



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

GRADO EN INGENIERÍA MECÁNICA

Título del TFG

**Efecto catalítico de las nanopartículas de
TiO₂ en sensores y biosensores de grafito**

Autor:

Carnicero Gómez, Irene

Tutor:

**García Cabezón ,Cristina
Departamento
CMeIM/EGI/ICGF/IM/IPF**

Valladolid, Octubre 2015.



Contenido

Contenido	3
Agradecimientos.....	7
Resumen/Abstract	9
Abreviaturas y Acrónimos.....	11
CAPÍTULO I. Introducción	13
1.1. Justificación.....	13
1.2. Objetivos	14
CAPÍTULO II. Estado del arte.....	17
2.1. Sensores	17
2.1.1. Transductores Conductimétricos.....	19
2.1.2. Transductores Potenciométricos.....	20
2.1.3. Transductores Amperométricos	21
2.1.4. Transductores Voltamétricos.....	22
2.2. Biosensores	22
2.2.1. <i>Receptores Biológicos</i>	24
2.2.2. <i>Anticuerpos</i>	24
2.2.3. <i>Ácidos nucleicos</i>	25
2.2.4. <i>Microorganismos</i>	26
2.2.4.1. Tejidos orgánicos o celulares	26
2.2.4.2. Enzimas.....	27
2.3. Métodos de Inmovilización	29
2.3.1. Atrapamiento	30
2.3.2. Microencapsulación.....	31
2.3.3. Entrecruzamiento (cross-linking).....	32
2.3.4. Procedimientos mixtos	33
2.3.4.1. Unión covalente.....	33
2.4. El dióxido de titanio	34
2.5. Electrodo de pasta de carbono	35
2.6. Vino y componentes	36
2.6.1 Proceso de cata, propiedades químicas y componentes.....	38

2.6.2. Azúcares	41
CAPÍTULO III. Desarrollo	43
3.1. Método de experimentación y medida.....	43
3.1.1. Voltametría cíclica	44
3.2. Reactivos y disoluciones.....	49
3.2.1. Buffer Fosfato.....	50
3.2.2. Cloruro de Potasio.....	50
3.2.3. Glutaraldehido.....	50
3.2.4. Glucosa Oxidasa.....	51
3.2.5. Catecol	52
3.2.6. Ácido tartárico	53
3.2.7. Ácido Gálico.....	53
3.2.8. Ácido Vanílico	54
3.2.9. Ácido Málico	54
3.2.10. Pirogalol	55
3.2.11. Tirosinasa	55
3.2.12. Lacasa	56
3.3. Procedimiento fabricación sensores	56
3.3.1. Materiales utilizados.....	56
3.3.2. Preparación de la pasta	57
3.3.3. Fabricación de los electrodos	60
3.4. Procedimiento fabricación biosensores.....	65
3.4.1. Materiales utilizados.....	65
3.4.2. Fabricación de los viales de enzima	67
3.4.3. Inmovilización de la enzima en el electrodo	68
3.5. Medición de señales y resultados.....	73
3.5.1. Materiales utilizados.....	73
3.5.2. Mediciones electroquímicas	74
CAPÍTULO IV. Resultados	81
4.1. Estudio de viabilidad.....	87
4.2. Respuesta electroquímica de los sensores	94
4.2.1. Respuesta ante electrolitos básicos	95
4.2.1.1. Respuesta de los electrodos de Carbono	97

