datos que resultan más interesantes que los obtenidos en la parte catódica.

Una vez hecha esta preselección de datos, es cuando entran en juego las funciones kernels. Estas funciones unitarias, que tienen forma de campana, se multiplican por el fragmento de curva voltamétrica elegido, de este modo se obtendrán tantos coeficientes representativos de la curva como número de kernels en los que se haya dividido. En este trabajo se utilizó una división de la curva en 10 kernels.

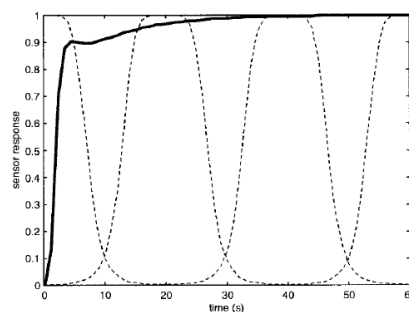


Figura 31: Ejemplo de funciones kernel. Cada función multiplica a la señal obtenida por el sensor.

Una vez se han normalizado los datos obtenidos con la voltametría, se compone una matriz que depende del número de:

- Ciclos de la voltametría. En este trabajo se han hecho 5 ciclos en cada ensayo.
- Sensores diferentes utilizados. La red de sensores está compuesta por 12 distintos.
- Mostos distintos sobre los que se han hecho los ensayos. Como se ha comentado anteriormente, en este trabajo se han analizado 6 mostos distintos.
- Kernels en los que se divide la curva obtenida en el ensayo, en este caso 10.

En el método Parafac, esto da lugar a una matriz de tres dimensiones, donde el número de filas es igual al número de ciclos por la cantidad de mostos en los que se ha ensayado, y el número de columnas igual a los kernels en los que se haya dividido la curva, y la profundidad es la cantidad de distintos sensores utilizados. Por lo que en este trabajo la matriz resultante es de dimensiones 30 x 12 x 10. Pues bien, el método Parafac trata de encontrar un nuevo conjunto de ejes ortogonales a la matriz, de modo que la varianza entre los datos sea máxima. Esto conlleva un procedimiento matemático algo complejo que no se detallará en este trabajo, pero puede ser consultado en la bibliografía [17].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DE VIABILIDAD. PREPARACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE SENSORES POLIMÉRICOS

Para el desarrollo de la red de sensores basada en sensores de polipirrol se han tenido en cuenta diferentes variables que sin duda afectarán al comportamiento electroquímico del sensor. En este primer apartado se expondrán los resultados obtenidos en la elaboración de sensor de polipirrol y sensores de polipirrol modificados con nanopartículas de oro en función de estas múltiples variables. Utilizando cada una de las distintas variables que se expondrán a continuación se obtendrían sensores finales distintos que por tanto puedan ser utilizados para desarrollar una buena red de sensores basados en polipirrol aplicable a la caracterización de mostos. En este primer estudio se pretende llevar a cabo una selección de estas variables, ya que el estudio completo que abarcase todos los tipos de sensores de polipirrol sería un trabajo inabarcable.

Por este motivo se han ido ensayando las diferentes variables, comparando los resultados obtenidos para ver como afectan al funcionamiento del sensor, y seleccionando aquellos resultados que utilizando la voltametría cíclica como técnica de caracterización daban un mejor resultado.

Las variables de estudio son:

- Técnicas de deposición utilizadas: Cronopotenciometría y cronoamperimetría.
- Tiempos de deposición: 60, 120, 300 y 800 segundos.
- Sustratos: Platino y acero inoxidable.
- Dopantes: H_2SO_4 , DSA y DBSA.
- Técnicas de adición de nanopartículas: Atrapamiento y cogeneración.
- Concentración de nanopartículas: diluidas al 50% y al 75%.

A continuación se expondrán los resultados obtenidos para comparar las distintas variables y seleccionar las más convenientes.

4.1.1 TÉCNICAS DE DEPOSICIÓN UTILIZADAS:

Como se ha explicado en anteriores apartados de este trabajo, la generación de las películas de polipirrol así como de los composites de polipirrol y nanopartículas para la fabricación de sensores se realizó mediante dos técnicas electroquímicas: la cronopotenciometría y la cronoamperimetría; también se probó en una primera instancia la voltametría cíclica pero no se obtuvieron resultados óptimos con lo que se descartó ya inicialmente.

4.1.1.1 CRONOAMPERIOMETRÍA

La fabricación de sensores mediante cronoamperimetría se ha realizado tanto sobre electrodos de platino como con electrodos de inoxidable. En la figura se muestran los registros de intensidad-tiempo obtenidos para polipirrol y composites de polipirrol con nanopartículas obtenidos por atrapamiento y por cogeneración.

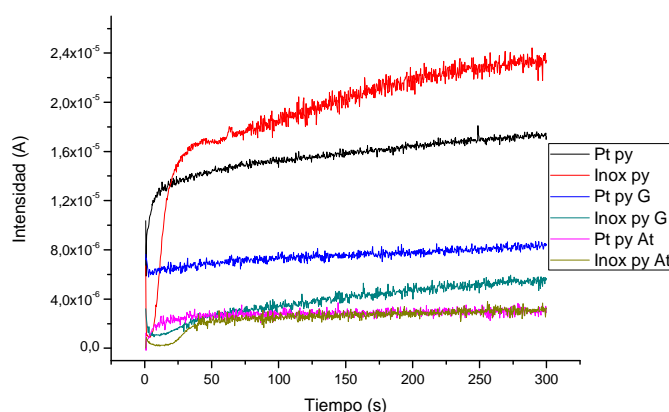


Figura 32: Datos recogidos en distintos ensayos de deposición.

Los registros muestran la típica forma característica del proceso de polimerización de polímeros conductores. Después de un corto periodo de incubación en el que la difusión contrala la oxidación del monómero, la intensidad crece rápidamente con el tiempo lo que corresponde con la nucleación y crecimiento de la película sobre el sustrato. Finalmente la densidad de corriente alcanza un valor casi estable lo que coincide con el crecimiento continuo y gradual de la película.

En la figura se observa claramente que las películas de polipirrol originan densidades de corriente más elevadas que los composites modificados con oro. En la tabla adjunta se muestran los valores de carga resultado de la integración de estas curvas. Se observa que la carga de polimerización depende fuertemente de la presencia de nanopartículas y del tipo de sustrato. La masa depositada en los electrodos de polipirrol sin nanopartículas es claramente mayor que en los que los composites tanto en los obtenidos por atrapamiento como por cogeneración. Con respecto a estos últimos son los composites obtenidos por cogeneración en los que se deposita más masa al ser mayor la carga de polimerización. Con respecto al efecto del sustrato se observan también diferencias entre los dos electrodos aunque la tendencia es la misma para platino e inoxidable, esto indica que el sustrato juega un papel importante en la nucleación de los las diferentes capas de polímero y composites. Sin embargo, en ambos casos las películas sin oro presentan mayor carga de polimerización, a continuación las obtenidas por atrapamiento y finalmente las obtenidas por cogeneración. En el caso de los nanocomposites son los depositados sobre platino en los que la carga de polimerización y por tanto la masa depositada es mayor, especialmente en las películas obtenidas por cogeneración.

Tabla 1. Cargas de polimerización calculadas para capas de polipirrol y composites de polipirrol-oro obtenidos por cronoamperimetría.

Sensor	Q (C/cm ²)	
	Acero inoxidable	Platino
Polipolipirrol	0,6557	0,6230
Ppy/AuNPs-T-CA	0,0736	0,0834
Ppy/AuNPs-G-CA	0,1169	0,2252

4.1.1.2 CRONOPOTENCIOMETRIA

En la figura 33 podemos observar las curvas potencial-tiempo registradas durante la electrodeposición de capas de polipirrol y de nanocomposites de polipirrol y oro obtenidas durante la electrodeposición siguiendo el método galvanostático a 0,02 A durante 300 segundos. Se observan claras diferencias entre el potencial de polimerización del polipirrol y de los composites. Dentro de estos últimos también se pueden observar diferencias entre las capas obtenidas por atrapamiento y por cogeneración.

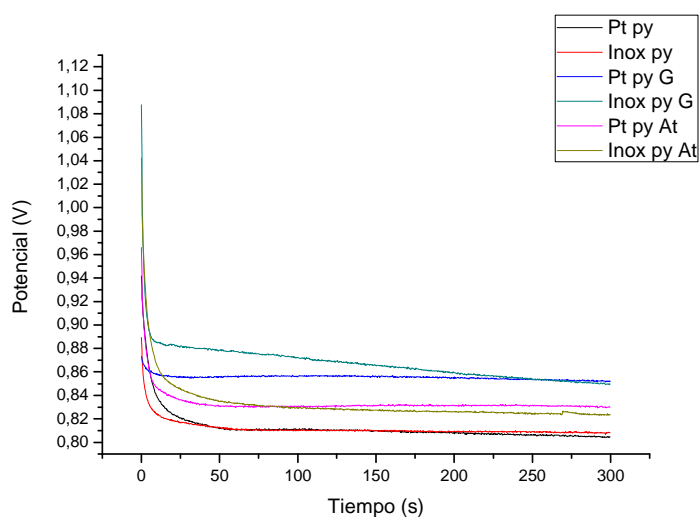


Figura 33: Datos recogidos en distintos ensayos de deposición.

En todos los casos cuando se aplica la intensidad de corriente se observa una brusca disminución del potencial. Esto se relaciona con la capacitancia de la doble capa que se produce en la superficie del electrodo durante el proceso de

nucleación. Cuando se alcanza el valor de potencial estable, característico de cada capa, el monómero se oxida. A continuación se observa un proceso de estabilización y crecimiento de la capa que se caracteriza por un potencial constante. La velocidad de nucleación más rápida, en la que se observa una variación de potencial más rápida, se observa en la polimerización de polipirrol sin nanopartículas. El potencial final al que el monómero se oxida es también claramente inferior para las capas de polipirrol sin modificar. Por tanto podemos concluir que las nanopartículas de oro dificultan el proceso de polimerización tanto para los composites obtenidos por atrapamiento como para los obtenidos por cogeneración. El potencial final obtenido durante la polimerización de los nanocomposites es claramente mayor en los composites obtenidos por cogeneración. En este caso apenas hay diferencias entre los dos sustratos, solo al comienzo de la electrodeposición el potencial es ligeramente superior en los sustratos de inoxidable.

Finalmente y como conclusión debemos añadir que en el caso de la cronopotenciometría las diferencias entre las distintas electrodeposiciones realizadas tanto en platino como en inoxidable son mínimas. Sin embargo en el caso de la deposición de polipirrol o nanocomposites sobre acero inoxidable mediante la técnica de cronoamperimetría si se han observado diferencias en algunos casos significativas, con lo que en principio la técnica galvanostática parece ser más adecuada, especialmente en el caso de sustratos de acero inoxidable.

4.1.2 TIEMPO DE DEPOSICIÓN

En el apartado anterior los ensayos se realizaron a un tiempo fijo de 300 segundos, sin embargo, también se ha realizado un estudio sobre la influencia del tiempo de deposición con objeto de determinar el tiempo ideal para la electrodeposición por ambas técnicas, cronoamperimetría y

cronopotenciometría. La figura muestra los registros de potencial-tiempo realizados sobre electrodos polimerizados durante 60, 120, 300 y 800 segundos sobre platino y sobre acero inoxidable mediante cronoamperimetría. También se ha calculado la carga de electrodeposición mediante la integración del área bajo la curva. En todos los casos la capa depositada ha sido polipirrol con DSA como dopante.

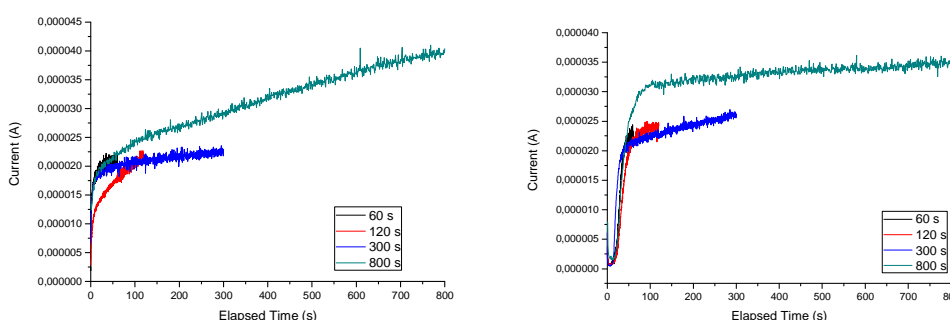


Figura 34: Platino (izquierda) e inoxidable (derecha).

Tabla 2. Cargas de polimerización calculadas para capas de polipirrol obtenidas utilizando distintos tiempos de deposición.

Cronoamperometría	Q (C/cm ²)	
	Acero inoxidable	Platino
Tiempo (s)		
60	0,0712	0,1158
120	0,1967	0,2059
300	0,6557	0,6230
800	2,5262	2,501

Los resultados indican que el tiempo de 800 segundos es el que conlleva una carga de electrodeposición mucho mayor que el resto lo que indica que la masa depositada es máxima y que por tanto el espesor de la capa de polipirrol es mucho mayor. Sin embargo estas capas se desprenden con gran facilidad cuando se lavan los electrodos con agua con lo que aunque aumenta el espesor empeora la adherencia al aumentar el tiempo de deposición. Los resultados indican que apenas hay diferencia entre los dos sustratos para cualquiera de los tiempos de

deposición utilizados. En cuanto a la intensidad de corriente se observa que para los tres tiempos, 60, 120 y 300 segundos la intensidad de corriente es similar ($2 \cdot 10^{-5}$ A para el sustrato de platino y de $2.5 \cdot 10^{-5}$ A para acero inoxidable), aunque la capa más gruesa lógicamente es la obtenida para 300 segundos. Por ello se determina que este tiempo de 300 segundos es el más adecuado ya que permite obtener capas gruesas pero con buena adherencia.

En el caso de la técnica de cronopotenciometría en la figura se observa que el potencial que se alcanza sobre el sustrato de platino para los tres tiempos de electrodeposición, 60, 120 and 300 segundos es similar (0.80 V) mientras que para después de 800 segundos de polimerización el potencial que se alcanza es menor (0.78 V). Este mismo comportamiento se observa en los electrodos de acero inoxidable pero en este caso las diferencias entre 300 y 800 segundos son menores.

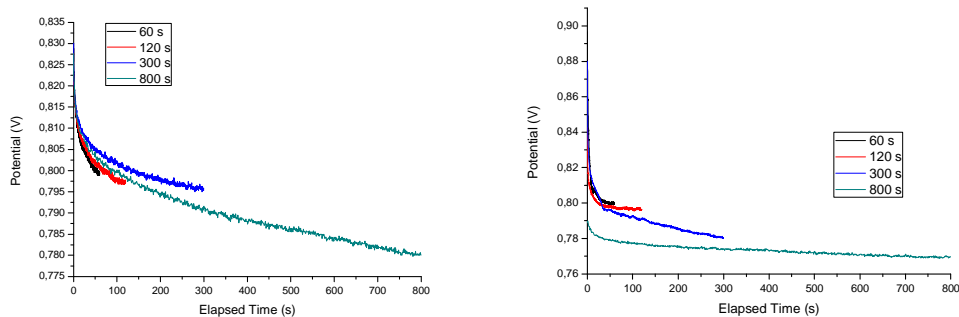


Figura 35: Platino (izquierda) e inoxidable (derecha).

Con objeto de realizar la comparativa entre las dos técnicas se ha calculado también la carga de deposición para los electrodos depositados por cronoamperimetría que lógicamente es constante e idéntica para ambos electrodos. Se observa que los valores para los distintos tiempos son muy similares a los obtenidos por cronoamperimetría pero a medida que aumenta el tiempo de deposición se observan mayores diferencias entre las dos técnicas, la carga de deposición es menor por cronopotenciometría que por

cronoamperimetría. Por tanto parece que tampoco los tiempos más largos de deposición son recomendables y por tanto parece que también 300 segundos el tiempo que se seleccionará para elaborar nuestra red de sensores y poder realizar las medidas en mosto.

Tabla 3. Cargas de polimerización calculadas para capas de polipirrol obtenidas utilizando distintos tiempos de deposición.

Cronopotenciometría	Q (C/cm²) (Q = I x t)
Tiempo (s)	Acero inoxidable y platino
60	0,1173
120	0,2347
300	0,5868
800	1,5648

4.1.3 DOPANTES

Como ya se ha expuesto, para conseguir que el polipirrol se comporte como polímero conductor se necesita de agentes dopantes que aumenten su conductividad, por tanto en el proceso de electropolimerización es necesaria la adición de disoluciones que contengan dichos dopantes en la disolución del monómero antes de llevar a cabo el ensayo de deposición electroquímica. Los dopantes utilizados en esta investigación son: DBSA (Dodecilsulfonato de sodio), DSA (Decano sulfonato de sodio), y H₂SO₄ (ácido sulfúrico). Cada uno de estos dopantes tiene diferentes propiedades, por lo que previsiblemente su diferente naturaleza afectará a la conductividad de los sensores que por tanto tendrá un comportamiento electroquímico diferente en función del dopante utilizado. Por ello se han hecho ensayos de deposición con cada uno de ellos, de esta forma se han podido comparar los resultados obtenidos con objeto de seleccionar el dopante más adecuado para nuestra red. En todos los casos se han

trabajado con idénticas concentraciones de monómero, 0,2M, y de dopante, 0,1M. La deposición con DSA ya ha sido analizada en apartados previos con lo que a continuación se exponen los resultados obtenidos con H_2SO_4 y con DBSA.

4.1.3.1 Dopaje con H_2SO_4

En la figura 36 se muestran las deposiciones de polipirrol y ácido sulfúrico por cronopotenciometría para los dos sustratos, esto es inoxidable y platino.

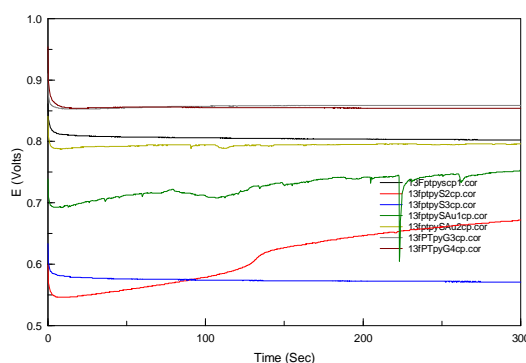


Figura 36: Datos obtenidos en la deposición con ácido sulfúrico como dopante.

En la figura podemos apreciar como tanto en el caso de la película de polipirrol como en los composites de polipirrol y atrapamiento existe bastante dispersión entre los datos de potencial registrados en los distintos electrodos fabricados en idénticas condiciones. En el caso de los composites obtenidos por cogenaración las diferencias son menores. Se observa como en el caso del DSA, cuya deposición se ha analizado en el apartado 4.1.2, la película de polipirrol es la que muestra un potencial de deposición más bajo mientras que la presencia de nanopartículas de oro desplaza el potencial a valores ligeramente superiores. En el caso del acero inoxidable se observa un comportamiento ligeramente diferente tal y como se aprecia en la siguiente figura.

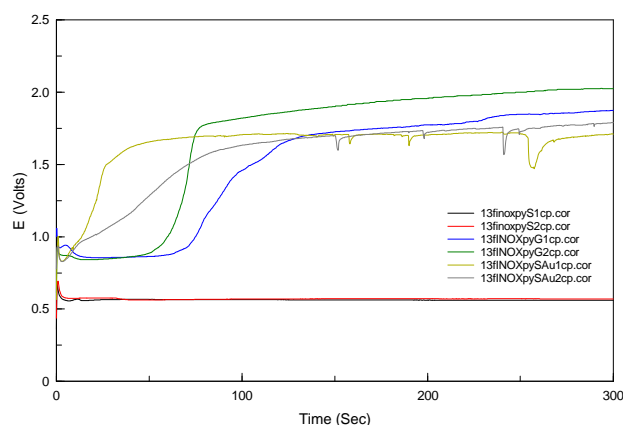


Figura 37: Datos obtenidos en la deposición con DSA como dopante.

En el caso de polipirrol el registro de potencial es similar al observado con DSA, figura 37, sin embargo cuando se electrodeposita tanto en presencia de una disolución coloidal de nanopartículas de oro como en presencia de cloroaúrico los potenciales tras la típica caída inicial y mantenimiento experimentan un incremento de potencial muy elevado para posteriormente estabilizarse. Los potenciales finales que se alcanzan son superiores a un voltio con lo que sin duda se podría originar la oxidación degradativa del polipolipirrol generado y por tanto no ser adecuado para nuestros propósitos.

4.1.3.2 Dopaje con DBSA

En la figura 38 se observan de modo conjunto los registros de potencial-tiempo obtenidos para ambos sustratos en la electrodeposición de polipirrol y composite de polipirrol y nanopartículas de oro obtenidos mediante cogeneración utilizando DBSA como dopante. Se muestran dos deposiciones de cada tipo con objeto de corroborar que a diferencia de lo ocurrido con las capas de polipirrol dopadas con sulfúrico sobre inoxidable en este caso la reproducibilidad es muy buena.

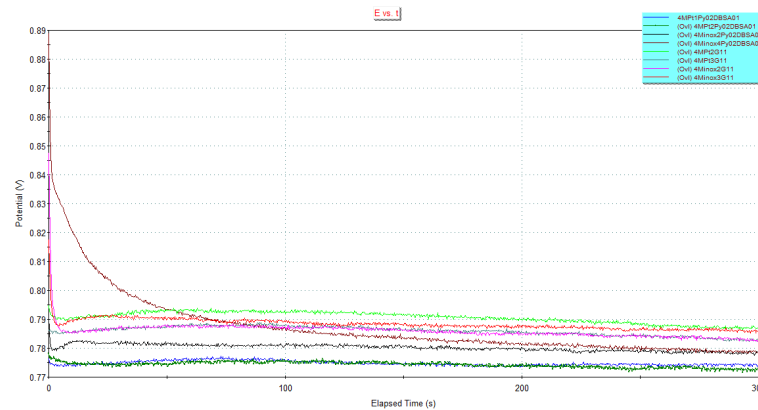


Figura 38: Datos obtenidos en la desposición con DBSA como dopante.