4.2.1.2. Respuesta de los electrodos con nanopartículas de Titanio	106
4.2.1.3. Respuesta de los electrodos de TiO_2	108
4.2.1.4. Comparativa entre electrodos.....	109
4.2.2. Respuesta ante ácidos.....	111
4.2.2.1. Respuesta al ácido tartárico	111
4.2.2.2. Respuesta al ácido málico	115
4.2.2.3. Comparación señal ácidos para el TiO_2	122
4.2.3. Respuesta ante los antioxidantes.....	123
4.2.3.1. Respuesta al Ácido Vanílico	123
4.2.3.1.1 Límite de Detección Ácido Vanílico	128
4.2.3.2. Respuesta al Ácido Gálico	130
4.2.3.3. Respuesta al Catecol	134
4.2.3.3.1 Comparativa entre electrodos	139
4.2.3.3.2 Límite de detección Carbono	140
4.2.3.3.3 Límite de detección TiO_2	141
4.2.3.4. Respuesta al pirogalol	142
4.3.4.1. Comparativa entre electrodos.....	146
4.2.3.5. Comparativa señal antioxidantes para el TiO_2	147
4.3. Respuesta electroquímica de los biosensores.....	149
4.3.1. Respuesta a la Glucosa.....	149
4.3.2. Respuesta ante la glucosa con GOX.....	151
4.3.2.1. Límite de detección de la Glucosa con biosensores de Carbono....	157
4.3.2.2. Límite de detección de la Glucosa con biosensores de TiO_2	159
4.3.2.4. Cinética para el TiO_2	161
4.3.3. Respuesta ante el Catecol con TYR	164
4.3.4. Respuesta ante el pirogalol con LAC	168
4.3.5. Respuesta al mosto.....	172
CAPÍTULO V. Conclusiones.....	177
Anexo I – Diseñode un accesorio de mejora del proceso de entrecruzamiento de la enzima.....	181
BIBLIOGRAFIA.....	189

Agradecimientos

A mis padres, Jose Daniel Carnicero y M^a del Mar Gómez sin los cuales no habría sido posible llegar hasta aquí. Por su esfuerzo, sacrificio y lucha por ofrecerme la oportunidad de elegir mi futuro y animarme en cada paso y decisión. Gracias por todos estos años de fe ciega en mí, ofreciéndome todo aquello que han conseguido con su duro trabajo, para que fuera capaz de cumplir mi sueño. Sin ellos, este proyecto no habría sido posible.

A Doña Cristina García Cabezón, mi tutora y profesora. Gracias por compartir conmigo un trabajo tan inspirador, innovador y satisfactorio. Quiero agradecerle los meses de trabajo en este proyecto, en los que me ha enseñado, guiado y ofrecido oportunidades continuamente. Gracias por ofrecerme esta investigación como final a mis estudios.

A Doña María Luz Rodríguez Méndez, por abrirme las puertas al mundo de la nanociencia y ofrecer sus conocimientos durante el desarrollo de este proyecto. Mi agradecimiento por su confianza en mi trabajo y los consejos aportados a lo largo de la investigación.

A Cristina Medina Plaza y Celia García Hernández, por los consejos y ayuda que me han ofrecido en el laboratorio a lo largo de la experimentación de este proyecto. Mi agradecimiento por transmitirme los conceptos y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Elena Martín, Flavio García y Oscar Castrillejo, con los que he pasado un gran número de horas experimentando. Gracias por el tiempo de trabajo e investigación a lo largo de estos meses.

Gracias a todo el personal docente de la Escuela de Ingenierías Industriales, que han transmitido sus conocimientos y experiencias a lo largo de estos años a los alumnos que pasábamos por este lugar.

Por último, agradecer a todas aquellas personas que a lo largo de este largo camino, desde ese mes de Octubre del 2009 en el que comencé esta aventura, han estado a mi lado, apoyándome, confiando en mí, animándome en cada paso y decisión tomada que me ha llevado hasta aquí. Gracias especialmente a aquellos que creyeron en mí, incluso cuando ni yo misma lo hacía, Álvaro Campo, Carmen Domínguez, Andrés García, Daniel Moretón, Carlos Sosa, Lucas Adam y muchos otros.

Gracias,

Valladolid, Octubre 2015

Resumen/Abstract

Titanium dioxide nanoparticles TiO_2 NPs have attracted much attention as catalyst support because of their large specific surface area, favorable surface chemistry, good biocompatibility, and electrocatalytic activity [2]. In this work carbon paste electrodes (CPE) modified with TiO_2 NPs have been developed and used to analyze those components usually needed to establish the quality of grapes.