Tal y como comentábamos apenas hay diferencias entre las distintas electrodeposiciones por cronopotenciometría realizadas en idénticas condiciones por lo que la reproducibilidad es óptima. Tampoco hay grandes diferencias entre los dos sustratos, el potencial es ligeramente más bajo en la electrodeposición de polipirrol sobre platino, como ya ocurría con las capas dopadas con DSA. Con respecto a las nanopartículas como también se observaba en las deposiciones con DSA se observa que la presencia de cloroaúrico en la disolución hace que el potencial se desplace a potenciales ligeramente más elevados. En el caso de las capas de composite obtenido por cogeneración las diferencias entre los sustratos son todavía menores que las observadas en la capa de polipirrol sin nanopartículas.

En la figura 39 se muestran los resultados obtenidos en la deposición de polipirrol y composite de polipirrol y nanopartículas de oro obtenido por cogeneración sobre sustratos de platino e inoxidables utilizando la técnica de cronoamperimetría.

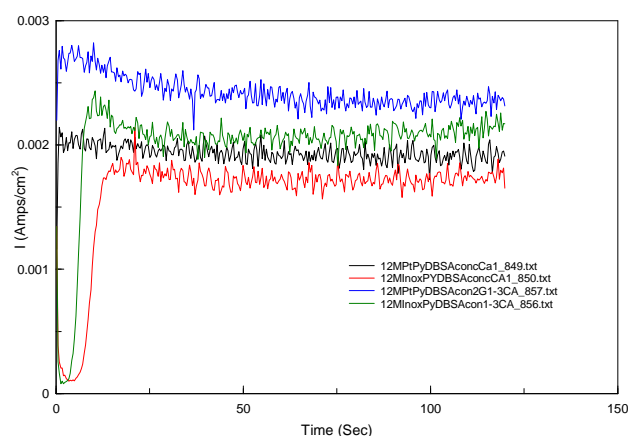


Figura 39: Datos obtenidos en la deposición con DBSA como dopante, mediante cronoamperimetría.

Podemos observar que también podemos utilizar el DBSA como dopante utilizando la técnica potencioestática para la electrodeposición ya que se obtienen resultados muy parecidos a los obtenidos con DSA. La carga de deposición es ligeramente más alta para el platino que para el sustrato de inoxidable. En este caso los composites obtenidos a partir de una disolución más concentrada en cloroáurico muestran cargas de deposición más elevadas que en la electropolimerización de polipirrol con lo que parece que la concentración de nanopartículas también afecta a la electrodeposición, aspecto que se analizará en el siguiente apartado.

Por tanto podemos concluir que los dopantes DSA y DBSA actúan de modo parecido y que ambos resultan adecuados como dopantes tanto en inoxidable como en platino. Aunque por su menor precio utilizaremos DBSA para la fabricación de nuestra red de sensores.

4.1.4 TÉCNICAS DE ADICIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas de oro pueden ser incluidas en la matriz de polipirrol, creando un material compuesto, de muy diversos modos. Esto es, la introducción

de nanopartículas en la electrodeposición del polipirrol puede ser llevada a cabo con distintas técnicas, que afectarán previsiblemente al funcionamiento del sensor. De modo que para optimizar los sensores se han realizado una serie de ensayos utilizando distintas técnicas de fabricación de nanocomposites. Así se ha podido observar como influye cada técnica en la composición del sensor, y comparando resultados se ha podido elegir la más conveniente.

Las técnicas estudiadas han sido la cogeneración y el atrapamiento, como se ha explicado en el capítulo anterior de este trabajo. En el primer caso se trata de generar las nanopartículas de oro a la vez que se realiza la electropolimerización del polipirrol a partir de una disolución de cloroáurico, mientras que en el segundo caso se parte de una disolución coloidal de nanopartículas de oro que se han obtenido a partir de la reducción del ácido cloroáurico con citrato.

En la figura 40 se muestran los resultados obtenidos en la deposición de composites por ambas técnicas sobre sustrato de inoxidable, se ha incluido también capas de polipirrol a efectos comparativos.

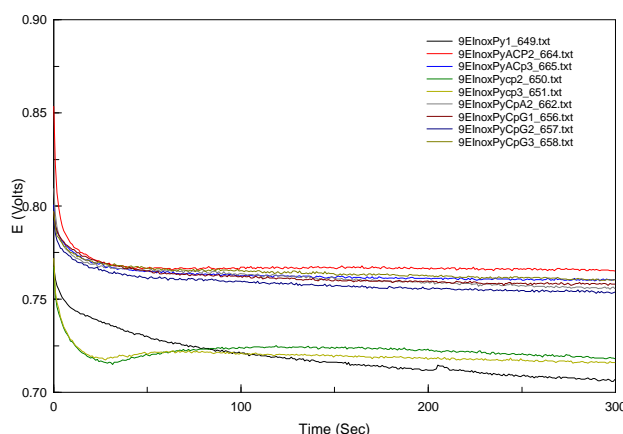


Figura 40: Datos obtenidos en la deposición del composite utilizando distintas técnicas en sustrato de inoxidable.

En primer lugar corroboramos una vez más la buena reproducibilidad de la técnica de cronopotenciometría sobre sustrato de inoxidable. Podemos observar también que apenas hay diferencia entre las dos técnicas de generación

del nanocomposite teniendo en cuenta que los potenciales de los distintos electrodos obtenidos por atrapamiento y por cogeneración son muy similares y claramente más elevados que los obtenidos para las capas de polipirrol sin nanopartículas. En el caso del sustrato de platino se obtienen similares conclusiones como puede verse en la figura 41.

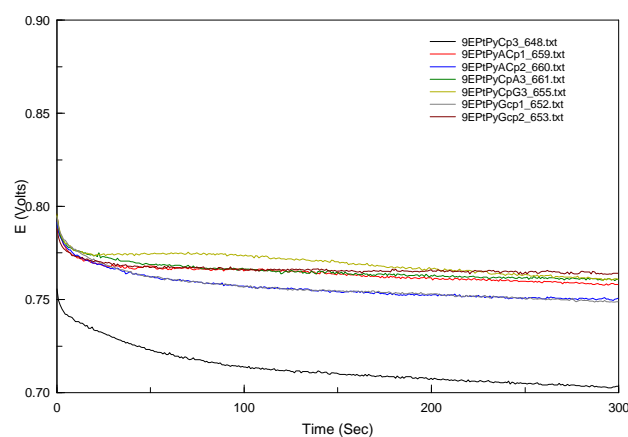


Figura 41: Datos obtenidos en la deposición del composite utilizando distintas técnicas en sustrato de platino.

Las diferencias en el registro potencial-tiempo entre atrapamiento y cogeneración son mínimas si bien en este caso las películas con nanopartículas obtenidas por cogeneración parecen generarse a un potencial ligeramente superior al de las generadas por atrapamiento. Como en el caso del sustrato de inoxidable la reproducibilidad es muy buena y las diferencias entre polipirrol y composite son claras.

Dado que desde el punto de vista de la electrodeposición apenas hay diferencias entre estas dos técnicas se ha realizado un estudio microestructural de las mismas mediante microscopía electrónica de barrido SEM, con objeto de observar diferencias.

El estudio microscópico revela que efectivamente hay incorporación de nanopartículas de oro en la capa de polipirrol. En la figura 42 se observan las

nanopartículas de oro, de tonalidad blanca y brillante, uniformemente distribuidas en el polipirrol que tiene la típica estructura “coliflor”.

Las figuras 42 a y b corresponden a los nanocomposites depositados sobre inoxidable mediante cronopotenciometría por atrapamiento y cogeneración respectivamente y las figuras 42 c y d corresponden a los depositados por cronoamperimetría por ambas técnicas. Se observa claramente que las mayores diferencias son en función de la técnica potencioestática o galvanostática mientras que las diferencias entre atrapamiento y cogeneración son mínimas. Se observa que el tamaño de la estructura globular es mayor para los nanocomposites generados por cronoamperimetría, pero el número de nanopartículas incorporadas en la capa es mucho mayor cuando se utiliza la cronopotenciometría para la electrodeposición. Además, se observa claramente que el número de nanopartículas es también mayor cuando se utiliza la técnica de cogeneración. El tamaño de las nanopartículas obtenidas a partir de la disolución coloidal con citrato es muy parecido al obtenido por cogeneración. Este tamaño está entre 30-40 nanómetros lo que es consistente con la absorbancia a 540nm que se ha medido en la disolución coloidal utilizada para generar los composites por atrapamiento. Estas observaciones son igualmente ciertas para composites generados sobre platino como sustrato.

Figura 42: a) Nanocomposite obtenido por CP Atrapamiento b) Obtenido por CP Generación

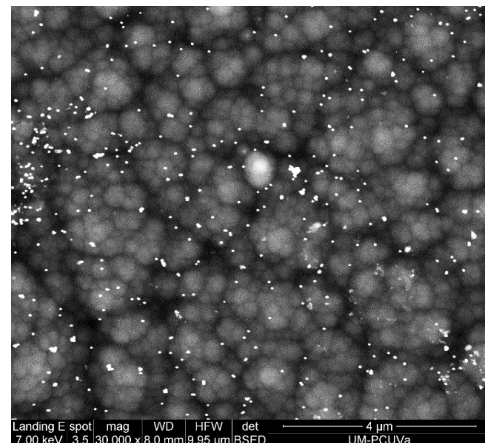
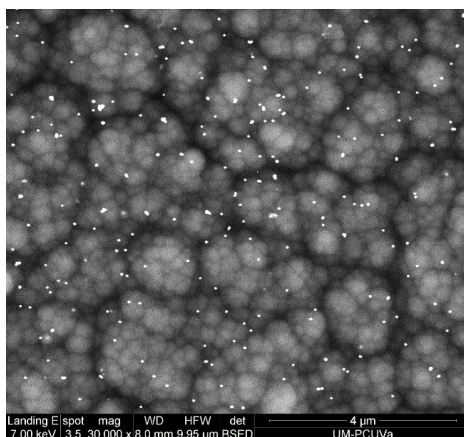
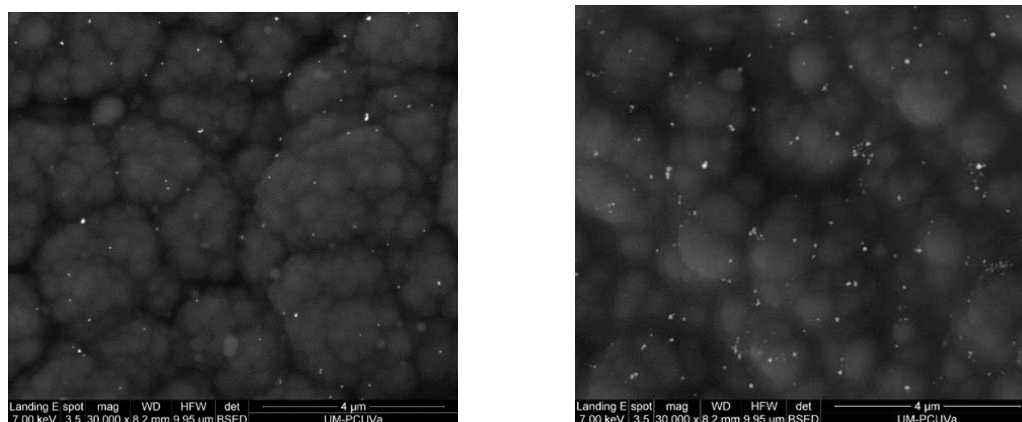


Figura 42: c) Nanocomposite obtenido por CA Atrapamiento d) Obtenido por CA Generación



Se ha observado que con el método de cogeneración se obtiene por tanto una mayor concentración de nanopartículas en la matriz de polipirrol sobre los dos sustratos por lo que a partir de los resultados obtenidos con ambos métodos se seleccionó para nuestra red de sensores el método de cogeneración, que también conlleva una preparación de la disolución más sencilla de los electrodos al generar las nanopartículas de oro a la vez que se genera la película de polipirrol.

4.1.5 CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Una vez seleccionada la técnica de adición de nanopartículas más conveniente, en nuestro caso cogeneración, se estudió cómo afectaba la concentración de nanopartículas de oro en la disolución de polipirrol, de modo que se analizó el efecto de utilizar una mayor concentración de cloroáurico en la disolución de polipirrol de electropolimerización.

Para ello se realizaron ensayos con dos concentraciones diferentes, mezclando a partes iguales la disolución de polipirrol con una disolución de ácido

cloroáurico (HAuCl_4) de 10^{-3}M y mezclando una parte de disolución de polipirrol con tres partes de ácido cloroáurico 10^{-3}M . En el primer caso hablaremos de una disolución 1:1 (polipirrol:cloroáurico) y de una disolución 1:3 (polipirrol:cloroáurico) en el segundo caso.

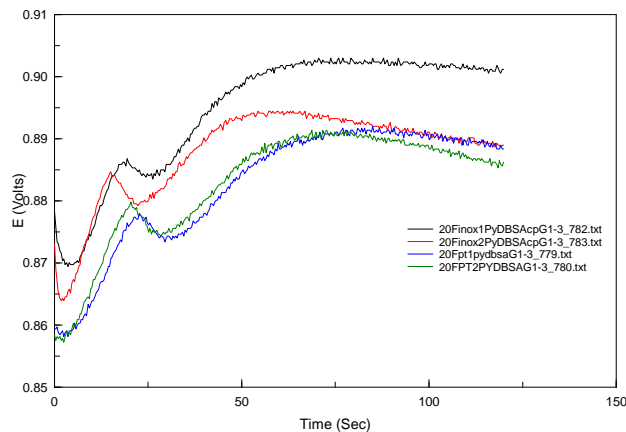


Figura 43: Datos obtenidos en la desposición del composite utilizando distintas concentraciones.

Como se observa en la figura 43, al aumentar la concentración de nanopartículas hay cambios en el registro de potencial que no es tan estable como cuando se utiliza menor concentración de nanopartículas. En cualquier caso la repetitividad es buena y se observa que los potenciales son ligeramente superiores cuando se utiliza el acero inoxidable como sustrato. En cuanto al potencial final se observa que es ligeramente más elevado que el obtenido con menor concentración de nanopartículas si bien no hay grandes diferencias. Por otra parte en el siguiente apartado se verá que desde el punto de vista electroquímico el efecto electrocatalítico no mejora demasiado. Por tanto y dado que utilizando las distintas concentraciones se obtenían unos resultados similares en el funcionamiento del sensor, se optó por la mezcla a partes iguales, con la ventaja de que se reduce el consumo de oro.

4.1.6 SUSTRATOS

La electrodeposición se ha hecho sobre dos materiales diferentes. Ya que durante la deposición tiene lugar una reacción de oxidación, es fundamental que el electrodo no se oxide en competencia con el polipirrol. Es por esto que se utilizan metales nobles, como el platino, pero en este trabajo se ha estudiado el comportamiento de electrodos con base de acero inoxidable, que además de ser más económico, se ha comprobado gracias a los resultados que su uso es factible. Más adelante se verá que si bien las deposiciones han sido similares sobre ambos sustratos, cuando se analiza el comportamiento en medios con cloruros la susceptibilidad de los electrodos de acero a la corrosión por picaduras puede generar algunos problemas.

4.1.7 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE VIABILIDAD

Una vez realizados los ensayos con las distintas variables que afectan al funcionamiento del electrodo y comparados sus resultados, se ha llegado a la conclusión de que la red de sensores óptima con la que se estudiará los mostos debe tener la siguiente base:

- Sustrato de platino y/o de acero inoxidable.
- Concentración de polipirrol en la disolución de deposición: 0,2 M
- Concentración de DBSA en la disolución: 0,1 M
- Con o sin nanopartículas de oro.
- Incorporación de las nanopartículas mediante cogeneración.
- Concentración de cloroáurico en la disolución: $5 \times 10^{-4} \text{M}$
- Deposición mediante cronopotenciometría.
- Tiempo de deposición: 300s.

Se puede observar que en la elección del sustrato, tanto el de platino como el de acero inoxidable son factibles para la elaboración del electrodo. Del mismo modo, un sensor que no contenga nanopartículas de oro puede ser utilizado en la red, ya que puede proporcionar unos resultados suficientemente buenos.

Por lo tanto la base de sensores sobre los que se desarrollará la red consta de cuatro sensores distintos, a los que se llamará: Platino-pirrol, Inox-pirrol, Platino-Generación e Inox-Generación. Los sensores tipo Platino-pirrol e Inox-pirrol no poseen nanopartículas de oro en la película de polipirrol.

4.2 DETECCIÓN DE ANTIOXIDANTES

4.2.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

El comportamiento electroquímico de las capas de polipirrol y de los composites de polipirrol y nanopartículas de oro, depositados sobre platino y sobre acero inoxidable utilizando cronopotenciometría y cronoamperimetría son analizados mediante voltametría cíclica utilizando en primer término una disolución de KCl 0.1M como electrolito y en segundo término se utilizará una disolución de buffer fosfato 0.1M como electrolito.

4.2.1.1 Voltametría Cíclica en Cloruro Potásico

Se observa que la respuesta obtenida depende del tipo de sustrato, de la presencia de nanopartículas en el sensor, de la técnica de electropolimerización, del tipo de sustrato y de la técnica utilizada para introducir la nanopartículas de oro en el polipirrol.

El comportamiento típico de los sensores de polipirrol sobre platino puede observarse en la figura 44 donde se muestra los voltamogramas correspondientes al primer y quinto ciclos. Se observa claramente que el registro del primer ciclo es diferente del resto. Por ello se suele utilizar el último ciclo para describir el comportamiento del sensor aunque no debemos descartar la información que proporciona este primer ciclo. De hecho en el primer ciclo observamos dos picos correspondientes a los procesos redox asociados al polarón y bipolarón mientras que en sucesivos ciclos solo se observa un único proceso redox (con un pico anódico a -0.35 V y su correspondiente pico catódico a -0.5 V)

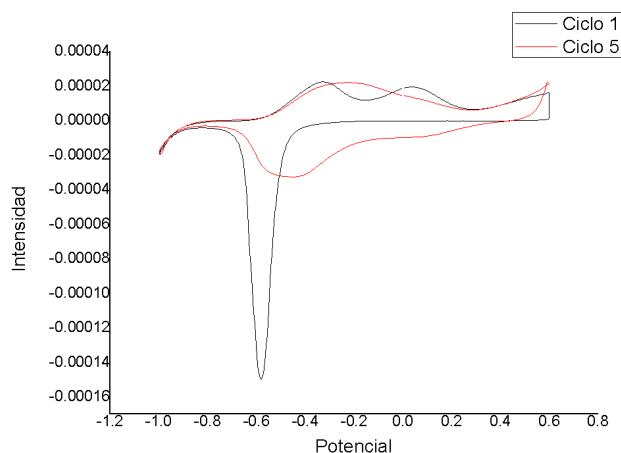


Figura 44: Ciclos 1 y 5 en un ensayo de voltametría cíclica.

Este mismo comportamiento se observa también en el caso de los nanocomposites de polipirrol y nanopartículas de oro, la figura 45 corresponde a nanopartículas de oro depositadas por atrapamiento sobre platino utilizando como técnica la cronoamperimetría.

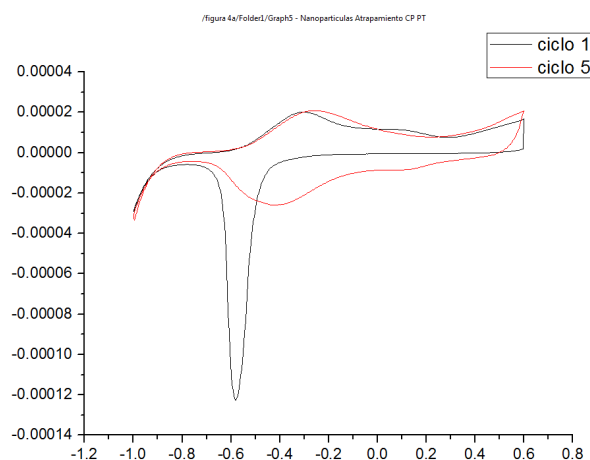


Figura 45: Ciclos 1 y 5 en un ensayo de voltametría cíclica, utilizando un electrodo con nanopartículas de oro.

En el primer ciclo podemos observar los dos procesos correspondiente al polarón-bipolarón mientras que en ciclos sucesivos solo se observa un pico anódico a -0.25 V y el catódico a -0.45 . Comparando con los sensores de polipirrol, se observa un desplazamiento de los picos anódicos y catódicos hacia

potenciales más positivos y sobretodo una menor diferencia entre los potenciales anódicos y catódicos que indica una mejora en la reversibilidad que puede ser atribuida al efecto electrocatalítico de las partículas de oro. Un comportamiento similar se observa en los sensores con nanopartículas de oro obtenidos por cogeneración sobre platino.

En el caso de películas de polipirrol depositadas sobre acero inoxidable los voltamogramas muestran menores intensidades que en el caso del platino especialmente para los films depositados por cronoamperimetría. También se observa una mayor separación entre los picos anódicos y catódicos y cierta irreproducibilidad.

En general las propiedades electroquímicas de los nanocomposites preparados por atrapamiento y por cogeneración son similares a las observadas para polipirrol, sin embargo se observan algunas diferencias en función del método de electropolimerización y del tipo de sustrato que pasamos a comentar.

Existen diferencias en función de la técnica de electrodeposición. Así, con la técnica de cronoamperimetría no se ha conseguido observar un efecto catalítico neto de las nanopartículas en disolución de KCl 0.1M, especialmente cuando se utiliza como sustrato el acero inoxidable, mientras que éste sí se observa claramente en la técnica de cronopotenciometría tanto para sustrato de platino como de inoxidable. La figura muestra estas diferencias cuando se utiliza atrapamiento para depositar las AuNP utilizando cronopotenciometría (a) y cronoamperimetría (b).

En la figura 46.a se observa claramente el efecto catalítico de las nanopartículas tanto en el platino como en el inoxidable. En el platino aumenta la densidad de corriente, especialmente en el pico de oxidación y mejora la reversibilidad. En el caso del inoxidable este aumento de intensidad no es tan

notable en el pico de oxidación pero sí en el de reducción y también mejora la reversibilidad. Esta mejora está relacionada con la mayor cantidad de nanopartículas observadas por microscopía electrónica que aumentan la conductividad. También esto es acorde con los artículos publicados que muestran que las nanopartículas exhiben un comportamiento catalítico cuando se deposita sobre platino debido a la sinergia entre los dos metales [18].