For this purpose, after optimization of the preparation method (proportion of TiO_2 , drying conditions, activation, etc), the electrochemical response toward organic acids (Malic, Vanillic and Tartaric) and antioxidants (Gallic acid and Catechol) was evaluated... It was demonstrated that the modified electrode produced higher peak currents than those achieved at carbon electrode alone, improving the detection limits.

Biosensors consist of carbon paste modified with TiO_2 nanoparticles combined with Glucose Oxidase was used to determine glucose. Similarly, the TiO_2 electrodes were used to immobilize Tyrosinase to detect phenolic and Lacase to detect Pyrogallol.

Las nanopartículas de dióxido de Titanio (NPs) han atraído mucha atención como un catalizador de soporte debido a su gran área de superficie específica, superficie química favorable, buena biocompatibilidad y actividad electrocatalítica. En este trabajo los electrodos de pasta de carbono (CPE) modificados con nanopartículas de TiO_2 han sido desarrollados y utilizados para analizar algunos de los componentes que normalmente se utilizan para establecer la calidad de las uvas.

Para este propósito, después de la optimización del método de preparación (proporción de TiO_2 , condiciones de secado, activación, etc...) se evaluó la respuesta electroquímica frente a ácidos orgánicos (Málico, Vanílico, Tatárico) y antioxidantes (ácido Gálico y Catecol). Se ha demostrado que los electrodos modificados producen un incremento en la intensidad de la señal voltamétrica respecto a los electrodos de carbono solamente, mejorando los límites de detección.

Los biosensores consisten en pasta de carbono modificada con nanopartículas de TiO_2 combinadas con enzimas de glucosa oxidasa, y se han utilizado para determinar la glucosa. De manera similar, los electrodos de TiO_2 se han usado para inmovilizar Tirosinasa para detectar compuestos fenólicos y Lacasa para detección de pirogallol.

KEYWORDS: *Sensor, Biosensor, Carbon, TiO_2 , Electrocatalytic Activity*

PALABRAS CLAVE: *Sensor, Biosensor, Carbono, TiO_2 , Actividad electrocatalítica*

Abreviaturas y Acrónimos

TiO_2 - Dióxido de Titanio

NANOTIO – Electrodo de pasta de Carbono modificados con nanopartículas de Dióxido Titanio

NANO- Electrodo de pasta de Carbono modificados con nanopartículas de Titanio

GOX- Enzima Glucosa oxidasa

TYR – Enzima Tirosinasa

LAC - Enzima Lacasa

C – NANOC- NANOGRAF - GRAF – Electrodo de pasta de Carbono

REDOX – Reacción reducción-oxidación

CAT- Catecol

Gluc – Glucosa

Gal- Gálico

Van- Vanílico

Tart- Tartárico

Mal- Málico

Pyr- Pirogalol

NPs- Nanopartículas

CPE- Electrodo de pasta de Carbono

LOD – Limit Of Detection – Límite de Detección

CAPÍTULO I. Introducción

1.1. Justificación

La industria agroalimentaria española ha alcanzado un elevado grado de madurez y modernización adaptándose a los continuos cambios del entorno y a los hábitos de consumo [1]. De esta forma ha llegado a convertirse en el primer sector industrial del país y en un componente altamente estratégico de la industria española.

Si bien, la innovación y desarrollo de la industria agroalimentaria pasa genéricamente por la seguridad y calidad de los alimentos, a su vez es sabido que la cadena alimentaria es cada vez más compleja y exige, por otra parte, el desarrollo de eficaces sistemas de trazabilidad que aseguren la solidez de los eslabones.

Más concretamente, la industria vinícola, y dado el importante efecto de la materia prima en el producto final, la necesidad de desarrollar herramientas baratas, rápidas y fiables para la detección de compuestos químicos, representa una importante exigencia.