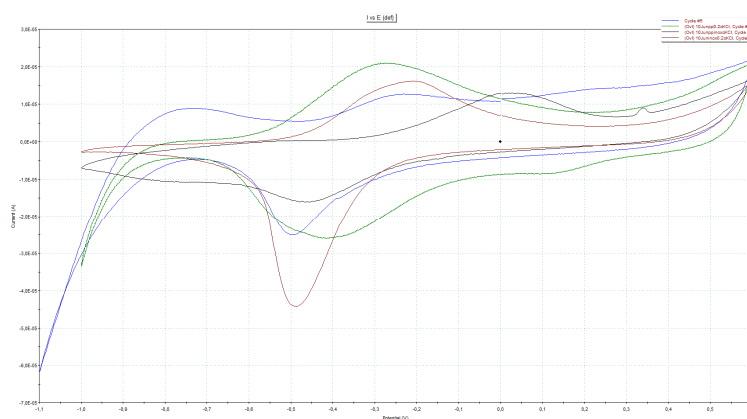


Figura 46.a: Comparativa de los distintos tipos de electrodos.

En la figura 46.b. se observa que no hay un efecto electrocatalítico de las AuNPs porque el comportamiento de las películas de PPy sobre ambos sustratos presenta mayor intensidad de corriente, esto es más evidente en el inoxidable.

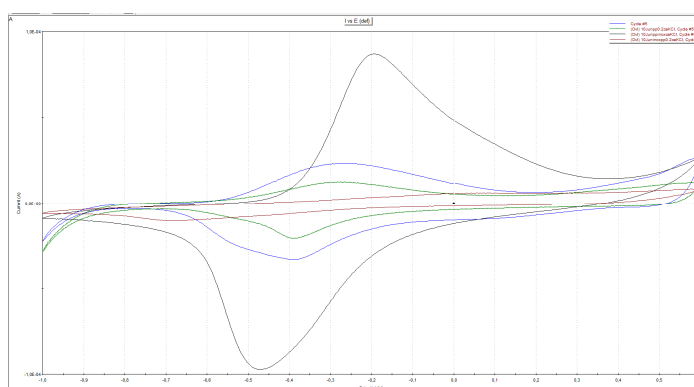


Figura 46.b. Comparativa de los distintos tipos de electrodos, depositados mediante cronoamperimetría.

Por lo tanto, la técnica que parece más adecuada para obtener un efecto catalítico de las nanopartículas de oro es la cronopotenciometría especialmente en el caso de que se utilice el acero inoxidable como sustrato.

También se ha realizado un estudio comparativo de las dos técnicas de introducción de las nanopartículas, esto es generación y trapping en KCl con la técnica de cronopotenciometría, figura 47.

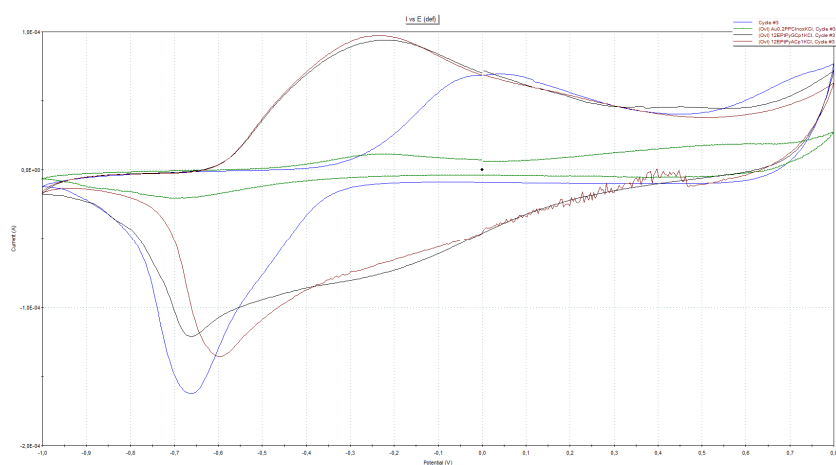


Figura 47: Comparativa de los distintos tipos de electrodos con nanopartículas, depositados mediante cronopotenciometría.

Se observa que en el caso del platino apenas hay diferencias, el potencial de oxidación es -0.25 V y el de reducción aparece a -0.6 V en el caso de atrapamiento y a -0.67 V en el caso de generación. En cuanto al inoxidable se aprecia una gran diferencia entre atrapamiento y cogeneración. El potencial de oxidación aparece a 0.05 V y el de reducción aparece a -0.66 V en el caso de cogeneración, mientras que en el caso de atrapamiento el pico de oxidación y reducción aparecen al mismo potencial que en el platino (0.25 V y -0.6 V) aunque con densidades de corriente muy bajas. Por este motivo, y parece que para inoxidable la deposición de nanopartículas por atrapamiento no es aconsejable.

Por último lugar se analiza la reproducibilidad y repetitividad de los distintos sensores. Para evaluar la repetitividad de los voltamogramas se realizan cinco repeticiones para cada muestra. La reproducibilidad se evalúa comparando los datos registrados en tres sensores preparados del mismo modo y midiendo muestras idénticas en diferentes días.

De hecho, aparte de las diferencias que ya hemos comentado en el comportamiento electroquímico de los nanocomposites depositados en función del sustrato, la diferencia más importante es su estabilidad y su tiempo de vida. Como ya se ha comentado el primer ciclo es claramente diferente al resto si bien los sucesivos ciclos son altamente reproducibles y sólo una ligera disminución en la intensidad de los picos se observa cuando los sensores se fabrican sobre sustrato de platino. Sin embargo en el caso del acero inoxidable se observa una disminución de intensidad mucho más evidente ya además un fuerte desplazamiento de los picos en dirección positiva hasta finalmente obtener una señal óhmica. En el caso del acero inoxidable los coeficientes de variación son muchos mayores que para platino y especialmente para las capas depositadas por cronoamperimetría. Además cuando los electrodos se recuperan y se vuelven a introducir en la disolución la señal obtenida en los aceros inoxidable es completamente distinta y se obtiene un comportamiento muy óhmico como se muestra en la figura 48. Esto los hace irrecuperables.

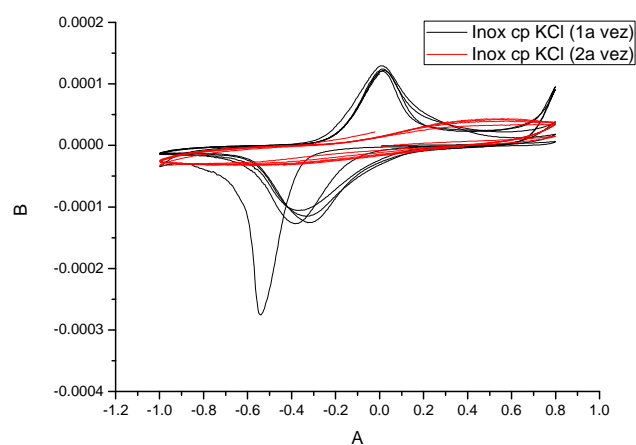


Figura 48: Comparativa de las señales obtenidas con un sensor de acero.

Se piensa que la estabilidad de los electrodos de inoxidable se ve deteriorada por la presencia de cloruros después de más de un uso, comprobando que la segunda vez que se ciclan en una disolución de KCl la señal presenta intensidades muy bajas y con un comportamiento óhmico. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el acero inoxidable es susceptible de experimentar corrosión por picaduras cuando se expone a medios con cloruros. Para mejorar su estabilidad se determinó cambiar el electrolito de referencia y utilizar una solución de buffer fosfato 0.01 M.

4.2.1.2 Voltametría Cíclica en Buffer Fosfato

Los voltamogramas obtenidos en buffer fosfato son ligeramente diferentes a los obtenidos en cloruro, sobre todo la parte catódica es la que más cambia con respecto a KCl. Los aniones fosfatos son más voluminosos que los iones cloruros y por tanto tendrán más dificultades para entrar y salir de la capa durante los procesos redox; esto podría explicar las diferencias encontradas. A pesar de estas diferencias, se sigue observando que la técnica de deposición a intensidad constante es la más adecuada para obtener un efecto catalítico de las nanopartículas de oro y que la deposición de nanopartículas de oro por cogeneración sigue siendo la más adecuada cuando se utiliza como sustrato el acero inoxidable.

La figura 49 muestra el comportamiento de nanocomposites obtenidos por cogeneración sobre sustrato de acero inoxidable utilizando técnicas cronopotenciométricas y cronoamperiométricas. Los sensores fabricados por cronopotenciometría muestran un pico de oxidación muy ancho a 0V y un pico de reducción mucho más estrecho y definido a -0.9V mientras que los sensores depositados por cronoamperiometría muestran un pico de oxidación menos intenso al mismo potencial de 0V pero apenas se observa el pico de reducción.

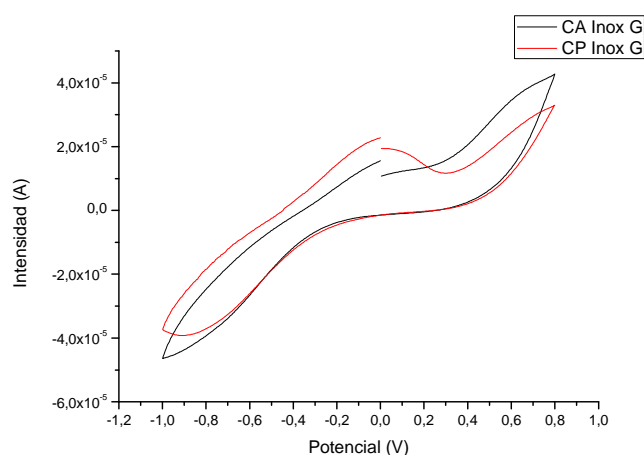


Figura 49: Comparativa de los sensores de inox generación, depositados mediante cronoamperimetría y cronopotenciometría.

En buena correlación con el comportamiento electroquímico observado en cloruro potásico, se constata que la incorporación de nanopartículas a las capas de polipirrol obtenidas por cronopotenciometría aumenta la intensidad de los picos y mejoran la reversibilidad de los procesos redox del polipirrol. Esta mejora es más evidente para las capas obtenidas por cogeneración en acero inoxidable mientras que para platino apenas hay diferencia entre atrapamiento y cogeneración.

La estabilidad de los electrodos en buffer fostato es mucho mejor que en cloruro potásico en el caso de utilizar como sustrato el acero inoxidable. Esto puede explicarse teniendo en cuenta la dificultad que el tamaño de los aniones supone para el intercambio de iones. Se sabe que la voltametría cíclica en KCl produce cambios en la morfología del polímero conductor que pueden dar lugar a huecos que pueden deteriorar su comportamiento. Además, como ya se ha comentado, los iones cloruros son peligrosos para la corrosión por picaduras a la que el acero inoxidable austenítico utilizado es sensible.

4.2.1.3 Estudio Cinético en Buffer Fosfato

Como se ha visto que la técnica de cronopotenciometría y la introducción de nanopartículas por cogeneración son las mejores metodologías, especialmente en el caso de sustrato de acero inoxidable, se realiza un estudio de la influencia de la velocidad de barrido en la intensidad de los picos entre 0.01 y 1 V/s utilizando como electrolito barrido en buffer fosfato para electrodos con y sin nanopartículas introducidas por cogeneración para sensores depositados por cronopotenciometría.

En la tabla se muestran las pendientes y coeficientes de regresión obtenidos para los voltamogramas registrados a diferentes velocidades de barrido (10, 20, 50, 100, 500, 100mV/s) en la solución de buffer fosfato 0.01M utilizando el pico anódico a 0.8V para realizar los cálculos.

Tabla 4. Estudio cinético:

Sensor	Relación con el ratio de escaneo $I_C (\mu A) \text{ vs. } v^{1/2} (mV s^{-1})^{1/2}$	
	Slope	R ²
Pt (polipirrol + DSA)	0.8788	0.9916
Pt G (0.2 M polipirrol + 0.1 M DSA + Au ³⁺ 1·10 ⁻³ M; 1:1, cogeneración)	0.4150	0.9426
Inox (polipirrol + DSA)	0.2784	0.9999
Inox G (0.2 M polipirrol + 0.1 M DSA + Au ³⁺ 1·10 ⁻³ M; 1:1, cogeneración)	0.6140	0.9996

En las figuras 50.a y 50.b se muestran las representaciones de la intensidad de corriente del pico anódico de los sensores de polipirrol sobre

platino en función de la raíz cuadrada de la velocidad (a) y para los nanocomposites obtenidos por cogeneración en las figura (b).

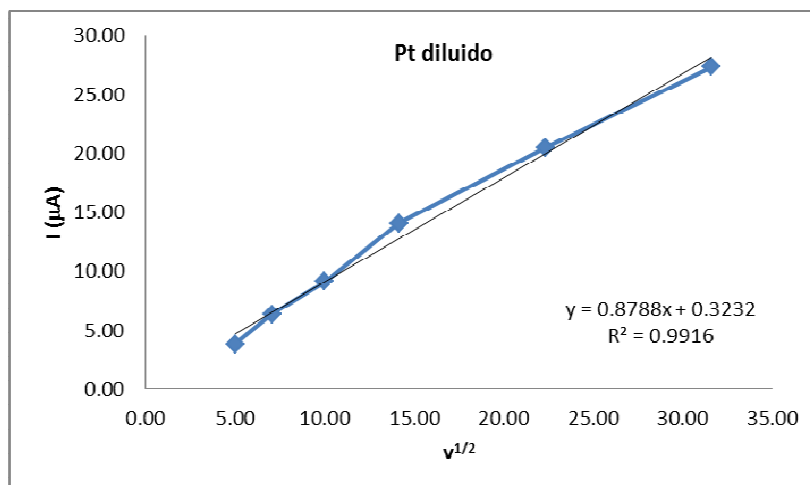


Figura 50.a: Intensidad sobre sensor platino polipirrol.

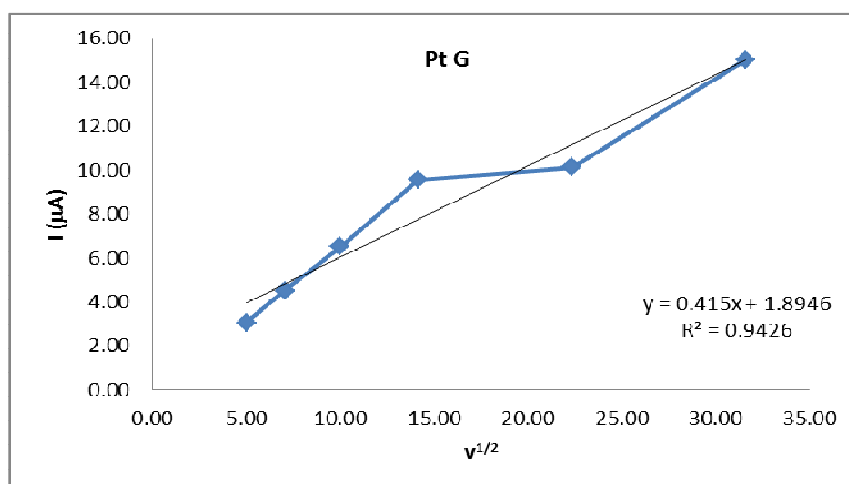


Figura 50.b: Intensidad sobre sensor platino generación.

En las figuras 51.a y 51.b se muestran las representaciones de la intensidad de corriente del pico anódico de los sensores de polipirrol sobre acero inoxidable en función de la raíz cuadrada de la velocidad (a) y para los nanocomposites obtenidos por cogeneración en las figura (b).

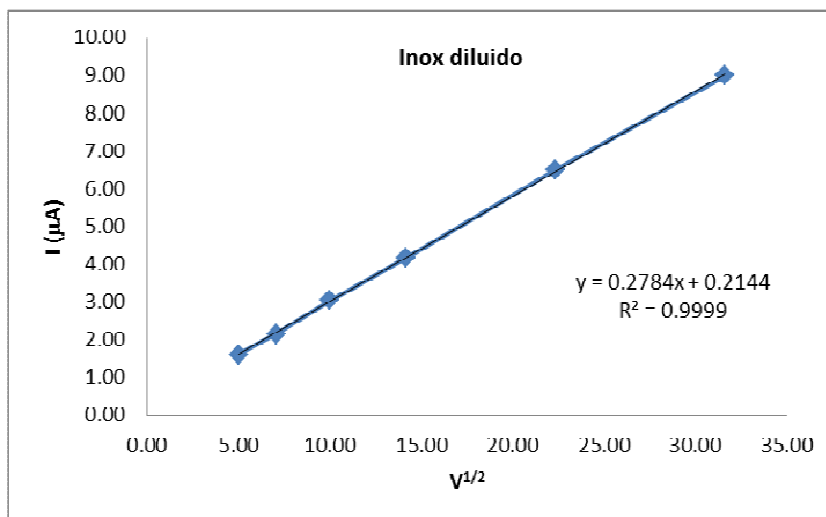


Figura 51.a: Intensidad sobre sensor inox polipirrol.

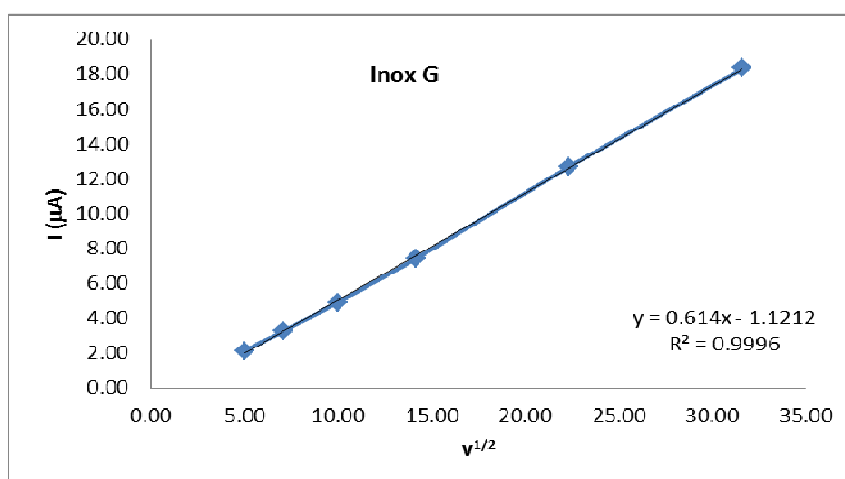


Figura 51.b: Intensidad sobre sensor inox generación.

Se observa que para los dos sustratos el comportamiento es similar y tampoco hay grandes diferencias entre polipirrol y polipirrol con nanopartículas de oro depositadas por cogeneración en lo que respecta al mecanismo de reacción. En todos los casos la correlación es muy buena y solo para el caso de capa de composite obtenida sobre generación sobre platino se obtienen un coeficiente de regresión peor. La intensidad del pico anódico aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik lo que pone de manifiesto que el proceso está limitado por la difusión.

En base a todo lo anterior podemos concluir que cuando la polimerización se realiza sobre platino, las dos técnicas de cronopotenciometría y cronoamperimetría dan lugar a resultados similares. Sin embargo, cuando la deposición se realiza sobre acero inoxidable, la cronoamperimetría da lugar a resultados mucho más irreproducibles con importante diferencias en las intensidades y en las posiciones de los picos. Por esta razón la cronoamperimetría debe ser descartada como técnica de electrodeposición y los posteriores estudios se harán por cronopotenciometría.

4.2.2. DETECCIÓN DE CATECOL

Para el posterior ensayo de los sensores en mostos, es importante conocer el comportamiento de estos sensores en la detección de fenoles. Esto se debe a que las uvas son ricas en polifenoles, compuestos responsables de su color y propiedades organolépticas. El contenido de polifenoles puede variar entre las distintas variedades de uvas, y también la composición fenólica va cambiando a lo largo de su proceso de maduración.

Aunque existe un amplio abanico de compuestos fenólicos, se han elegido dos para su estudio, el catecol y el ácido cafeico, ya que son fenoles presentes en la mayoría de las uvas y tienen importancia en las características organolépticas y maduración de las mismas.

De este modo este apartado se centra en evaluar la respuesta de los sensores ante catecol. Los ensayos se realizarán en un medio con pH neutro, en una disolución de buffer fosfato, de este modo se aumenta la conductividad del medio y es posible una mayor claridad de la señal, a la vez que se evita el problema de corrosión en los sustratos de inoxidable.

En primer lugar, se ciclaron todos los electrodos en la disolución de buffer fosfato, sin añadir nada de catecol. Después se realizan diferentes ensayos con un mismo electrodo pero variando la concentración de catecol, de este modo en función de la intensidad registrada mediante la voltametría cíclica se pueden calcular los límites de detección para los diferentes electrodos.

Las concentraciones de catecol utilizadas en el ensayo han sido:

- 0 M (solo buffer)
- 10^{-5} M
- 5×10^{-5} M
- 10^{-4} M
- 5×10^{-4} M
- 10^{-3} M

Por tanto y una vez que se ha conseguido obtener electrodos estables de polipirrol modificados con nanopartículas de oro, se procede en este apartado a analizar sus propiedades electrocatalíticas y sensitivas en la detección de catecol, uno de los compuestos fenólicos de mayor interés en la industria de la alimentación. Para analizar este efecto se analizará la amplificación de la señal como consecuencia de la presencia de nanopartículas y se observarán los desplazamientos en la posición de los picos de oxidación y reducción del catecol. En base al estudio realizado en el apartado anterior se ha seleccionado la cronopotenciometría como técnica de deposición tanto de polipirrol como de polipirrol modificado con nanopartículas sobre platino y sobre acero inoxidable en la detección de catecol.

Una de las novedades introducidas en esta investigación es la restricción del rango de potenciales de barrido con objeto de observar los picos de oxidación y reducción del catecol evitando que queden enmascarados por los picos de oxidación y reducción del polipirrol, que son los que tradicionalmente se han utilizado en los electrodos de polipirrol para detectar la presencia de

antioxidantes en mostos, vinos y cervezas [18]. Para ello ha sido necesario realizar los experimentos en el rango entre -0.1 V hasta $+0.8$ V a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Usando estas condiciones, la respuesta del polarón-bipolarón del polipirrol podría no observarse, lo que nos permitiría estudiar la respuesta del sensor al catecol. Como electrolito base se utiliza en todos los casos buffer fosfato, teniendo en cuenta que se trabajará como sustrato no sólo con platino sino también con electrodos de acero inoxidable y como ya se ha comentado en el apartado anterior, la presencia de cloruros puede alterar el comportamiento del sensor como consecuencia de un proceso de corrosión por picaduras.

El comportamiento y el efecto de las nanopartículas de oro en los sensores de polipirrol en la detección de catecol se ven fuertemente influenciados por la naturaleza del sustrato, por tanto analizaremos en primer término el comportamiento de los sensores depositados sobre platino y a continuación se hará lo propio sobre los de aceros inoxidable.

Cuando se utiliza platino como sustrato la respuesta de los sensores de polipirrol al ser introducidos en una solución de catecol es similar a la que se observa en buffer fosfato. Esto es, la respuesta electroquímica en el rango seleccionado desde -0.1 V hasta $+0.8$ V no permite observar los picos de oxidación y reducción del catecol como se observa en la figura 52. Teniendo en cuenta las altas densidades de corriente registradas parece claro que en este caso lo que se observan son picos asociados al polipirrol; estos picos son de intensidad suficientemente alta como para enmascarar los picos del catecol. Este comportamiento es el típico que se ha observado en este tipo de sensores cuando se introducen en mostos y vinos como ya se ha comentado anteriormente.

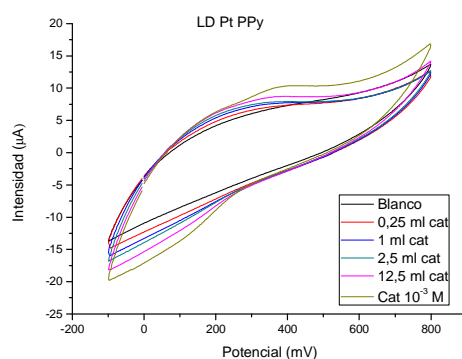


Figura 52: Electrodo de platino pirrol ensayado en catecol.

Cuando se trabaja con sensores de polipirrol modificados con nanopartículas de oro obtenidas por cogeneración, es posible observar claramente los picos del catecol como se muestra en la figura 53. Se observa un claro efecto electrocatalítico con las posiciones de los picos desplazados a potenciales muy bajos; se observa un claro pico anódico a 0.47V y uno catódico a 0.1 V.

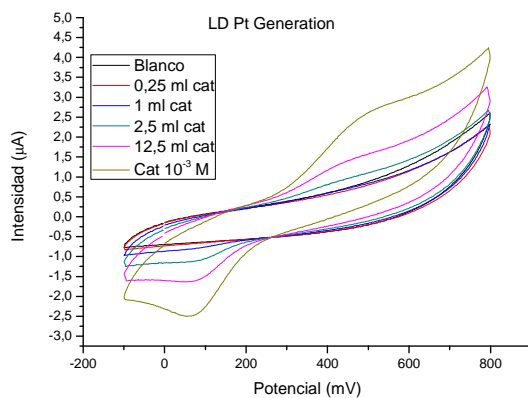


Figura 53: Electrodo de platino generación ensayado en catecol.

Este efecto electrocatalítico de las nanopartículas de oro en los electrodos de oro es igualmente constatable para nanopartículas obtenidas por atrapamiento. En la figura 54 podemos observar la respuesta del electrodo obtenido por atrapamiento ante disoluciones con concentraciones diferentes de catecol desde 10^{-5} hasta 10^{-3} .

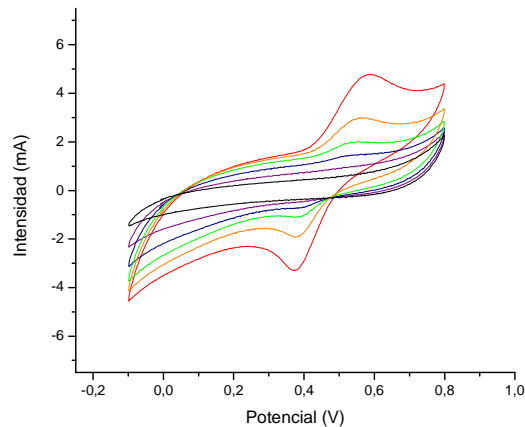


Figura 54: Electrodo con nanopartículas de oro ensayado en diferentes concentraciones de catecol.

Observamos que en el caso de las nanopartículas de oro depositadas por atrapamiento se observan perfectamente bien definidos, incluso mejor que los electrodos con nanopartículas obtenidas por cogeneración, y con intensidades de corriente incluso más elevadas si bien los picos aparecen desplazados hacia la derecha esto es potenciales más elevados. El pico anódico se sitúa en 0.6V y el catódico en 0.4V.

Con objeto de realizar un estudio comparativo entre los distintos electrodos se procede a la determinación del límite de detección de cada uno de ellos. Los distintos ensayos de cada sensor se realizan añadiendo catecol sobre la misma disolución, de modo que se va aumentando la concentración hasta tener un ensayo con cada una de las concentraciones anteriores. Se observa que al aumentar la concentración, aparecen unos picos de oxidación y reducción de mayor intensidad (en valor absoluto). Dichas intensidades de los picos serán datos necesarios para el cálculo del límite de detección. Con estos datos se construirá una gráfica que represente la intensidad en función de la concentración. Si los ensayos han sido correctos, la gráfica se ajustará a una línea recta, por lo que se hará una regresión lineal para calcular la pendiente de dicha

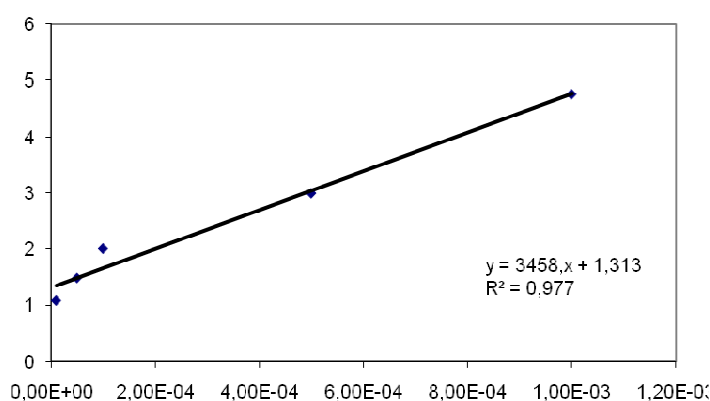
recta. Por otro lado, se calcula de desviación típica de las intensidades de los diferentes ciclos del ensayo en la disolución que solo contiene buffer fosfato, en torno a potenciales sobre los que se producen los picos de oxidación y reducción. Una vez obtenidos estos datos, el cálculo del límite de detección sigue la siguiente fórmula:

$$LD = 3\sigma / m$$

Donde σ es la desviación típica y m la pendiente.

En el caso de los electrodos con nanopartículas de oro obtenidas por atrapamiento se ha realizado el cálculo en el pico de oxidación y en el pico de reducción a continuación se muestran los resultados obtenidos.

Oxidación	
Concentración (M)	Intensidad (μA)
1,00E-03	4,767
5,00E-04	2,99
1,00E-04	2,002
5,00E-05	1,475
1,00E-05	1,073

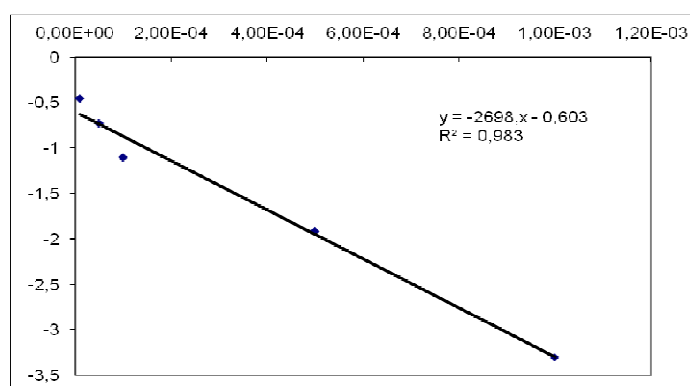


En este caso el límite de detección calculado es de $2,60 \times 10^{-5}$.

Se realiza el mismo estudio para el pico de reducción:

Reducción
Concentración (M) Intensidad (μA)

1,00E-03	-3,301
5,00E-04	-1,914
1,00E-04	-1,102
5,00E-05	-0,7271
1,00E-05	-0,4536

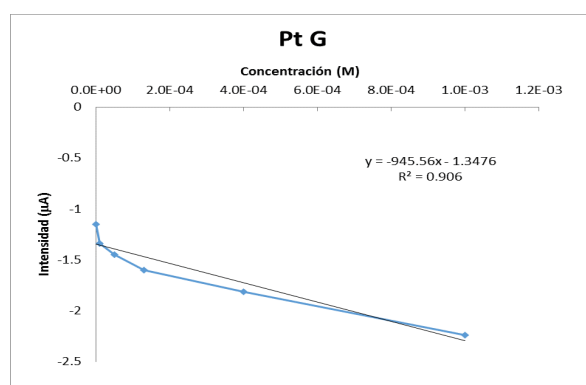


El límite de detección es: $3,62 \times 10^{-5}$.

Se hace lo propio para los electrodos de polipirrol modificados con nanopartículas de oro obtenidas por cogeneración. Los cálculos para el pico de reducción se muestran a continuación.

Reducción
Concentración (M) Intensidad (μA)

0.0E+00	-1.14966
1.0E-05	-1.33759
5.0E-05	-1.44745
1.3E-04	-1.60144
4.0E-04	-1.81458
1.0E-03	-2.23816



En este caso el límite de detección calculado es de $5,03 \times 10^{-5}$.

En la tabla adjunta se muestran los límites de detección calculados para los diferentes sensores de polipirrol modificados con nanopartículas sobre platino.

Tabla 5. Límites de detección, sensibilidad y coeficientes de regresión calculados en el pico anódico y catódico del catecol.

Sensor	E_a (V)	LOD (mol L^{-1})	R^2
Ppy/AuNP-CP- C_{Pt} -Atrapamiento	5,6	$2,60 \times 10^{-5}$	0,977
Ppy/AuNP-CP- C_{Pt} -Atrapamiento	4	$3,62 \times 10^{-5}$	0,983
Ppy/AuNP-CP- C_{Pt} -Cogeneración	5	$2,39 \times 10^{-5}$	0,9757
Ppy/AuNP-CP- C_{Pt} -Cogeneración	0,9	$5,03 \times 10^{-5}$	0,906

Los límites de detección calculados son similares para los dos tipos de electrodos de polipolipirrol modificados con nanopartículas de oro, ligeramente mejores para los obtenidos por atrapamiento. Esto es lógico ya que se ha comprobado que el tamaño de las partículas es muy similar y que se ha observado un comportamiento análogo en los dos electrolitos utilizados.

Cuando los sensores se depositan sobre acero inoxidable, se observa un comportamiento diferente en los sensores de polipolipirrol cuando se introducen en catecol. En este caso se observan el par de picos redox que aparecen

perfectamente definidos correspondientes a los procesos de oxidación/reducción de la orto-dihidroquinona con la transferencia de dos electrones con un potencial anódico de $E_a=0.7\text{ V}$ y el catódico a $E_c=0.5\text{ V}$, como se observa en la figura 55. Se observa que la intensidad en este caso es claramente inferior a la que presenta el polipirrol sobre los electrodos de platino y por ello son visibles los picos del catecol y no los del polipirrol. Comparando estas intensidades con las de los electrodos con nanopartículas depositados con polipirrol, son ligeramente menores. Con lo que sigue observándose un mejor comportamiento.

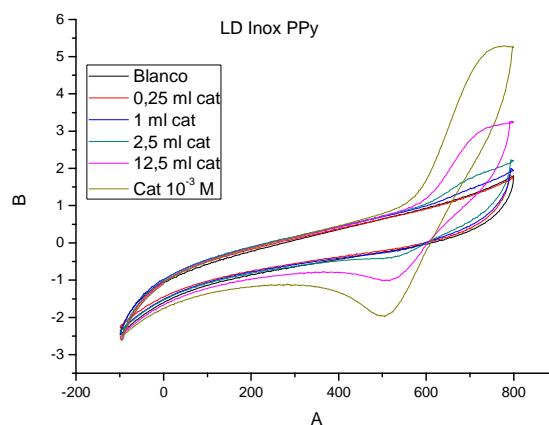
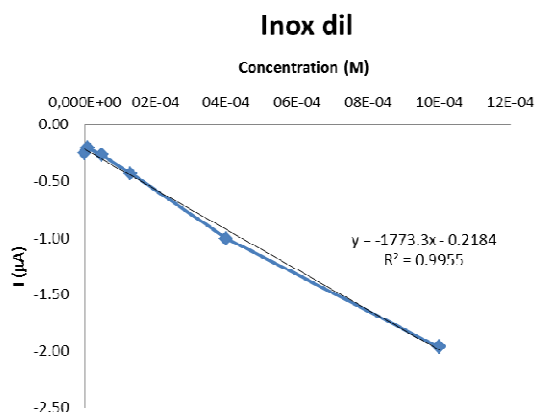


Figura 55: Ensayo en catecol.

De modo análogo se realiza el cálculo del límite de detección para el electrodo de polipirrol depositados sobre acero inoxidable:

Reducción

Concentración (M)	Intensidad (μA)
0.0E+00	-0.25
1.0E-05	-0.21
5.0E-05	-0.27
1.3E-04	-0.43
4.0E-04	-1.01
1.0E-03	-1.96



En este caso el límite de detección calculado es de 6.84E-05

A continuación se analiza el comportamiento de los electrodos de polipirrol con nanopartículas de oro depositados sobre acero inoxidable con objeto de observar el efecto de las nanopartículas, tanto las obtenidas por atrapamiento como las obtenidas por cogeneración.

Los datos obtenidos para el caso de los electrodos de polipirrol con nanopartículas obtenidas por cogeneración sobre acero inoxidable se muestran a continuación. Como en el caso del polipirrol, los picos de oxidación y reducción del catecol son claramente visibles, la intensidad crece ligeramente especialmente para las concentraciones más bajas e igualmente son ligeramente más reversibles con respecto a los electrodos de inoxidable con polipirrol.

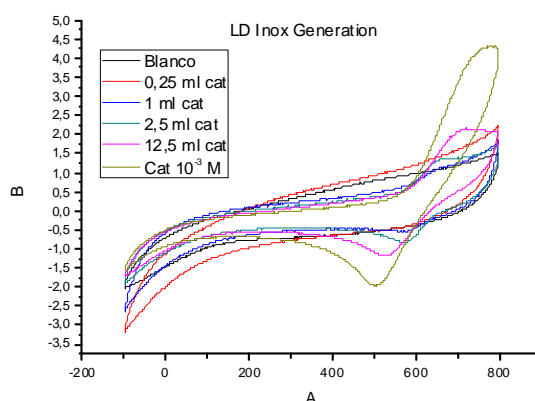
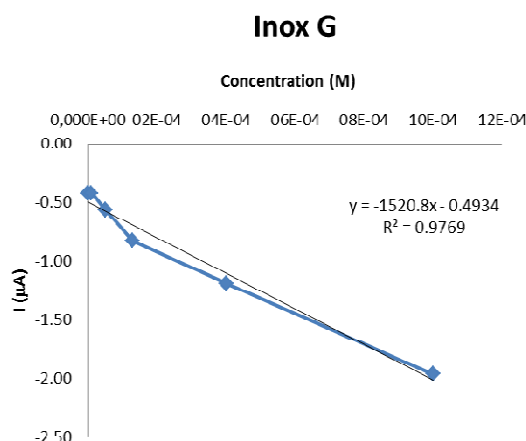


Figura 56: Ensayo en catecol de un electrodo inox generación.

Reducción

Concentración (M)	Intensidad (µA)
0.0E+00	-0.42
1.0E-05	-0.42
5.0E-05	-0.56
1.3E-04	-0.83
4.0E-04	-1.19
1.0E-03	-1.96



En este caso el límite de detección calculado es de 3.42E-05

Se observa por tanto que el límite de detección con nanopartículas también mejora en el caso de los electrodos de acero inoxidable, aunque el efecto no es tan notable como en el caso del platino. A continuación se muestran los resultados para los electrodos de acero inoxidable en los que se ha electrodepositado polipirrol y nanopartículas obtenidas por atrapamiento.

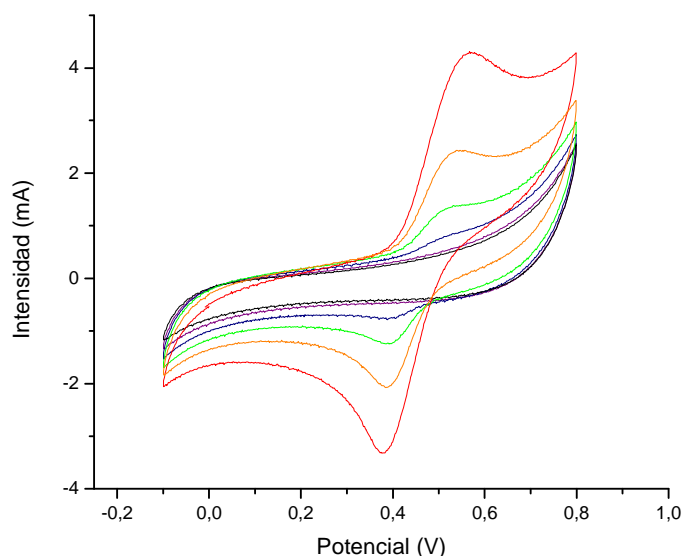
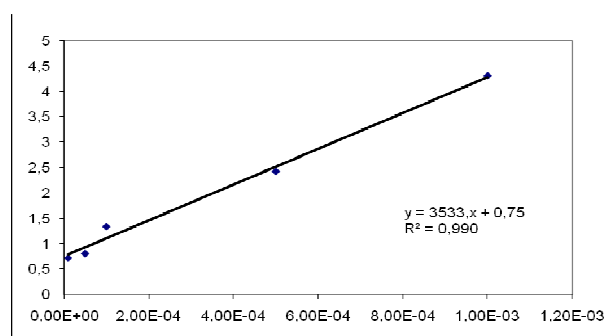


Figura 57: Electrodo de inoxidable con nanopartículas de oro ensayado en diferentes concentraciones de catecol.

Se observa que los picos son ligeramente menos intensos que los observados en las películas de polipirrol con nanopartículas generadas por cogeneración mientras que son claramente más reversibles. El cálculo de límite de detección se presenta a continuación.

OXIDACIÓN	
Concentración (moles/L)	Intensidad del pico (μA)
1,00E-03	4,311
5,00E-04	2,426
1,00E-04	1,341
5,00E-05	0,8109
1,00E-05	0,726

Con estos datos se construye la siguiente gráfica:



Por otro lado, la desviación estándar será:

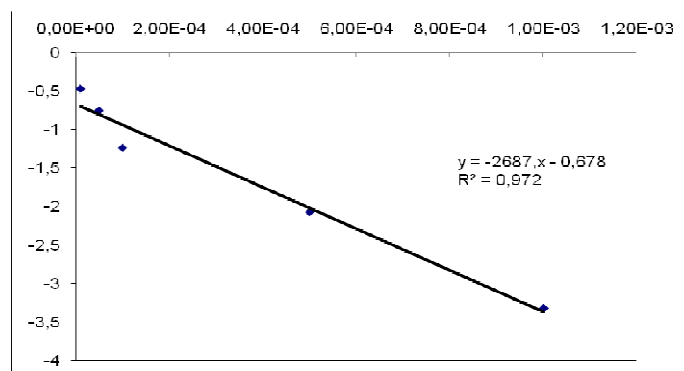
Intensidad (µA)	
0,4384	ciclo1
0,4724	ciclo2
0,4748	ciclo3
0,020358127	Desviación

Utilizando la fórmula nombrada anteriormente, se calcula para este caso un límite de detección de $1,72 \times 10^{-5}$.

Del mismo modo para el pico de reducción:

REDUCCIÓN	
Concentración (moles/L)	Intensidad del pico (µA)
1,00E-03	-3,318
5,00E-04	-2,07
1,00E-04	-1,238
5,00E-05	-0,7541
1,00E-05	-0,4727

Datos con los que se construye la siguiente gráfica:



Y los datos con los que se calcula la desviación típica son:

Intensidad (μA)	
-0,3542	ciclo1
-0,3918	ciclo2
-0,4055	ciclo3
0,026561689	Desviación

En este caso el límite de detección calculado es de $2,96 \times 10^{-5}$.

Por tanto, se observa que las nanopartículas de oro coloidales también mejoran los límites de detección. Y, al igual que ocurría en el caso de los electrodos de platino, el método de inserción de las nanopartículas no afecta a los resultados y solo aparecen pequeños cambios en las intensidades y posiciones de los picos.

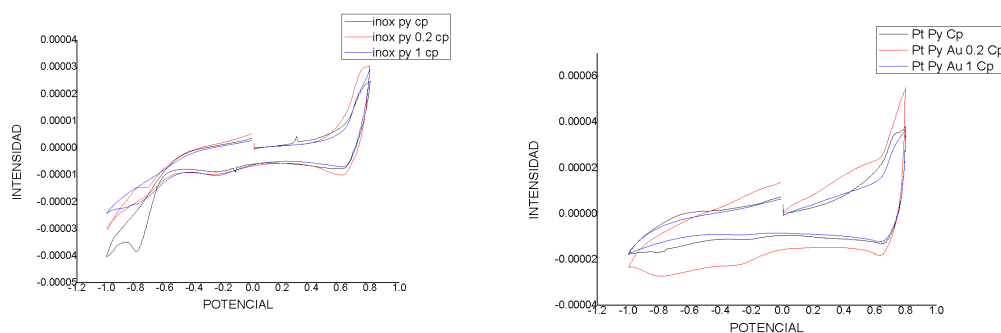
Finalmente decir que la concentración usual de catecol en los mostos obtenidos a partir de uvas está en el rango de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, con lo que de acuerdo con los límites de detección obtenidos resultan adecuados para su uso en mostos.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que el sustrato, la técnica de electropolimerización y especialmente la inserción de nanopartículas en polipirrol juegan un papel crítico en la detección de catecol, siendo menores las diferencias entre los dos modos utilizados para insertar las nanopartículas de oro en la película de polipirrol. La estructura más densa y homogénea de nanopartículas obtenida por cronopotenciometría podría explicar el importante efecto electrocatalítico que se observa, especialmente para electrodos de platino. Decir también que el buffer es un electrolito adecuado para llevar a cabo el análisis de antioxidantes, especialmente para electrodos de acero inoxidable.