Debido a la necesidad, los vinos deben de estar monitorizados y han de ser caracterizados mediante mediciones de forma que se garantice la calidad de los productos finales. Para verificar que los procesos industriales utilizados están bajo control, se crea la necesidad de desarrollar una herramienta que sea capaz de determinar compuestos del vino, como pueden ser la glucosa, los fenoles y los ácidos.

El método innovador que se ha ido desarrollando en los últimos años es el uso de sensores de carbono a base de nanopartículas, que ayuden a la detección de componentes interesantes durante la creación del producto final.

Esta investigación se ha desarrollado en gran medida en UvaSens, un grupo de investigadores pertenecientes a la Escuela de Ingenierías Industriales, con los que he tenido el placer de trabajar durante el desarrollo de mi proyecto. La mayoría de su investigación se centra en la preparación y caracterización de películas nanoestructuradas y su aplicación como sensores. Recientemente han iniciado una nueva línea de investigación dedicada al desarrollo de biosensores y lenguas bioelectrónicas utilizando nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos. Dentro de esta temática se encuadra nuestro proyecto.

Trabajos anteriores han demostrado como los electrodos voltamométricos modificados químicamente con materiales electrocatalíticos como ftalocianina o nanopartículas de oro se puede usar para detectar dichos compuestos y vinos [3,8].

Ante el deseo de medir ciertos compuestos dentro de una mezcla, se han modificado los sensores que habitualmente se fabrican con pasta de carbono, para

poder mejorar los límites de detección, así como desarrollar una herramienta que sea capaz de distinguir entre varios compuestos en una misma sustancia.

Así mismo en los últimos años el estudio del potencial de las nanopartículas de óxidos magnéticos, como antioxidantes, ha aumentado por su reciente uso en biosistemas [2]. Las características electrocatalíticas incrementadas han hecho posible distinguir entre diferentes protones disociables de ácidos politrópicos [62].

La actividad catalítica eficiente ha sido también observada en mezclas de ácidos fenólicos/tartárico en el rango de pHs en el que habitualmente se encuentra el vino [62]. En dichas mezclas, el electrodo fue capaz de mostrar simultáneamente información de las concentraciones de ácido y de fenol, en una completa ausencia de interferencias.

Las excelentes propiedades de detección mostradas por estos sensores han sido atribuidas a las propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas combinadas con la gran superficie y ratio de volumen y homogeneidad.

Por tanto las nanopartículas de dióxido de Titanio surgen como unas novedosas candidatas a la hora de realizar una modificación de los sensores habitualmente de carbono. Debido a todo lo expuesto anteriormente y principalmente al carácter electrocatalítico conocido del TiO_2 , se decide por tanto, abrir una novedosa línea de investigación que muestre las ventajas y propiedades de estos sensores modificados.

No sólo se decide modificar electrodos de carbono en la investigación de la que he formado parte dentro de UvaSens, sino que además se decide modificar estos, con un elemento biológico de forma que se detecte no solo antioxidantes, sino también otros componentes como azúcares imposibles de detectar sin. Esto es principalmente debido a que, en los últimos 20 años, se han realizado numerosos intentos de crear, sensores para detectar glucosa que sean, sensibles, selectivos, fiables y de bajo coste. Esto es debido a que la determinación de la concentración de glucosa es muy importante en campos clínicos, biológicos y muestras químicas y también en procesos de procesamiento y fermentación alimenticia, como la industria vinícola [25].

1.2. Objetivos

Como objetivo global del proyecto tenemos el determinar las diferencias entre los sensores de pasta de carbono y los modificados con nanopartículas de dióxido titanio así como con los biosensores fabricados a partir de ellos utilizando diversas enzimas. A continuación se desarrolla cada objetivo individualmente.

El objetivo principal de este proyecto es la detección de antioxidantes con los sensores modificados ya que el TiO_2 es conocido por su gran efecto catalizador y las nanopartículas de este óxido metálico podrían tener un efecto electrocatalítico en este tipo de sensores. Así mismo se establece como objetivo la posibilidad de detectar ácidos y azúcares con ayuda de los sensores modificados.