4.2.3 DETECCIÓN DE ÁCIDO CAFEICO

A continuación se exponen los resultados obtenidos en la detección de ácido cafeico, otro antioxidante de gran interés en la industria de la alimentación, con ello se pretende corroborar el comportamiento que los sensores de polipirrol han mostrado en catecol.

La respuesta electroquímica de los sensores en ácido cafeico disuelto en cloruro potásico era claramente diferente en el primer ciclo, en el que se observaban un pico anódico y otro catódico asignado a la oxidación/reducción del difenol o-quinona. En los sucesivos ciclos estos picos quedan enmascarados con los típicos picos de oxidación/reducción del polipirrol. En la figura 58 se muestra un ejemplo del voltamograma registrado en el primer ciclo correspondiente a la electrooxidación del ácido cafeico en el que se utilizaron sensores obtenidos por cronopotenciometría y modificados con nanopartículas obtenidas por atrapamiento, en el que la intensidad de los picos es claramente superior tanto en sustratos de platino como de inoxidable cuando se utilizan nanopartículas. El efecto de las nanopartículas es más visible en los electrodos de platino ya que como hemos comentado, los electrodos de acero inoxidable no tienen buen comportamiento electroquímico en presencia de cloruros. En este caso el efecto electrocatalítico, como ocurría con el catecol, es también claramente visible tanto en los electrodos modificados con nanopartículas obtenidas por generación como en los obtenidos por atrapamiento.



Figuras 58: Comparativa de ensayos en ácido cafeico.

Con objeto de mejorar la capacidad de detección de estos electrodos se procedió a utilizar buffer fosfato como electrolito para disolver el ácido cafeico, y se restringió el intervalo de potenciales de la voltametría cíclica para evitar que se produzca en la medida de lo posible la interferencia entre los picos de polipirrol y del antioxidante. Se comprobó que el buffer fosfato es un electrolito más apropiado que el cloruro potásico para la detección de ácido cafeico tal y como ya ocurría en el caso del catecol. Se observó que los picos anódicos y catódicos asociados al antioxidante son mucho más evidentes y se mantienen durante un número mayor de ciclos, también mejora la estabilidad de los electrodos, especialmente en el caso de los sustratos de acero inoxidable. Como también ocurría en catecol, la restricción del rango de potenciales en la voltametría cíclica tiene un efecto muy positivo en la respuesta de los electrodos en la detección de ácido cafeico en buffer para ambos sustratos.

Las figuras 58 muestran el comportamiento de estos electrodos con y sin modificar mediante las dos técnicas de electrodeposición, esto es, cronopotenciometría y cronoamperimetría.

En el caso de los electrodos obtenidos por cronopotenciometría se observa el efecto de las nanopartículas sobre platino y sobre acero inoxidable. En este caso se ha incluido también el comportamiento del electrodo de platino sin polipirrol. Se puede observar que en el caso del electrodo con polipirrol es claramente visible el pico de reducción del cafeico, no así el de oxidación que estará desplazado a potenciales más elevados. La adición de nanopartículas implica una mejora clara en el comportamiento del sensor, los picos de oxidación se observan de una manera más precisa, mucho más intensos y además mucho más reversibles. Una vez más, se consigue un muy buen comportamiento tanto en las nanopartículas obtenidas por atrapamiento (curva azul) como en las obtenidas por generación (curva rosa).

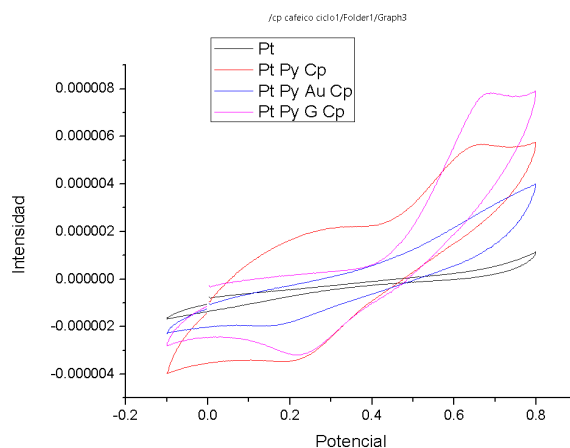


Figura 59: Comparativa del efecto de las nanopartículas en un electrodo de platino.

En el caso de los electrodos de acero inoxidable, en la figura 60 se puede observar un efecto parecido al comentado en el caso de los electrodos realizados sobre platino. La figura 60 muestra una vez más que la presencia de nanopartículas en la capa de polipirrol permite diferenciar los picos redox del ácido cafeico mientras que en el caso de la película de polipirrol, el pico de oxidación del polipirrol en torno a 0.2V impide detectar el pico de oxidación del ácido cafeico en los electrodos con película de polipirrol sin nanopartículas. En este caso también se observa que la presencia de nanopartículas por atrapamiento (curva azul) y por generación (curva rosa) permite obtener los picos de oxidación y reducción del ácido cafeico mucho mejor definidos y ligeramente más intensos.

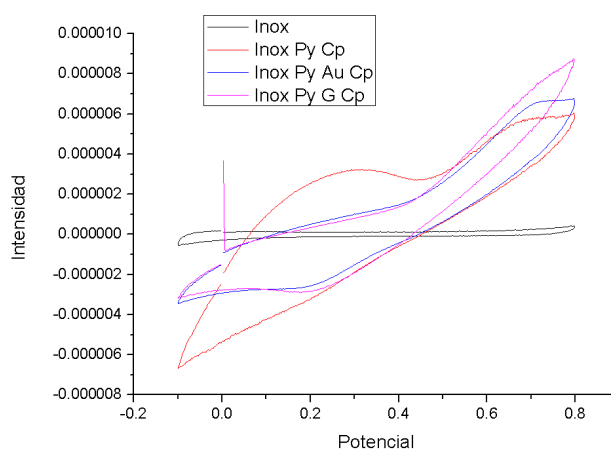


Figura 60: Efecto de las nanopartículas en un electrodo de inoxidable.

En el caso de los electrodos obtenidos por cronoamperimetría el efecto de las nanopartículas es mucho menos evidente, apenas hay diferencias entre las respuestas obtenidas por los electrodos con y sin modificar. En la figura 61 se muestra el comportamiento de los electrodos de platino con la capa de polipirrol (negro) en los que se observan los picos redox del ácido cafeico claramente definidos y un similar comportamiento de los electrodos de polipirrol (rojo) en los electrodos con nanopartículas por atrapamiento. No se observa efecto electrocatalítico en los electrodos con composites obtenidos por generación, sin embargo cuando se aumenta la concentración de nanopartículas en relación 1:3 (pirrol:cloroaúrico) se observa un claro efecto electrocatalítico, con un aumento muy notable de las intensidades de los picos, especialmente de oxidación.

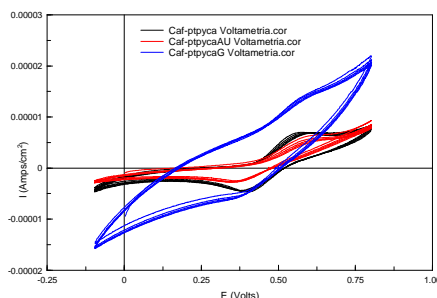


Figura 61. Comparativa del efecto de las nanopartículas sobre un electrodo de platino depositadas por cronoamperimetría.

El comportamiento de los electrodos de inoxidable es muy similar, en este caso también se observa que el aumento de la concentración de ácido cloroaúrico tiene un efecto muy positivo en el caso de las nanopartículas obtenidas por cogeneración.

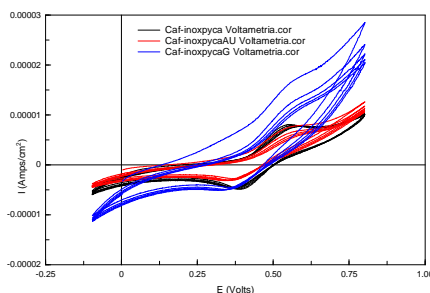


Figura 62. Comparativa del efecto de las nanopartículas sobre un electrodo de acero inoxidable depositadas por cronoamperimetría.

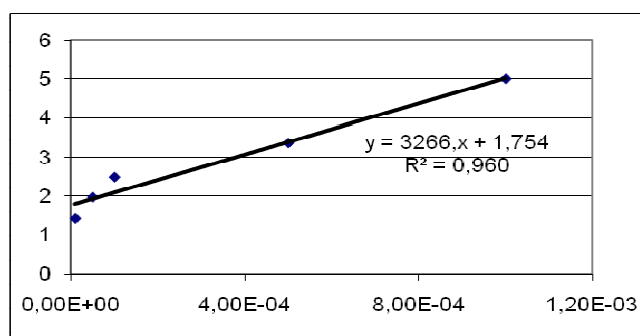
De acuerdo con estos resultados podemos concluir que la técnica de electropolimerización juega un papel decisivo en el comportamiento del sensor. La mayor densidad y la distribución más homogénea de nanopartículas originada por cronopotenciometría, observada por microscopía electrónica, explican el efecto electrocatalítico observado. Cuando se utiliza la cronoamperimetría sobre acero inoxidable se necesita un incremento de la concentración de nanopartículas para poder apreciar este efecto.

A continuación se exponen los resultados de los cálculos realizados para determinar los límites de detección del ácido cafeico para ambos sustratos, platino y acero inoxidable, con películas de polipirrol sin modificar y modificadas con nanopartículas de oro, obtenidas por cogeneración utilizando como técnica de electrodeposición la cronopotenciometría que es la que ha dado mejores resultados.

En el caso de los electrodos de polipirrol sobre platino se obtienen los siguientes resultados:

**ELECTRODO PT
POLIPIRROL:**

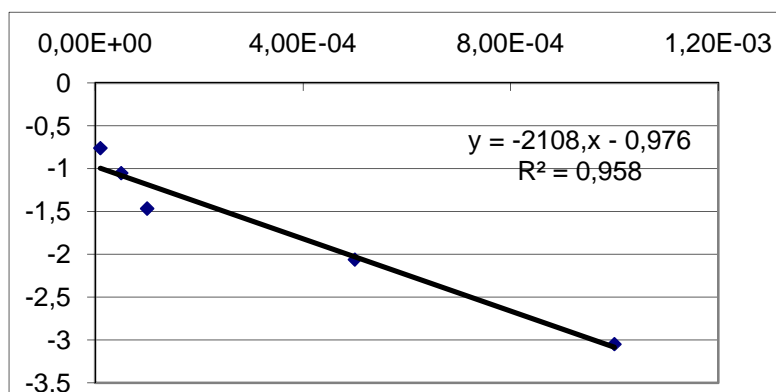
Pico Oxidación			
Concentración	Intensidad	Desviación	
1.00E-03	4.997	0.9744	ciclo1
5.00E-04	3.36	1.078	ciclo2
1.00E-04	2.478	1.151	ciclo3
5.00E-05	1.958	0.088740746	
1.00E-05	1.402		



Con estos resultados el LOD del electrodo de platino con película de polipirrol para el ácido cafeico en el pico de oxidación es **8.15 E-05 M**.

Pico Reducción:

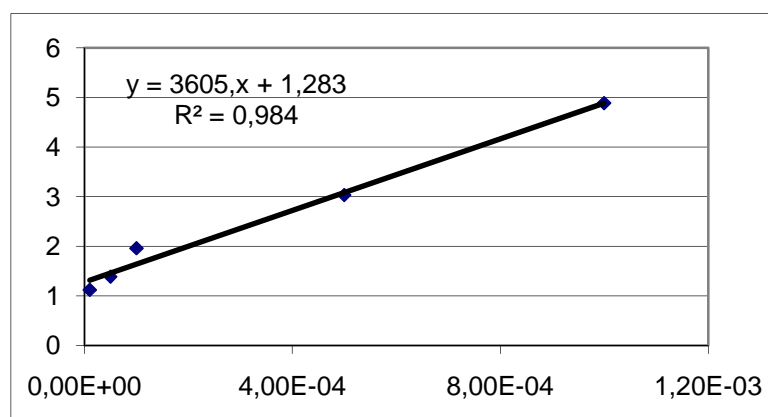
Concentración	Intensidad	Desviación
1.00E-03	-3.046	-0.599
5.00E-04	-2.06	-0.612
1.00E-04	-1.465	-0.624
5.00E-05	-1.051	0.012503333
1.00E-05	-0.7596	



Con estos resultados el LOD del electrodo de platino con película de polipirrol para el ácido cafeico en el pico de reducción es **1.78 E-05**.

En el caso de los electrodos de polipirrol modificado con nanopartículas obtenidas por cogeneración sobre platino se obtienen los siguientes resultados:

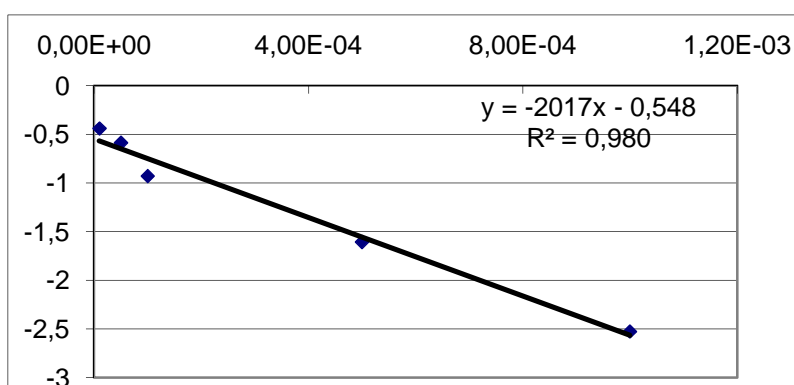
Electrodo Pt Polipirrol Generación	Pico oxidación			
	Concentración	Intensidad	Desviación	
	1.00E-03	4.888	0.9063	ciclo1
	5.00E-04	3.036	0.8999	ciclo2
	1.00E-04	1.964	0.9634	ciclo3
	5.00E-05	1.391	0.034960978	
	1.00E-05	1.125		



Con estos resultados el LOD del electrodo de platino con película de polipirrol modificada con nanopartículas de oro obtenida por generación para el ácido cafeico en el pico de oxidación es: **2.90E-05 M.**

Pico Reducción

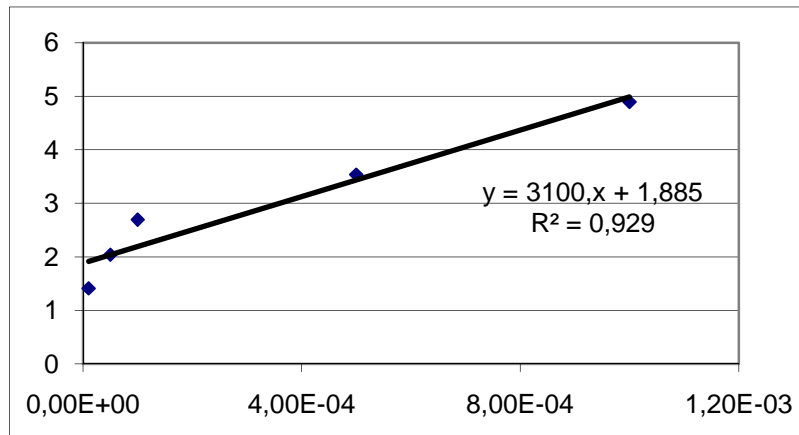
Concentración	Intensidad	Desviación
1.00E-03	-2.527	-0.665
5.00E-04	-1.607	-0.644
1.00E-04	-0.93	-0.6534
5.00E-05	-0.587	0.010519189
1.00E-05	-0.44	



Con estos resultados el LOD del electrodo de platino con película de polipirrol modificada con nanopartículas de oro obtenida por generación para el ácido cafeico en el pico de reducción es: **1.56E-05 M.**

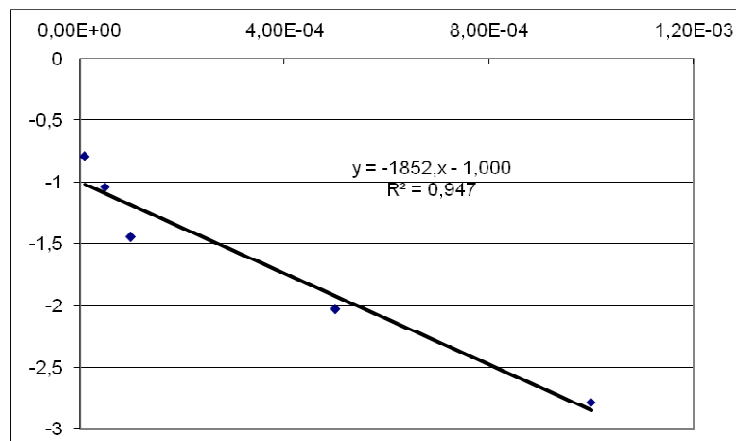
En el caso de los electrodos de polipirrol sobre acero inoxidable se obtienen los siguientes resultados:

Electrodo Polipirrol	Inox	Pico Oxidación		
		Concentración	Intensidad	Desviación
		1.00E-03	4.891	0.926
		5.00E-04	3.535	1.064
		1.00E-04	2.695	1.127
		5.00E-05	2.04	0.102805642
		1.00E-05	1.412	



Con estos resultados el LOD del electrodo de acero inoxidable con película de polipirrol para el ácido cafeico en el pico de oxidación es **9.94765E-05**.

Pico Reducción		
Concentración	Intensidad	Desviación
1.00E-03	-2.782	-0.665
5.00E-04	-2.026	-0.644
1.00E-04	-1.441	-0.601
5.00E-05	-1.039	0.032624122
1.00E-05	-0.788	



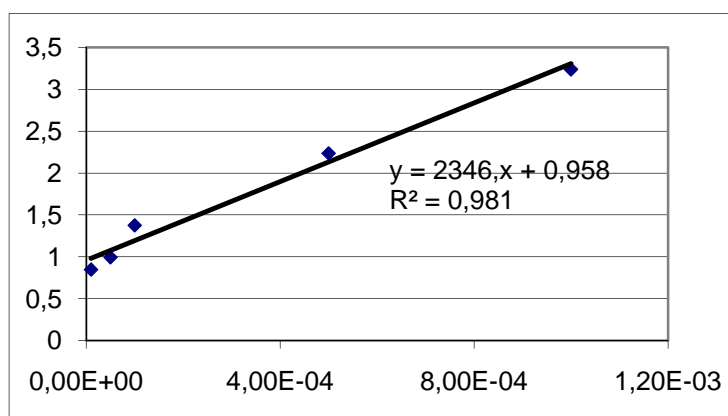
Con estos resultados el LOD del electrodo de platino con película de polipirrol para el ácido cafeico en el pico de reducción es **5.28E-05**.

En el caso de los electrodos de polipirrol modificado con nanopartículas obtenidas por cogeneración sobre acero inoxidable se obtienen los siguientes resultados:

**Electrodo Inox
Polipirrol
Generación**

Pico Oxidación

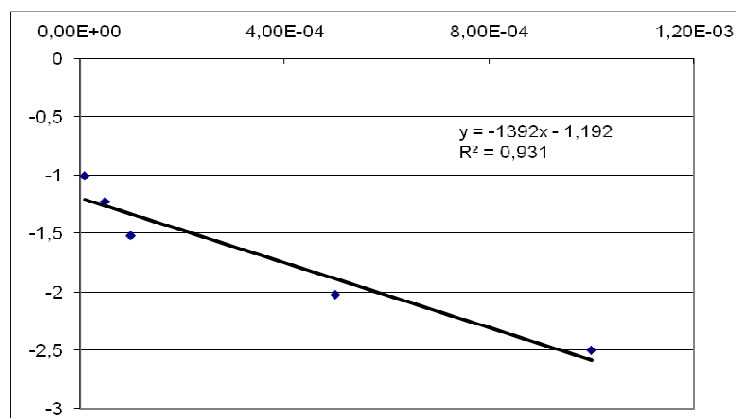
Concentración	Intensidad	Desviación	
1.00E-03	3.24	0.2587	ciclo1
5.00E-04	2.236	0.2845	ciclo2
1.00E-04	1.374	0.3087	ciclo3
5.00E-05	0.9918	0.025004266	
1.00E-05	0.8449		



Con estos resultados el LOD del electrodo de acero inoxidable con película de polipirrol modificada con nanopartículas de oro obtenida por generación para el ácido cafeico en el pico de oxidación es: **3.19E-05 M**.

Pico Reducción

Concentración	Intensidad	Desviación
1.00E-03	-2.502	-0.665
5.00E-04	-2.024	-0.644
1.00E-04	-1.518	-0.656
5.00E-05	-1.224	0.010535654
1.00E-05	-1.005	



Con estos resultados el LOD del electrodo de acero inoxidable con película de polipirrol modificada con nanopartículas de oro obtenida por generación para el ácido cafeico en el pico de reducción es: **2.27 E-05 M**.

En la tabla adjunta se muestran los resultados:

Tabla 7: Límites de detección, sensibilidad y coeficientes de regresión calculados en el pico anódico y catódico del cafeico.

Sensor	E_a (V)	LOD (mol L ⁻¹)	R^2
Ppy-Cp-Pt	0,64	8,15E-05	0,96
Ppy-Cp-Pt	0,54	1,78E-05	0,958
Ppy-Cp-Inox	0,65	9,94E-05	0,929
Ppy-Cp- Inox	0,5	5,28E-05	0,947
Ppy/AuNP-CP-C _{Pt} -Cogeneración	0,65	2,91E-05	0,984
Ppy/AuNP-CP-C _{Pt} -Cogeneración	0,48	1,56E-05	0,98
Ppy/AuNP-CP-C _{Inox} -Cogeneración	0,45	3,19E-05	0,981
Ppy/AuNP-CP-C _{Inox} -Cogeneración	0,25	2,27E-05	0,931

Como resumen de lo anterior podemos decir que todos los límites de detección son del mismo orden de magnitud y muy por debajo de las concentraciones de ácido cafeico en mostos y vinos, con lo que todos ellos

resultarían útiles para en la detección de este compuesto. Para todos los electrodos fabricados mediante cronopotenciometría se observa que la adición de nanopartículas por cogeneración mejora el comportamiento del sensor obteniéndose límites de detección más bajos. Las diferencias entre los dos sustratos son escasas pero en todos los casos se han encontrado límites de detección algo menores para los electrodos con sustrato de platino. Los límites de detección son del mismo orden de magnitud que los obtenidos para catecol.

4.3 BIOSENSORES DE PIRROL MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Una vez que ha sido comprobada la utilidad de los sensores de polipirrol sobre los dos sustratos en la detección de antioxidantes como cafeico y catecol y una vez que se ha comprobado el efecto electrocatalítico de las nanopartículas de oro se estudia el comportamiento de nuestros sensores, a los que además se les coloca una enzima con objeto de hacerlos selectivos para la detección de antioxidantes. Para ello se utiliza tirosinasa como enzima para la detección de fenoles, y para la detección de azúcares se utiliza la glucosa oxidasa. Debemos tener en cuenta que el contenido en polifenoles y en azucares es básico en la caracterización de los mostos y vinos, que serán estudiados en el siguiente apartado del trabajo.

4.3.1 BIOSENSORES CON TYROSINASA

En el caso de los biosensores con tirosinasa en la figura 63 podemos apreciar a partir del estudio de voltametría cíclica en buffer fosfato y en una disolución de catecol 10^{-3} M, como el sensor es capaz de distinguir claramente el catecol. Podemos observar un claro desplazamiento del pico de oxidación del polipirrol a potenciales más altos y la aparición de un nuevo pico de reducción,

no presente en la voltametría cíclica en buffer, sobre 0.3V correspondiente a la reducción del catecol. En este caso se muestra el comportamiento de un sensor obtenido por cronopotenciometría sobre sustrato de inoxidable y con nanopartículas de oro obtenidas por generación. Este comportamiento es igualmente visible para el resto de electrodos. Vemos que en este caso, a diferencia de lo que ocurría con los sensores sin enzima, no es necesario reducir el rango de potenciales para observar los picos redox del catecol y que además las intensidades son mucho más altas.

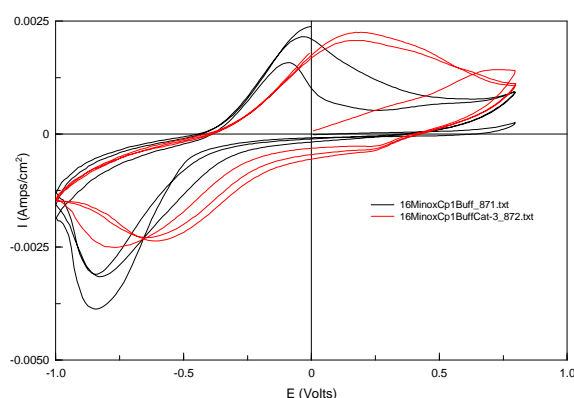


Figura 63: Estudio de biosensores en catecol.

Con objeto de mejorar la respuesta de estos biosensores se reduce el rango de potenciales en la voltametría cíclica en disolución de catecol en buffer. En la figura 64 podemos observar claramente los picos de oxidación y reducción del catecol, ahora sin la interferencia del polipirrol. Se observa un pico anódico a 0.65V y uno de reducción a 0.35V.

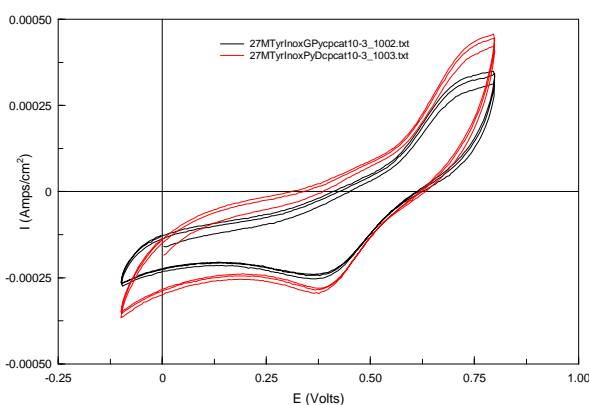


Figura 64 Estudio de biosensores en catecol con rango de potencial restringido

En la figura 65 se observa también el efecto electrocatalítico de las nanopartículas obtenidas por generación utilizando la cronopotenciometria como técnica de electrodeposición que también en este caso es la que da lugar a mejores resultados. Hay un aumento de intensidad en los picos anódicos y catódicos y una ligera mejora en la reversibilidad.

Con objeto de observar su capacidad de reutilización, los biosensores se volvieron a ciclar en buffer, la figura muestra la ausencia de picos del catecol siendo solo visibles los picos del polipirrol. Apenas existen diferencias entre los electrodos modificados y sin modificar en lo que respecta a su comportamiento electroquímico en buffer.

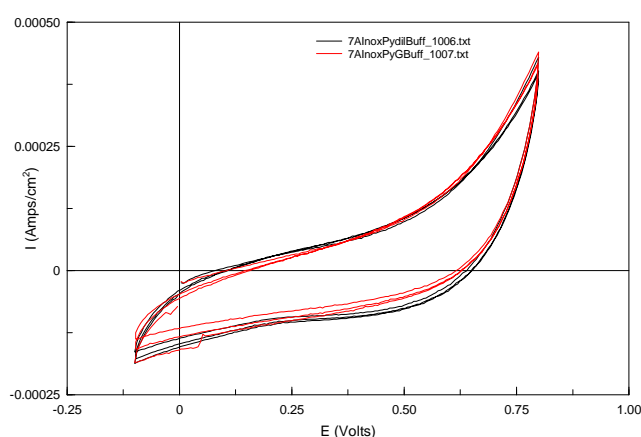


Figura 65. Biosensores en buffer después de ser usados en catecol

Posteriormente se ciclaron estos mismos sensores en una disolución de catecol 10^{-3} M para conocer su capacidad de reutilización. Los electrodos habían sido almacenados en frío durante diez días. En la figura 66 podemos observar como son capaces de detectar claramente los picos de oxidación y reducción del catecol.

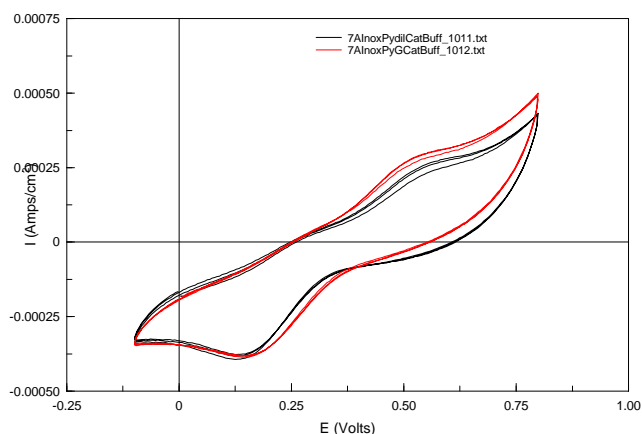


Figura 66. Biosensores recuperados y ensayados de nuevo en catecol.

Se observa una ligera disminución de la intensidad de corriente y un desplazamiento de los picos a potenciales más bajos. Ahora el pico de oxidación está sobre 0.50V y el de reducción sobre 0.15V. Se sigue observando un ligero efecto electrocatalítico debido a las nanopartículas de oro obtenidas por generación sobre el electrodo de acero inoxidable. El comportamiento de los biosensores sobre platino es muy parecido al comentado anteriormente.

4.3.2 BIOSENSORES CON GLUCOSA OXIDASA

Para la detección de azúcares es necesario añadir al sensor de polipirrol, con y sin nanopartículas de oro, un enzima que en nuestro caso será la glucosa oxidasa con lo que trataremos de detectar glucosa en disolución de buffer $20 \times 10^{-3} \text{M}$.

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 67.

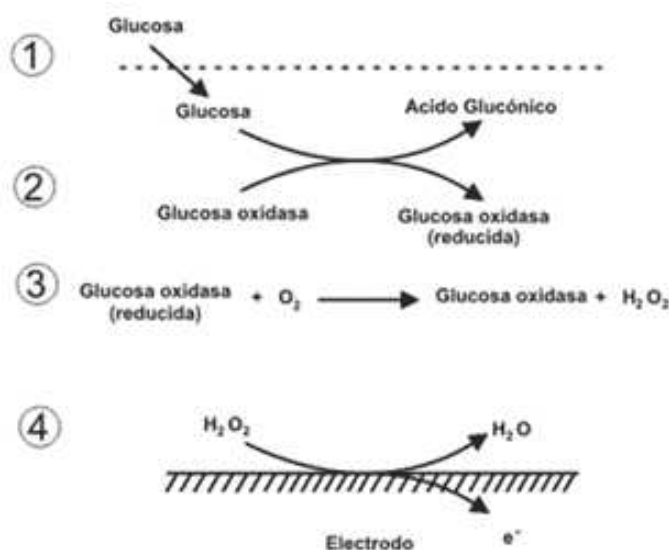


Figura 67: Reacción enzimática de la Glucosa Oxidasa (GOx).

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 67. 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.

Por tanto es esperable que un aumento en la concentración de glucosa genere una disminución del pico de reducción. En este caso se ha trabajado con una concentración de glucosa muy alta, esto hace que como podemos observar en las figuras adjuntas apenas se aprecie el pico de reducción. En los voltamogramas observamos sólo el pico de oxidación y no el de reducción del oxígeno que prácticamente no existe, debido a la gran cantidad de glucosa en disolución.

Se realizaron biosensores sobre platino y sobre acero inoxidable, con polipirrol y modificados con nanopartículas de oro utilizando como técnicas la cronopotenciometría y la cronoamperimetría.

En la figura 68 se muestra el voltamograma observado en los biosensores de platino depositados por cronoamperimetría en glucosa $20 \times 10^{-3} \text{M}$.

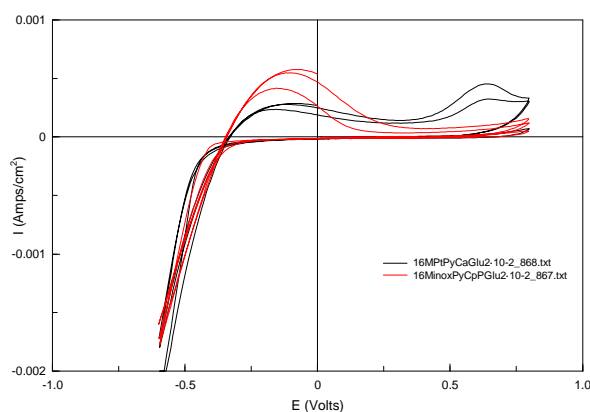


Figura 68. Biosensores obtenidos por cronoamperimetría en disolución de glucosa

En el caso del biosensor de polipirrol se observan dos picos catódicos, un pico de oxidación sobre -0.15V , que está en el rango usual de la oxidación para la glucosa, y otro a potenciales mucho más elevados que debe corresponder al polipirrol. En el caso del sensor modificado con nanopartículas no se observa el segundo pico de oxidación, pero el existente a potenciales negativos es mucho más intenso, lo que podría corresponder con un efecto electrocatalítico de las nanopartículas de oro. La figura 69 muestra el comportamiento de los biosensores de acero inoxidable en los que la película de polipirrol se ha depositado por cronoamperimetría.

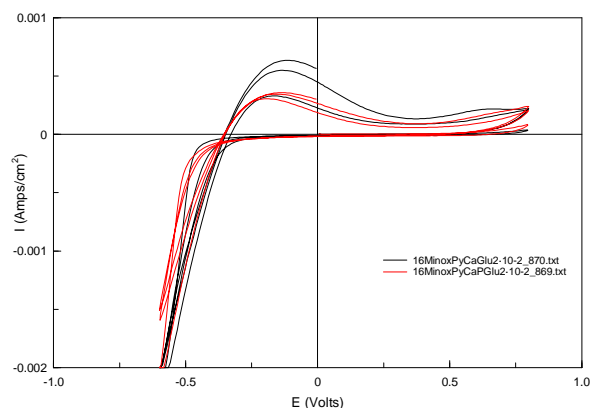


Figura 69. Biosensores obtenidos por cronoamperimetría en disolución de glucosa

En el voltamograma correspondiente a la película de polipirrol se observa como en el caso anterior, dos picos si bien con intensidades claramente menores que las mostradas en el electrodo de platino, especialmente en el segundo pico de oxidación, a potenciales más elevados correspondientes a la oxidación del polipirrol. Sin embargo en este caso se observa que las nanopartículas de oro no tienen un efecto electrocatalítico, sino que al contrario de lo que ocurría en los biosensores sobre platino, las intensidades de corriente son menores cuando el electrodo se modifica con nanopartículas. Esto concuerda con el ya comentado mal comportamiento electroquímico de los sensores modificados con nanopartículas que se han depositado sobre acero inoxidable por cronoamperimetría.

En el caso de los biosensores depositados por cronopotenciometría se observa un claro incremento de las densidades de corriente para ambos sustratos, platino y acero inoxidable.

En la figura 70 observamos el comportamiento de los biosensores de platino, debemos tener en cuenta que aunque el rango de medida no es más adecuado, si se observa un pico de oxidación a potenciales negativos sobre -0.1V que suele ser el potencial típico de oxidación, no se observa el pico de reducción probablemente por la alta concentración de glucosa en la solución sólida que

consume la mayor parte del oxígeno presente en la disolución. En los electrodos con nanopartículas el pico aparece desplazado a potenciales mayores pero es mucho más intenso.

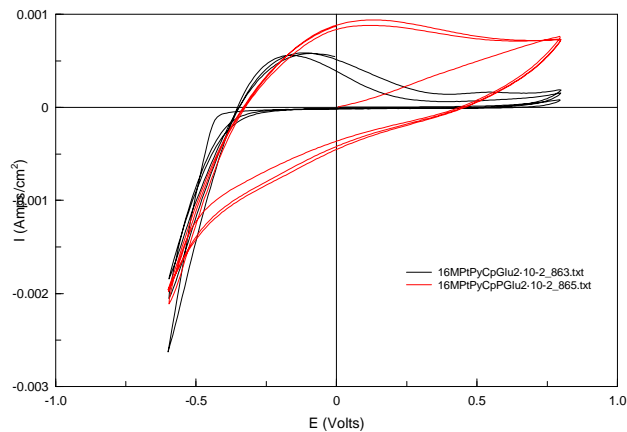


Figura 70. Biosensores obtenidos por cronopotenciometría sobre platino en disolución de glucosa

En el caso de los biosensores de acero inoxidable el comportamiento es similar como se observa en la figura 71.

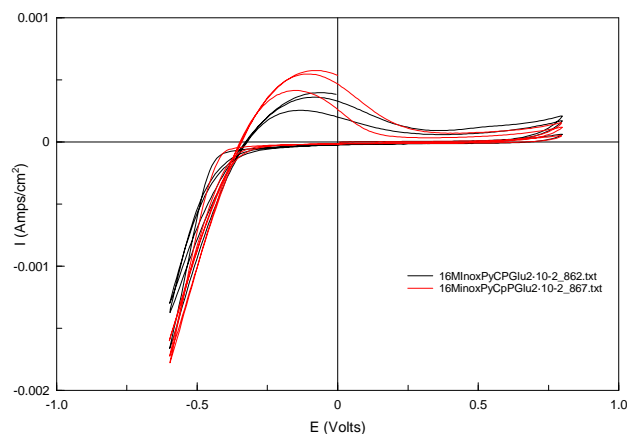


Figura 71 Biosensores obtenidos por cronopotenciometría sobre acero inoxidable en disolución de glucosa

Se observa un pico de oxidación sobre -0.20 V en el primer ciclo, que se desplaza ligeramente a potenciales más positivos al ciclar. Tampoco se observa el pico de reducción. En este caso las nanopartículas también originan un

incremento de intensidad aunque no tan notable como en los biosensores de platino, si bien en este caso el potencial apenas se modifica respecto a los electrodos sin modificar, sobre -0.1V. Comparando con los biosensores de platino, los electrodos de inoxidable tienen menores intensidades de corriente aunque los potenciales se sitúan en el mismo rango de potencial. Por tanto para su uso en el análisis de mostos se fabricarán electrodos de platino y de acero inoxidable con y sin modificar depositados por cronopotenciometría para crear la red.

4.4. RED DE SENSORES

Este apartado es de los más importantes del trabajo, ya que aquí se evalúa la respuesta de la red de sensores y biosensores desarrollada a lo largo del trabajo ante varios tipos de mostos con distintas características, y por ello, con composición química diferente. Previsiblemente las diferencias en las características de las diferentes variedades permitirán que la señal electroquímica obtenida en los sensores varíe en función del distinto contenido de azúcares y polifenoles de cada mosto. Así que mediante los diferentes ensayos en mostos y su posterior análisis estadístico se comprobará si los sensores son capaces de diferenciar las distintas variedades de mostos.

Para llevar a cabo este estudio se han seleccionado tenido en cuenta los resultados de análisis de polifenoles de los apartados previos sensores de polipirrol depositados sobre sustratos de platino y de acero inoxidable utilizando como técnica la cronopotenciometría, también se han seleccionado sensores modificados por nanopartículas de oro obtenidos por cogeneración mediante cronopotenciometría.

Una vez realizado el estudio de las distintas variables que afectan a la fabricación del electrodo y comprobada su estabilidad y capacidad de detectar antioxidantes y azúcares, se realizaron voltametría cíclicas a cada una de las muestras de mostos bajo estudio. Dada la baja conductividad del mosto, los

resultados obtenidos mostraban una intensidad de corriente que no era lo suficientemente alta como para diferenciar los datos con el análisis estadístico, y siendo difícil establecer si los pequeños picos presentados se deben a los procesos redox del polímero o de la muestra de mosto estudiada. Esta pobre resolución puede ser atribuida a la obstrucción del intercambio iónico en la interfase sensor/mosto, debida a la alta concentración de componentes químicos de gran tamaño presentes en el mosto (ácidos orgánicos, esteres, compuestos polifenólicos...) que pueden dificultar el movimiento de los iones que son origen de las señales voltamétricas de los sensores. En la figura 72 se muestra uno de los voltamogramas obtenidos en los mostos sin diluir, en este caso se trata de la variedad Prieto Picudo.

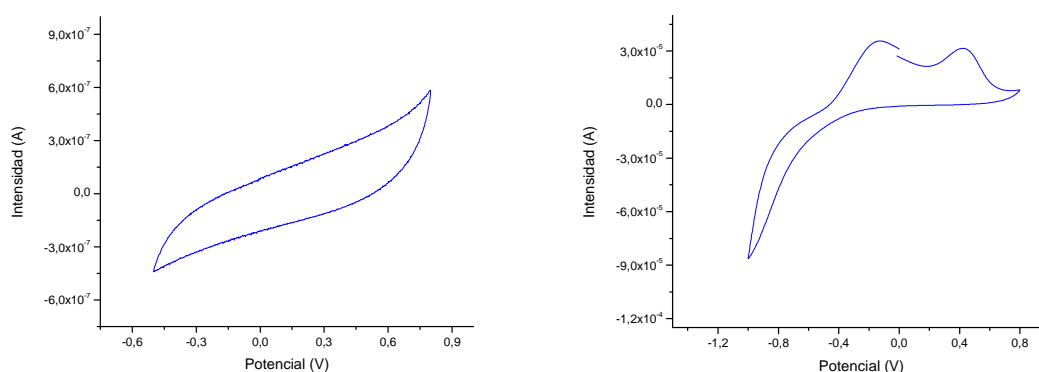


Figura 72: Comparativa de la señal recibida con un sensor PlatinoGeneración en un mosto de la variedad Prieto Picudo, sin diluir con un electrolito (izquierda) y diluido al 50% con KCl 0,3 M (derecha).

Por ello cada muestra de mosto se diluyó al 50% con una disolución de cloruro de potasio 0,3M, añadiendo un electrolito que facilita la difusión de iones en la matriz polimérica. Las medidas tenían como condiciones un barrido de 5 ciclos, a una velocidad de 0,1 V/s, dentro de un rango de potencial comprendido entre -1 V y 0,8 V. Las medidas se realizaron con los sensores Platino-pirrol, Inox-pirrol, PlatinoGeneración, InoxGeneración, y con biosensores, es decir, con la base de sensores anteriores modificados con distintas enzimas, haciendo un total

de 12 electrodos diferentes. Como se ha comentado en el apartado del procedimiento experimental, las seis variedades de mostos estudiadas son: Garnacha, Cabernet, Mencía regadío, Mencía seco, Juan García y Prieto Picudo.

En los distintos ensayos no se pueden distinguir procesos redox individuales que puedan ser atribuidos a los distintos componentes del mosto, sino que los procesos redox observados en los voltamogramas son debidos a transformaciones redox propias del sensor que se ven afectados por los diferentes componentes del mosto. Se observa como se detalla a continuación que las respuestas de cada uno de los sensores son ligeramente diferentes y que también son características de cada una de las variedades de mosto en estudio, tanto en el caso de sensores sin enzimas como en el caso de biosensores.

4.4.1. DETECCIÓN DE MOSTOS CON SENSORES SIN ENZIMAS:

Los mostos son bebidas con una composición química compleja (diferente pH, concentración de azúcares, fenoles, iones, etc.) y a esto hay que añadir la interacción con la electroquímica con los distintos tipos de electrodo. Como consecuencia de ello, se obtendrán respuestas voltamétricas variadas, que se comentarán en este apartado. Hay que recordar que el objetivo de la red de sensores es recopilar la información necesaria para la discriminación y clasificación de los mostos estudiados.

Para ilustrar la respuesta de los sensores se presentarán las gráficas, respuestas obtenidas en los ensayos de los diferentes mostos.