Otros objetivos que se presentan en la realización de esta investigación es la posibilidad de desarrollar unos sensores modificados con nanopartículas capaces no solo de detectar fenoles y ácidos, si no también, de distinguirlos cuando estos se encuentren en una mezcla.

Una vez se hayan determinado la capacidad y sensibilidad de los sensores desarrollados a base de nanopartículas de TiO_2 , se establece como objetivo la determinación del límite de detección de los electrodos ante la sustancia que son capaces de medir. Determinando así, la mínima concentración para la que estos sensores se pueden utilizar a la hora de detectar compuestos y realizar las oportunas comparativas con los electrodos sin modificar.

Con respecto a los objetivos en el caso de los biosensores, será tratar de detectar azúcares en muestras, y así mismo determinar al igual que en el caso de los sensores, el límite de detección que esta técnica de modificación de sensores nos puede proporcionar.

También se pretende mediante el uso de biosensores determinar un método de medición mejor para antioxidantes como el Catecol utilizando enzimas.

Por último determinar las diferencias entre los sensores de Carbono y TiO_2 en un compuesto complejo como el mosto.

CAPÍTULO II. Estado del arte

2.1. Sensores

El interés, principalmente del sector agroalimentario, de desarrollar herramientas que realicen controles de calidad más rápidos, económicos y que optimicen la producción, mediante análisis in-situ por ejemplo, con instrumentos que permitan visualizar los resultados inmediatamente en una plataforma informática, ha ido dirigiendo las recientes investigaciones hasta el desarrollo de métodos analíticos que cumplan con sus necesidades.

En los últimos años el número de publicaciones e investigaciones relacionadas con sensores es muy elevado. La investigación en este campo ha estado centrada en el desarrollo de electrodos a base de nanopartículas para electroanálisis [3]. El activo uso del carbono en el desarrollo de sensores se debe a que es una sustancia atractiva para ensamblar nanopartículas mecánicas debido a su “*amplia ventana de potencial*”, además, es normalmente “*low-cost*”, es un alto conductor, mecánicamente estable y disponible en una gran variedad de formas [10].

Podemos definir un sensor químico como un dispositivo capaz de traducir la información química de una muestra en una señal útil [12]. Los sensores químicos están formados principalmente por dos componentes: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor, sobre el que se encuentra conectado el primero. El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor, que la transforma a su vez de una señal primaria a una señal secundaria procesable fácilmente, que generalmente será eléctrica u óptica. Existen tres tipos de receptores [13]:

- Físicos, cuando no hay reacciones químicas involucradas en la detección, por ejemplo piezoeléctricos utilizados para la detección de cambios de masa.
- Químicos, la señal proviene de una reacción química, por ejemplo agentes quelantes, ionóforos, etc.
- Biológicos, cuando el material receptor tiene una procedencia biológica. Por ejemplo, enzimas anticuerpos, ADN, células, etc. En este caso los sensores químicos pasarán a denominarse biosensores y serán desarrollados más ampliamente en el apartado siguiente.

A su vez los sensores y biosensores se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, como por ejemplo el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado, siendo ésta la más aceptada [14]. En la *tabla 1* se muestran los tipos de sensores y biosensores atendiendo a este último criterio:

Tipos de Transductores	Descripción
Ópticos	Transforman los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor.
Electroquímicos	La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.
Piezoeléctricos	Dispositivos que transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoeléctricas.
Térmicos	Dispositivos capaces de medir el cambio de calor sobre la superficie del electrodo.

Tabla 1. Resumen entre el tipo de transductores y su descripción

A lo largo del trabajo se utilizarán sensores electroquímicos y por ello a continuación se describirá en detalle este grupo de sensores.