Por un lado los sensores responden de manera distinta ante el mismo tipo de mosto, siendo un punto favorable para utilizar una red de sensores, en vez de utilizarlos de manera individual para hacer estas mediciones. La variedad de respuesta de los sensores evidencia la alta selectividad cruzada de la red. En la *figura 73* se ven claramente las diferentes señales que nos aportan cada uno

de los sensores para el tipo de uva Prieto Picudo, donde se pueden observar los picos del barrido anódico correspondientes al modelo polarón/bipolarón de la oxidación del polipirrol.

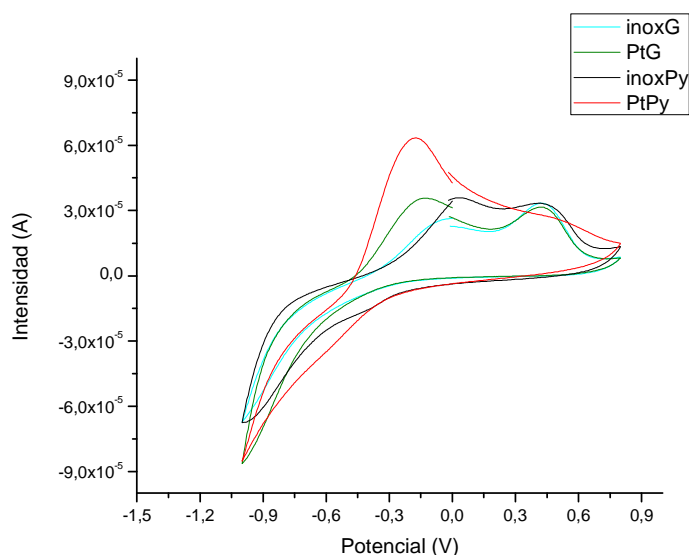


Figura 73: Respuesta voltamétrica de los diferentes sensores en un mosto del tipo Prieto Picudo diluido al 50% con KCl 0,3M.

Con todos los sensores es posible detectar la primera oxidación en un potencial en torno a -0,15 V, si bien se puede observar que los electrodos de sustrato de platino comienzan dicha oxidación en un potencial algo menor, en torno a -0,2 V, y en los de acero inoxidable la oxidación ocurre en un potencial de 0,1 V. Esto puede ser debido al efecto catalítico del platino. Ésta no es la única diferencia entre los electrodos de diferente sustrato, ya que la respuesta de los electrodos de platino tiene unos picos de intensidad un tanto mayores. Como se puede observar, el electrodo de platino polipirrol es el que presenta una mayor intensidad en la oxidación del polarón, aunque la oxidación del bipolarón es menos distinguible que en el resto de electrodos. Dicha oxidación del bipolarón ocurre para un mismo potencial para los distintos electrodos, en torno a 0,45 V.

Respecto a los electrodos modificados con nanopartículas, si bien no presentan un incremento de intensidad general respecto a los electrodos de polipirrol, como se ha observado en su respuesta ante los diferentes analitos, si se puede observar que diferencian mejor los dos procesos de oxidación, delimitando mucho mejor el pico anódico de potenciales más elevados.

Es destacable que los datos más interesantes están en el barrido de oxidación, ya que aunque se puede intuir un inicio de procesos de reducción, no son lo suficientemente diferenciables como para realizar el análisis estadístico sobre ellos. Por ello será el barrido anódico el que utilizaremos en el estudio estadístico.

Teniendo en cuenta otra variedad de uva, como por ejemplo Mencía Regadío, *figura 74*, se observan diferencias entre los voltamogramas de unos sensores y otros en cuanto a las posiciones de los picos y las intensidades de corriente de los mismos (como en el resto de variedades los picos más intensos corresponden a los electrodos con sustrato de platino). Lo cual justifica que utilizando todos ellos en conjunto, se obtendrá mayor información de la muestra objeto de estudio.

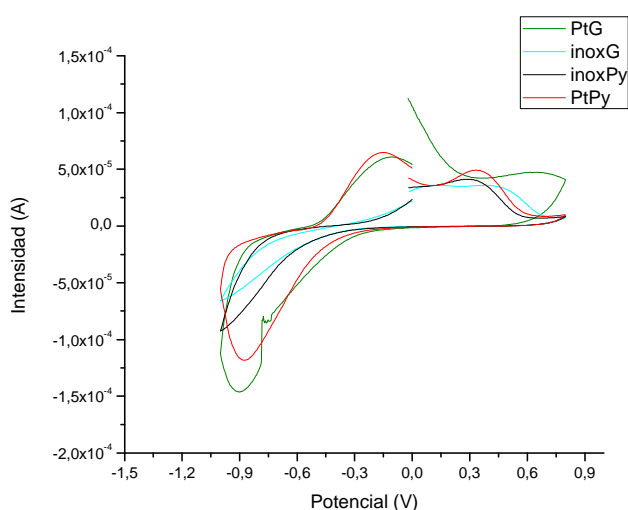


Figura 74: Respuesta voltamétrica de los diferentes sensores en un mosto del tipo Mencía Regadío diluido al 50% con KCl 0,3M.

Se puede apreciar que en este caso la oxidación del polipirrol (en torno a -0,15 V) es detectada por los sensores de platino con y sin modificar de una forma mucho más notable que por los sensores de acero inoxidable. En estos últimos la oxidación ocurre de forma a potenciales mayores, y con unos picos de intensidad menores. Se observa que también para el resto de variedades se aprecian diferencias entre los distintos sensores en cuanto a posición e intensidad de los picos de oxidación fundamentalmente lo que justifica en principio su utilización para la fabricación de la red de sensores.

Con objeto de observar la capacidad de distinción de los sensores de polipirrol con y sin modificar de las distintas variedades utilizadas en el trabajo nos proponemos a continuación realizar un estudio comparativo de la respuesta obtenida en el mismo sensor para las seis variedades en estudio.

Para ello en la figura 75 superponemos las respuestas de todos los mostos ante un mismo sensor comprobando si la señal varía en función de la cantidad de azúcares y antioxidantes que tienen las muestras. En este caso se trata de la respuesta del sensor de polipirrol modificado con nanopartículas por generación utilizando cronopotenciometría sobre sustrato de platino.

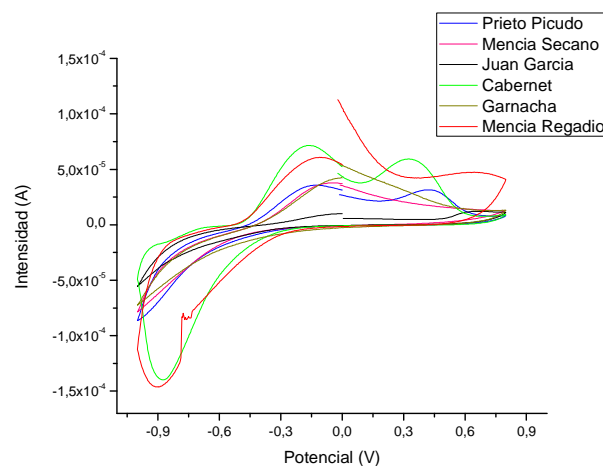


Figura 75: Respuesta voltamétrica de los diferentes mostos utilizando un electrodo Platino-Generación.

Se observa que todos los sensores dan un pico de oxidación en torno a -0,15 V referente a la oxidación del polipirrol. Es destacable la aparición de un pico de reducción de mayor intensidad en las variedades Cabernet y Mencía Regadío, en torno a -0,9 V. La principal diferencia entre el resto de los mostos es la intensidad de los picos redox. Es de notar el caso de la variedad Juan García, con una intensidad mucho menor que el resto.

Respecto al resto de sensores, como se aprecia en la figura 76, todos son capaces de detectar la oxidación del polipirrol, aunque particularmente los electrodos de acero inoxidable tienen cierta dificultad en la detección del bipolarón, ya sea porque muestran menor intensidad o porque el pico resulta menos distinguible. Los electrodos de platino, además de mostrar una diferencia más clara entre los picos del polarón y bipolarón, muestran un proceso de reducción en torno a -0,9 V que no es visible en el caso de los sensores con sustrato de acero inoxidable.

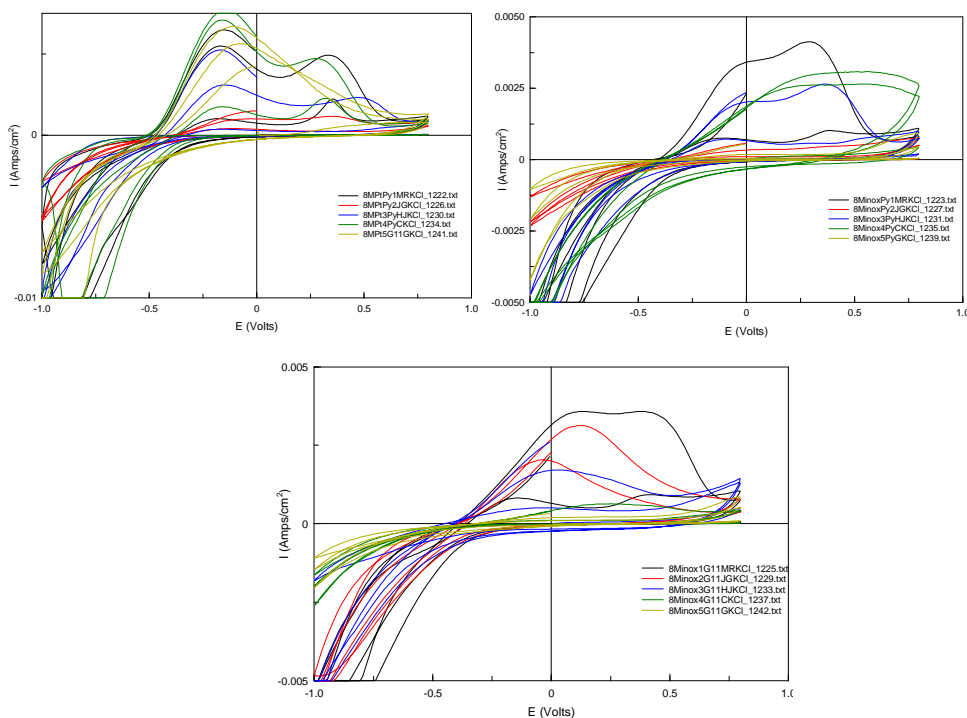


Figura 76: Respuestas voltamétricas de los diferentes mostos utilizando un electrodo Platino-pirrol (arriba izquierda), un electrodo de Inox-pirrol (arriba derecha) y un electrodo de InoxGeneración (abajo).

De acuerdo con lo anterior parece que los sensores sin enzima dan respuestas voltamétricas ligeramente diferentes en las distintas variedades de mostos y por tanto se utilizarán estas para el estudio estadístico.

4.4.2 DETECCIÓN DE MOSTOS CON BIOSENSORES MODIFICADOS CON TIROSINASA

En este apartado se muestran las respuestas obtenidas al analizar los mostos con los biosensores, es decir, con los sensores tratados anteriormente pero modificados mediante la adición de la enzima tirosinasa que como ya se ha comentado los hace selectivos para la detección de polifenoles.

A modo de ejemplo se muestran en la figura 77 las curvas voltamperométricas de los distintos sensores midiendo un mosto de la variedad Juan García. Cada sensor mostró una respuesta particular cuando fue ensayado en cada mosto. En este caso es destacable el rango de intensidad que muestran los electrodos de platino, siendo superior a los de acero inoxidable. También hay diferencias claras en cuanto a las posiciones de los procesos redox observados en el mosto. Esto no implica un mal funcionamiento de los sensores de acero inoxidable, al contrario, también son capaces de distinguir los procesos redox, y la diferente señal recibida por distintos sensores hace que sea más conveniente usar una red que usar cada sensor de forma individual.

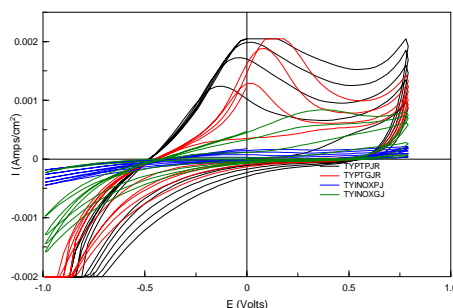


Figura 77: Respuesta voltamétrica de los diferentes sensores en un mosto del tipo Juan García diluido al 50% con KCl 0,3M.

Por otra parte los electrodos modificados con nanopartículas muestran la oxidación del polarón de un modo más evidente, en general la señal mostrada con los electrodos con tirosinasa no muestra la oxidación del bipolarón observada en los sensores sin enzima y por tanto su respuesta voltamétrica es diferente lo que nos puede ayudar a crear una mejor red de sensores basados en polipolipirrol.

A continuación mostramos a título comparativo se muestran en la figura 78 las respuestas obtenidas en los distintos biosensores en las seis variedades de mostos distintas como ya se hizo en el caso de los sensores sin enzima.

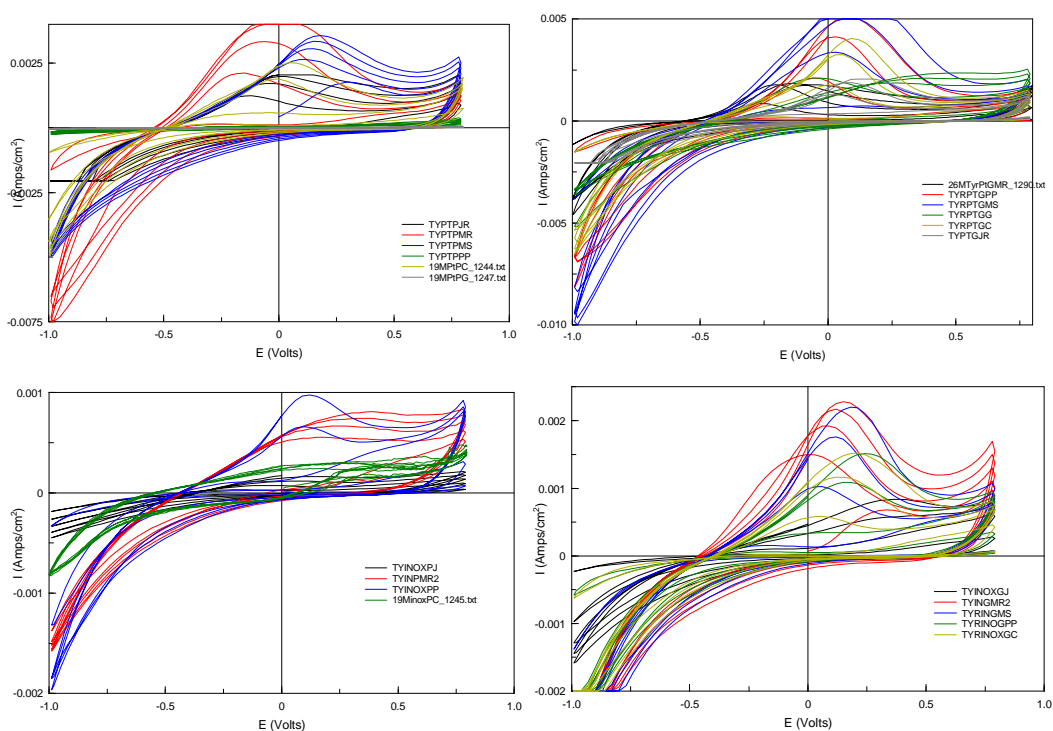


Figura 78: Respuestas voltamétricas de los diferentes mostos utilizando un electrodo Platino-pirrol (arriba izquierda), un electrodo de PlatinoGeneración (arriba derecha), un electrodo de Inox-pirrol (abajo izquierda) y un electrodo de InoxGeneración (abajo derecha).

A la vista de las figuras anteriores observamos cómo cada sensor tiene una respuesta característica y además que las muestras que dan señales más intensas corresponden a las mismas variedades para todos los electrodos. El objetivo de medir los mostos con biosensores de tirosinasa estaba centrado en aumentar su especificidad de modo que pudiesen detectar antioxidantes de un modo más eficiente. Los resultados fueron buenos ya que no solo dieron diferentes señales comparados con los electrodos sin enzimas, sino que además, como se comentará en el apartado de análisis estadístico, son electrodos capaces de distinguir las distintas variedades de mostos.

4.4.3 DETECCIÓN DE MOSTOS CON BIOSENSORES MODIFICADOS CON GLUCOSA OXIDASA

El uso de biosensores modificados con glucosa oxidasa se centra en la discriminación de las distintas variedades de mostos mediante la detección de distintas concentraciones de azúcares. Se pretende por tanto completar nuestra red con sensores selectivos para polifenoles, modificados con tirosinasa y selectivos para azúcares, modificados con glucosa oxidasa, teniendo en cuenta que las características y propiedades de los mostos dependen fundamentalmente de la acidez y de su contenido en estos dos componentes.

También en el caso de los biosensores modificados con glucosa oxidasa se consiguió obtener una respuesta característica al introducir los sensores en las diferentes variedades de mostos. Como ejemplo se muestran los resultados obtenidos para el mosto de la variedad Prieto Picudo en la figura 79. Es destacable un aumento de intensidad en el pico de oxidación. Mientras que en los electrodos de tirosinasa en dicho pico se alcanzaba una intensidad en torno a 3 mA, en los electrodos de GOx se alcanza en muchos casos una intensidad de 5 mA, superándola en algunos casos. Además, dicho pico se sitúa en un potencial más positivo, en el caso de la figura 79 lo podemos ver en torno a 0,4 V. Por

tanto las intensidades y las posiciones de los picos son diferentes en función de si se utiliza o no enzima y del tipo de enzima utilizado.

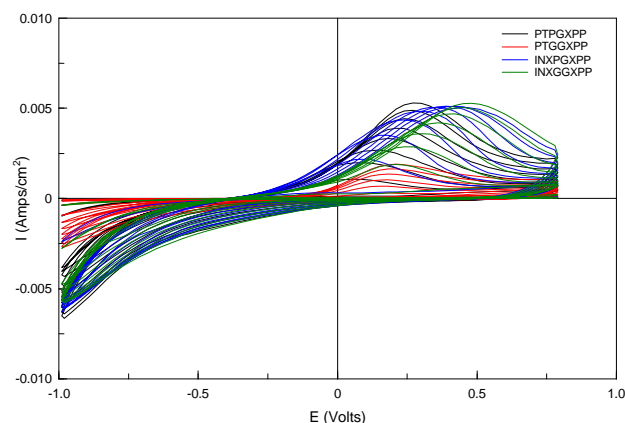


Figura 79: Respuesta voltamétrica de los diferentes sensores en un mosto del tipo Prieto Picudo diluido al 50% con KCl 0,3M.

Hay que recordar que aunque la respuesta de los biosensores no muestra los picos de los azúcares, si no los del polipirrol, cada mosto modifica la forma, posición e intensidad de las curvas de una forma particular, constituyéndose así una huella dactilar de la muestra. Así, cada sensor muestra una respuesta redox particular cuando es ciclado en cada mosto, lo que da lugar a una gran selectividad cruzada que permite obtener un mayor grado de clasificación mediante los análisis estadísticos.

Como en los casos anteriores a continuación en la figura 80 se muestran las respuestas de los cuatro tipos de biosensores modificados con GOx para las seis variedades de mostos utilizadas en el trabajo.

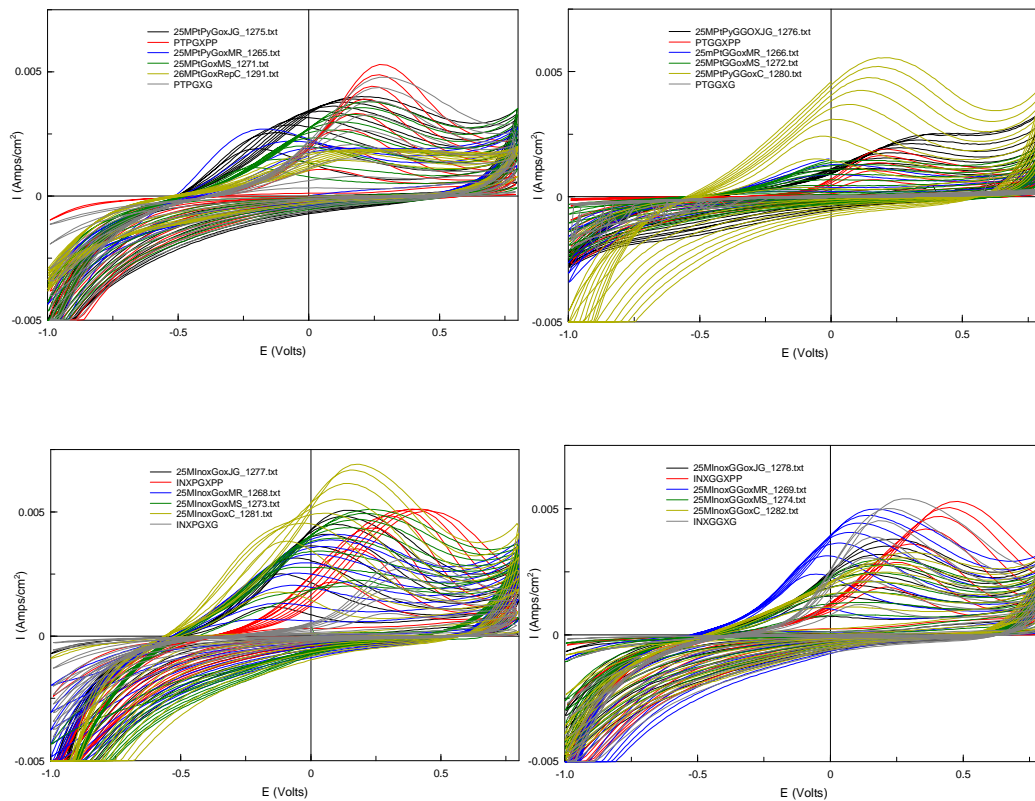


Figura 80: Respuestas voltamétricas de los diferentes mostos utilizando un electrodo PlatinoPolipirrol (arriba izquierda), un electrodo de PlatinoGeneración (arriba derecha), un electrodo de InoxyPolipirrol (abajo izquierda) y un electrodo de InoxyGeneración (abajo derecha).