Transductores Electroquímicos

En los últimos años los transductores electroquímicos han sido el objetivo de la investigación y publicación dentro de la comunidad científica [15-17]. Este suceso está claramente ligado al hecho de que son unos dispositivos robustos, cuya fabricación es más simple y económica frente al resto de los transductores nombrados. Además este tipo de sensor posee un amplio rango de linealidad y poseen un tiempo de respuesta relativamente corto.

Estas no son las únicas razones por las que la comunidad científica ha prestado tanto interés en estos transductores, sino que además que el equipo que recoge y procesa la señal, como potenciostatos y conductímetros son económicos y su mantenimiento es sencillo al igual que su manejo y miniaturización, siendo estos frecuentemente usados en los laboratorios de análisis.

En el siguiente gráfico se puede observar como efectivamente las publicaciones relacionadas con sensores químicos han sido mucho más elevadas que las del resto de transductores durante los finales de los años 90

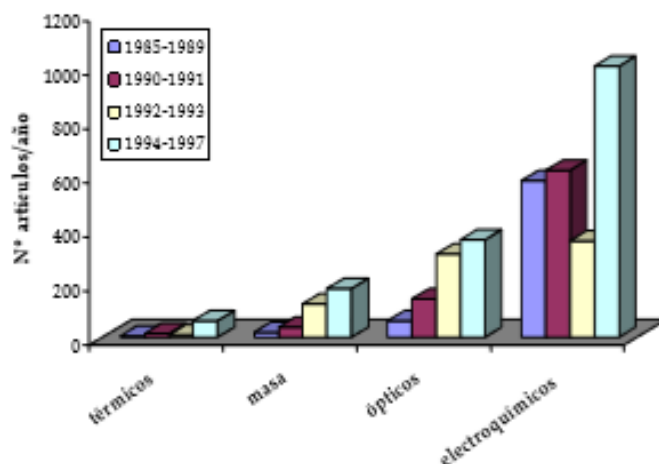


Imagen 1. Relación de artículos al año en función del tipo de electrodos durante varios años

Desde entonces, los transductores electroquímicos han seguido estando muy presentes en artículos y libros y siguen actualmente siendo el centro de atención de los laboratorios de análisis.

En este trabajo se eligió el uso de transductores electroquímicos, no solo por las razones presentadas anteriormente pero también debido a que en la Universidad de Valladolid en el grupo de Investigación de Sensores UvaSens se ha trabajado ampliamente y durante bastante tiempo con este tipo de transductores y se posee un amplio conocimiento sobre ellos.

Pues bien, el grupo de transductores electroquímicos es amplio y dentro de él podemos distinguir entre tres tipos de sensores, según la técnica electroquímica empleada para obtener la información de la muestra, conductimétricos, voltamétricos, amperométricos y voltamétricos.

2.1.1. Transductores Conductimétricos

Estos transductores se basan en la variación de la conductividad, o de alguna propiedad asociada a esta, producida por el analito, ya sea en la solución medida o en la membrana selectiva. En algunos casos se puede hasta determinar los cambios de conductividad en el analito [15], dicha conductividad se puede expresar como:

$$\Lambda = \frac{k}{C}$$

Ecuación 1. Conductividad de los transistores

Dónde k es la conductividad específica en $S\text{ cm}^{-1}$ y C es la concentración de iones en mol cm^{-3} . Por lo tanto la conductividad depende de la concentración de iones directamente.

La utilidad de estos sensores reside habitualmente en la medición de la resistividad de corriente en continua aunque por ejemplo para poder registrar valores de impedancia se utilizaría corriente alterna. La determinación de la impedancia resulta útil a la hora de caracterizar algunos líquidos y/o superficies de electrodos modificadas [18, 19]. La configuración de estos dispositivos es muy simple, se trata de dos electrodos que pueden ser incluso de diferentes materiales, aunque normalmente se utilizan materiales nobles como el Oro que es capaz de detectar cambios de concentración del ácido sulfhídrico, platino, paladio, o rutenio utilizados en la detección de hidrógeno [20].

2.1.2. Transductores Potenciométricos

Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia. La diferencia de potencial medida entre dichos electrodos se relaciona con la concentración del analito según la ecuación de Nernst.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(a_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} * a_j^{\frac{z_i}{z_j}} \right)$$

Ecuación 2. Ecuación de Nerst

Siendo a_i la actividad el ion principal, a_j la actividad del ion interferente y z_j , z_i las cargas de los iones principal e interferentes y $K_{i,j}^{pot}$ es el coeficiente de selectividad [45].

Los transductores potenciométricos son el grupo de dispositivos electroquímicos más desarrollados y estudiados. Históricamente, el origen de los sensores químicos se remonta a principios del siglo XX con el desarrollo del electrodo de vidrio, uno de los sensores potenciométricos más utilizados [46].

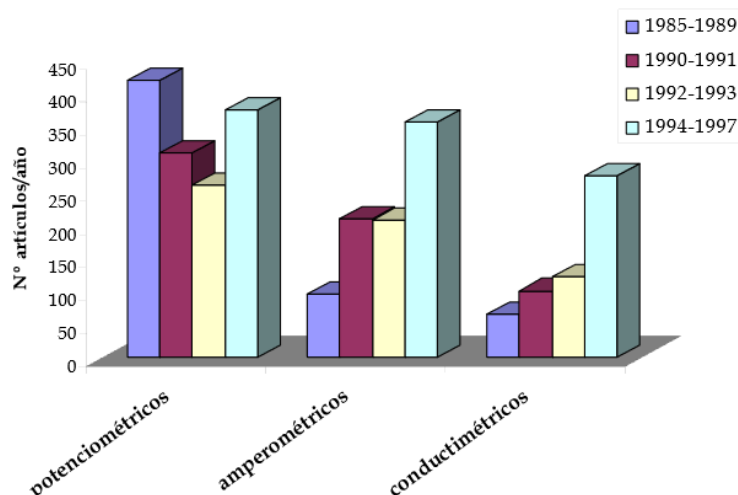


Imagen 2. Relación de artículos por año publicados respecto a los tipos de sensores más utilizados durante varios años

2.1.3. Transductores Amperométricos

Este tipo de dispositivos, se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un elemento de referencia. Un tercer electrodo, al que se le denomina auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica [47]. También es posible realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas variando el potencial de trabajo de forma controlada.

Los transductores amperométricos están fundamentados en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva determinada y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado.

Esta relación intensidad-concentración se comporta según el modelo:

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(0, t))}{\delta x}$$

Ecuación 3. Ecuación Intensidad de los transductores Amperométricos

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D₀ y C₀ son el coeficiente de difusión la concentración del analito, respectivamente, y x representa la distancia de doble capa.

En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que x se mantiene constante y se corresponde con el tamaño de la capa de difusión (δ). Así la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad media y la concentración del analito:

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} D_0$$

Ecuación 4. Ecuación de la intensidad media de un Transductor Amperométrico

Los biosensores amperométricos son los que han mostrado un mayor avance debido a su extensa aplicación dentro del campo de análisis médico. Ejemplos significativos de dichos avances son los biosensores para medidas en sangre y suero.

2.1.4. Transductores Voltamétricos

Estos transductores son un tipo particular de los transductores amperométricos. Los cuales se basan en obtener información del analito a partir de intensidades de corriente obtenidas al aplicar un potencial variable respecto al tiempo. Estos transductores se utilizan en distintos métodos de medición como el barrido lineal, cíclico, onda cuadrada, pulso etc... En función de estas señales se obtienen distintas voltametrías, siendo estas el resultado de pasar la función barrido a través de un potencióstato/galvanostato. En este proyecto se ha utilizado una función de barrido triangular y una voltametría cíclica.