Se puede observar que en este caso los electrodos de acero inoxidable alcanzan una intensidad de señal similar a los electrodos de platino. Una vez más los picos más relevantes aparecen como en el resto de sensores en el barrido anódico; en el caso de las respuestas voltamétricas registradas en los distintos biosensores no se han podido observar picos de reducción con datos relevantes para el análisis estadístico. Esto no es problema porque como se ha comentado anteriormente, solo se tendrá en cuenta la curva anódica en el análisis de datos.

4.4.4 TRATAMIENTO DE DATOS

Como se ha mencionado en el anterior apartado, los distintos sensores y biosensores presentan respuestas electroquímicas particulares frente a cada mosto. Esto es debido a las interacciones que tienen lugar entre los diferentes sensores y los múltiples compuestos de las muestras estudiadas. Estas diferencias en los datos obtenidos pueden ser evidenciadas principalmente por cambios en la posición de los picos y en variaciones en sus intensidades relativas. De este modo, los datos recogidos por las señales electroquímicas de la red de sensores y biosensores pueden ser utilizados para diferenciar y clasificar los mostos estudiando solo los datos más característicos.

La capacidad distintiva de esta red de sensores ha sido analizada y visualizada mediante métodos matemáticos, concretamente el análisis de factores paralelos o PARAFAC. Se trata de un método normalmente utilizado para el procesamiento de conjuntos de datos multivariantes (que miden varias variables para cada muestra) obtenidos a partir de las diferentes medidas experimentales. Es una técnica estadística cuyo objetivo es conseguir unas componentes principales que recojan la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos. De esta forma si hay una correlación entre las variables, el número de componentes principales será menor, reduciendo la cantidad de datos a manejar.

Se han utilizado las señales de la voltametría cíclica como fuente de datos para los tratamientos estadísticos. A la parte del barrido anódico de dichas señales se le aplicó el método kernel, dividiendo la curva en 10 partes. Los 10 valores obtenidos en cada voltamograma se escalan entre los valores máximos y mínimos para descartar el efecto del rango de corriente (a esto se le llama normalizado) para construir la matriz que se utilizó con las técnicas de reconocimiento de patrones. Se estandariza la variable a media cero y varianza

unidad, de lo contrario, si una variable tuviera una varianza mucho más grande, esta variable controlaría la primera componente principal. La estandarización lo evita haciendo que todas las variables tengan el mismo peso.

Tratando los datos con el programa Matlab y aplicando el PARAFAC a la matriz de datos, se tienen los resultados para los sensores.

Comenzamos mostrando los resultados para la red de sensores en los que no se ha añadido ninguna enzima. La figura 81 ilustra el gráfico de los resultados obtenidos del PARAFAC (componente principal PC1 frente a PC2 y frente a PC3). Como se puede observar, los mostos estudiados, representados por distintos números, aparecen agrupados en un gran cluster. Esto indica que los sensores sin enzimas no tienen una capacidad de discriminar lo suficientemente alta como para diferenciar de forma notable los distintos mostos.

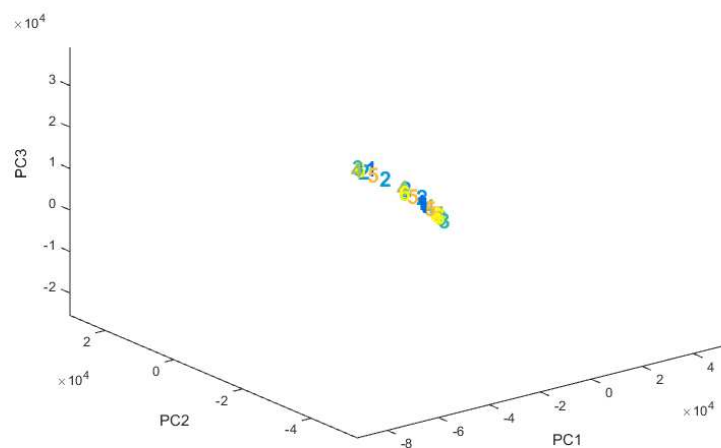


Figura 81: PARAFAC en 3D obtenido a partir de los registros realizados con la red de sensores (Platino polipirrol, Platino generación, Inox polipirrol, Inox generación) donde: 1-Cabernet, 2-Garnacha, 3-Juan García, 4-Mencía Regadío, 5-Mencía Secano, 6-Prieto Picudo.

Dado que con esta red de sensores no se ha obtenido el resultado deseado, se ha estudiado cómo afecta el diferente tipo de sustrato y la adición de nanopartículas de oro en los sensores, para determinar qué tipo de sensor puede tener un mejor funcionamiento.

A continuación se presentan los resultados de la red de sensores, separados según el tipo de sustrato. La figura 82.a muestra los resultados en sensores de sustrato de platino, y la figura 82.b en sustrato de acero inoxidable.

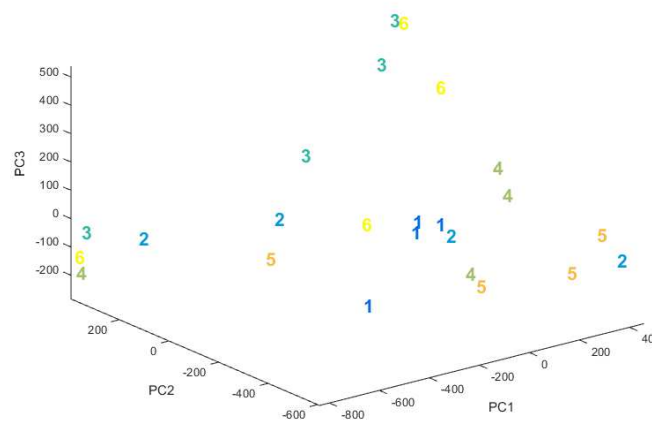


Figura 82.a

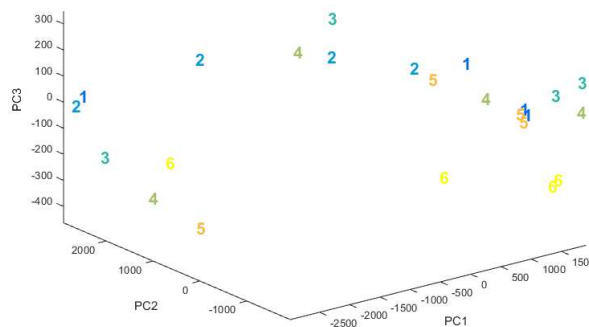


Figura 82.b

A primera vista parece que los resultados se presentan de una forma más dispersa, pero teniendo en cuenta la escala en la que se muestra, están agrupados de una forma similar a la inicial. Éste no es el problema, lo que hace que los resultados no sean buenos es que un mismo mosto aparece de forma dispersa, y los diferentes mostos mezclados entre sí, por lo que ni con el sustrato de platino ni con el de acero inoxidable es posible diferenciarlos. Si bien en el platino el mosto de la variedad 1 (Cabernet) aparece de forma agrupada, el resto de mostos, aunque presenten cierta agrupación, tienen alguna componente que está demasiado alejada del resto, pudiendo ser confundida con una componente de otra variedad distinta de mosto.

En los sensores de sustrato de inoxidable se puede observar cierta agrupación en la variedad de mosto 6 (Prieto Picudo), aunque es una agrupación un tanto pobre porque una de las componentes aparece muy disgregada.

Por este motivo se puede decir que los distintos sustratos no presentan diferencias significativas en la capacidad de discriminar las variedades de mostos. A continuación se estudiará cómo afectan las nanopartículas a esta red de sensores. La figura 83.a muestra los resultados obtenidos con los electrodos de platino e inoxidable sin nanopartículas, y la figura 83.b con nanopartículas.

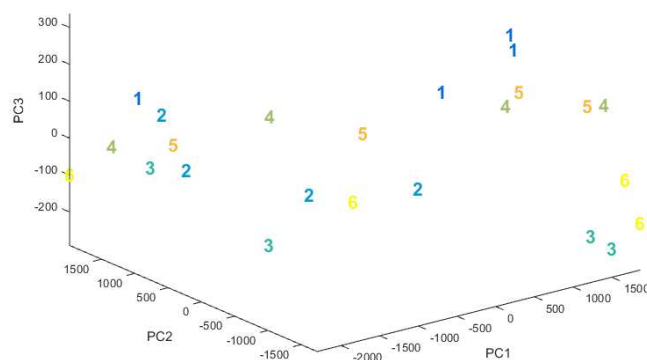


Figura 83.a

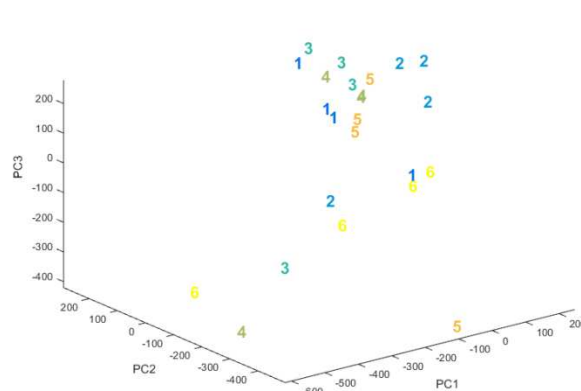


Figura 83.b

Del mismo modo que para sensores de diferente sustrato, la presencia de nanopartículas de oro en sensores sin enzimas no parece influir en la capacidad de discriminar los distintos mostos. Como en el caso anterior, los sensores con nanopartículas muestran cierta agrupación de la variedad de mosto 1, pero el resto de variedades están demasiado dispersas, de modo que los resultados no cumplen los objetivos que tenía la red de sensores.

Dado que los sensores sin enzimas no han sido capaces de obtener los resultados esperados, se estudiarán los datos obtenidos mediante los biosensores. Hay que tener en cuenta que estos biosensores tienen la misma base que los electrodos del anterior apartado, y sobre ellos se ha hecho una adición de enzimas, en un caso con la enzima tirosinasa y en otro caso la enzima glucosa oxidasa. De esta forma aumenta la especificidad del sensor, haciendo que los sensores se centren en detectar componentes importantes del mosto, que pueden tener distintas concentraciones según la variedad del mosto. Así, la red de biosensores puede tener una mayor capacidad de discriminar entre las distintas variedades. A continuación se presentan los resultados. Figura 84.

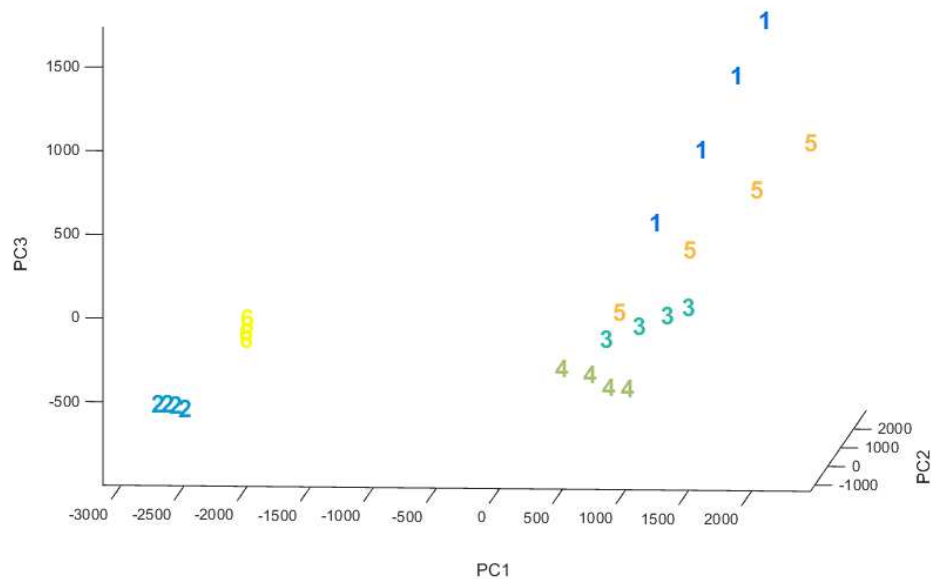


Figura 84: PARAFAC en 3D obtenido a partir de los registros realizados con la red de biosensores (Tirosinasa y Glucosa oxidasa) donde: 1-Cabernet, 2-Garnacha, 3-Juan García, 4-Mencia Regadío, 5-Mencia Secano, 6-Prieto Picudo.

En este caso se puede observar que los datos correspondientes a cada variedad de mosto están agrupados. Se aprecia que los sensores discriminan los 6 tipos de mostos. Se puede apreciar que las variedades 5 y 1 están algo dispersas, pero no se confunden con ninguna otra variedad. En cambio, la reproducibilidad de los sensores para discriminar mostos del tipo 2 y 6 es la mejor obtenida. Se puede decir que, en general, esta red de biosensores presenta unos buenos resultados.

Como se ha hecho anteriormente para los sensores sin enzimas, se ha estudiado el comportamiento de los diferentes tipos de sustrato y la adición de nanopartículas, para ver el aporte que ha hecho cada tipo de sensor al funcionamiento de la red.

A continuación se presentan los resultados de la red de sensores, separados según el tipo de sustrato. La figura 85.a muestra los resultados en sensores de sustrato de platino, y la figura 85.b en sustrato de acero inoxidable.

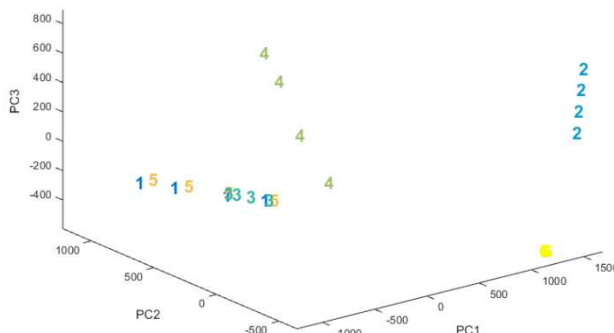


Figura 85.a

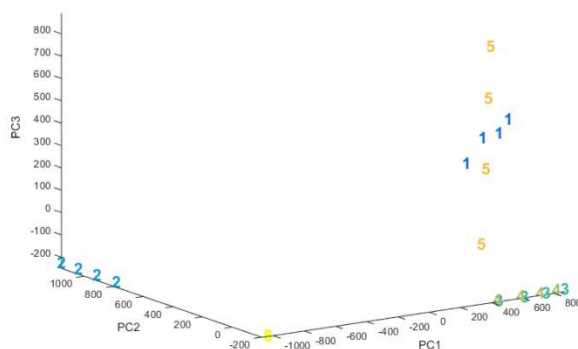


Figura 85.b

En ambos casos la reproducibilidad de los sensores para discriminar mostos del tipo 6 es muy alta, estando todas las respuestas de esta variedad muy agrupadas. Así mismo el resto de variedades se encuentran agrupadas entre sí, pero, en el caso del electrodo con sustrato de platino, se puede observar que tiene problemas para diferenciar las variedades 1, 3 y 5, y el electrodo con sustrato de inoxidable no diferencia entre las variedades 3 y 4. Por este motivo se puede decir que ningún sustrato es mejor que otro, si no que se complementan, y su uso simultáneo en la misma red hace posible la diferenciación entre los distintos tipos de mostos. En cualquier caso la adición de

enzimas ha supuesto un aumento en la selectividad y eficacia de los sensores con ambos tipos de sustrato.

A continuación se estudiará cómo afectan las nanopartículas a esta red de sensores. La figura 86.a muestra los resultados obtenidos con los electrodos de platino e inoxidable sin nanopartículas, y la figura 86.b con nanopartículas.

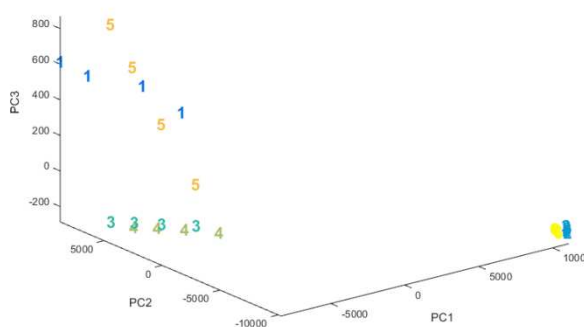


Figura 86.a

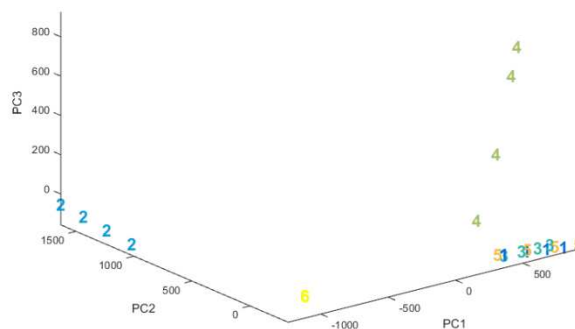


Figura 86.b

Se puede observar que los electrodos sin nanopartículas de oro son capaces de agrupar los distintos datos registrados para cada mosto. Sin embargo, estos grupos de mostos están muy próximos entre sí, especialmente las variedades 6 y 2 y la 3 y 4. La separación entre estos grupos la llevan a cabo los

electrodos con nanopartículas, aunque en estos los grupos que están próximos son los del tipo 1, 3, y 5. De modo que no se puede decir que un electrodo sea mejor que otro, si no que el uso de ambos se complementa, siendo capaces de obtener unos buenos resultados cuando se los usa juntos en la misma red.

CONCLUSIONES

El objetivo general de este proyecto fue desarrollar una red de sensores capaz de discriminar entre distintas variedades de mosto. Dicha red está formada por sensores y biosensores con diferente sustrato, modificados con nanopartículas de oro. Las conclusiones a las que se ha llegado con este estudio de investigación han sido:

- Es factible el uso del acero inoxidable como sustrato para los sensores poliméricos, complementando el uso de los sensores con sustrato de platino para la fabricación de sensores con polipirrol.
- Aunque la cronoamperimetría es una técnica viable para la deposición de películas de polipirrol, los mejores resultados obtenidos mediante cronopotenciometría hacen que ésta sea la técnica adecuada para la fabricación de sensores especialmente para aceros inoxidables.
- Las sales de sodio estudiadas tienen un mejor efecto dopante sobre la película de polipirrol, por ello se descartó el uso de ácido sulfúrico como dopante.
- La modificación de los sensores con nanopartículas de oro les proporcionó un efecto electrocatalítico, siendo positiva la inclusión de dichas nanopartículas en la matriz de polipirrol. Ambos métodos cogeneración y atrapamiento resultaron ser altamente satisfactorios.
- Se ha verificado la sensibilidad de los sensores y biosensores de polipirrol a antioxidantes tipo cafeico y catecol. Los sensores fueron capaces de detectar distintas concentraciones de polifenoles, con unos límites de detección suficientes para su ensayo en mostos. La modificación con nanopartículas de oro da lugar a mejores límites de detección.

- Cada diferente tipo de electrodo (inox/platino, con/sin nanopartículas, biosensores) proporciona una respuesta diferente ante los mostos, proporcionando a la red una alta selectividad cruzada.
- La adición de enzimas a la base de sensores es de gran importancia, pues proporciona una alta especificidad sobre los compuestos que se quieren estudiar -antioxidantes y azúcares-, componentes principales de los mostos.
- La red de biosensores es capaz de distinguir entre las distintas variedades de mostos, siendo necesario el uso de diferentes tipos de sensores, con sustrato de platino y de inoxidable, sin modificar y modificados con nanopartículas, en la misma red, ya que se complementan las distintas señales obtenidas y nos permiten una mayor discriminación. Se ha logrado obtener una red con una importante selectividad cruzada que permite obtener un óptimo grado de clasificación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoçi, (2004), *“Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores: curso teórico-práctico”*, Universidad Autónoma de Barcelona.
- [2] F. G. Banica, (2012), *“Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Application”*, Ed. John Wiley & Sons.
- [3] B. E. S. Rodriguez, (2009), *“Biosensores en la industria”*.
- [4] J. Janata, (2010), *“Principles of chemical sensors”*, Ed. Springer Science & Business Media.
- [5] V. Carralero, M^a L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, (2004), *“Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines”*, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid.
- [6] W. J. Feast, J. Tsibouklis, K. L. Pouwer, L. Groenendaal, E. W. Meijer, (1996), *“Synthesis, processing and material properties of conjugated polymers”*.
- [7] V. Shaktawat, K. Sharma, N.S. Saxena, (2010), *“structural and electrical characterization of protonic acid doped polypyrrole”* Semi-conductor & Polymer Science Laboratory, Deptt. of Physics, University of Rajasthan, India.
- [8] M. Ash, I. Ash, (2004), *“Handbook of preservatives”*.
- [9] L.X. Wang, X.G. Li, Y.L. Yang (2000) *“Preparation, properties and applications of polypyrroles”*, Department of Polymer Materials Science Engineering, Tongji University, Shanghai, Republic of China.

- [10] R. A. Jones, (2009), *“The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Pyrroles”*.
- [11] J. M. Ko, H. W. Rhee, S.-M. Park, C. Y. Kim, (1990), *“Morphology and electrochemical properties of polypyrrole films prepared in aqueous and nonaqueous solvents”*.
- [12] H. S. Nalwa, (2001), *“Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices”*.
- [13] J.M. Albella, (2003), *“Láminas delgadas y recubrimientos: preparación, propiedades, y aplicaciones”*. Ed. CSIC.
- [14] V. Carralero, (2009) *“Preparación de biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro”*. Universidad Complutense de Madrid.
- [15] M. Rai, N. Duran (2011), *“Metal nanoparticles in microbiology”*, Springer Science & Business Media.
- [16] M^a L. Rodríguez, C. García, C. Medina, C. García, D. Paniagua, S. Rodríguez, B. de Lamo, S. Villacorta, F. Pedrosa, (2015), *“Voltammetric nanostructured sensors for the detection of antioxidants”*. Department of Inorganic Chemistry, Universidad de Valladolid.
- [17] R. A. Harshman, (1976), *“PARAFAC: Methods of three-way factor analysis and multidimensional scaling according to the principle of proportional profiles”*, University of California, Los Angeles.
- [18] Xiao, F., Zhao, F.Q., Zhang, Y.F., Guo, G.P. Zeng, B.Z. J. Phys. Chem. C, (2009) 113, 849-855.
- [19] A. Arrieta, (2005) *“Diseño de una red de sensores electroquímicos inespecíficos basados en polímeros conductores para el análisis sensorial de vinos”*, Universidad de Valladolid.