Las ventajas de este tipo de transductores es que ofrecen alta selectividad y sensibilidad, alta relación señal-ruido, bajo límite de detección y gran versatilidad a la hora de analizar multicomponentes. Por todo ello, y debido a que UvaSens ha trabajado con este tipo de transductores a lo largo de muchas investigaciones, estos han sido los transductores utilizados a lo largo de este proyecto.

2.2. Biosensores

Dentro del ámbito de los sensores que se han comentado en el apartado anterior cabe destacar los biosensores, una modificación de los sensores con más selectividad y por tanto con un campo de aplicación potencial en química analítica.

Desde el primer concepto de biosensor basado en enzimas propuesto por Clark and Lyons en 1962, muchas investigaciones sobre biosensores se han desarrollado. El objetivo a largo plazo de todas estas investigaciones es explorar las aplicaciones prácticas de estos sensores modificados [34].

En los últimos años el número de biosensores diseñados ha ido aumentando e incluso han llegado a comercializarse, por ejemplo en detección de glucosa en sangre.

De hecho, desde el inicio de los años 1990 el interés del estudio de la transferencia de electrones entre proteínas y electrodos modificados con nanomateriales ha ido creciendo debido a su gran área específica y una alta superficie de energía libre [21]. La combinación de materiales nanométricos y biomoléculas es de notable importancia en el campo de la biotecnología y química bioanalítica.

Actividad electroquímica y catalítica directa de muchas proteínas ha sido observada en electrodos modificados con TiO_2 , SiO_2 , ZrO_2 , Fe_3O_4 , nanotubos de carbono etc... Estudios han demostrado que los films de nanomateriales no pueden solo ofrecer una plataforma amigable para ensamblar moléculas proteínicas, sino también para mejorar el proceso de transferencia de electrones entre las moléculas de proteínas, y electrodos.

Durante estos años se han utilizado muchos tipos de nanopartículas para mejorar la actividad de la transferencia de electrones, especialmente las nanopartículas de oro han sido usadas en la construcción de biosensores electroquímicos [22-24].

Los sensores amperométricos basados en la transferencia de electrones entre un electrodo y la glucosa oxidasa inmovilizada son especialmente prometedores ya que poseen unas ventajas prácticas como es la simplicidad de operación, bajos costes de fabricación y la adecuación para análisis en tiempo real. Sin embargo dado que el alcance de la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo es difícil, este tipo de biosensores han sido menos exitosos.

Recientemente los biosensores sin mediador han despertado más y más interés. La transferencia directa de electrones de la glucosa oxidasa inmovilizada ha sido alcanzada en platino o platino pulverizado, carbono vidrioso, pasta de carbono, superficies de grafito y nanotubos de carbono [27-32]. Esto sugiere que la transferencia de electrones de la glucosa oxidasa y la actividad enzimática son muy sensibles al ambiente que ha sido destruido por la actividad de la proteína que ha sido destruida siguiendo la transferencia de los electrones, o bien que la transferencia de electrones no le importa la propia enzima.

Sin duda alguna el punto más problemático en la aplicación de sistemas de biosensores *in vivo* es la estabilidad del elemento biológico sensible, (como las enzimas y las proteínas) y la señal fácil y eficiente de mediación y transducción para una mejorada sensibilidad y eliminación de las transferencias [35].

Para resolver estos problemas, los últimos años los biosensores enzimáticos han sido desarrollados y experimentados en tres estados: primera, segunda y tercera generación. Recientemente la tercera generación de biosensores basados en la electroquímica de la proteína/enzima directa ha sido desarrollada [36-38].

Comparando la primera y la segunda generación de biosensores con la tercera esta tiene una mejor sensibilidad y estabilidad porque supera algunos inconvenientes

como las posibles interferencias debido a los compuestos electroquímicos oxidables en muestras reales, y de inestabilidad de los mediadores [39-40]. La transferencia directa de electrones entre proteínas/enzimas y el electrodo puede ser considerado un proceso imitativo de la transferencia de electrones a través de las cadenas de moléculas redox en sistemas biológicos [41].

Por tanto, el estudio de directa electroquímica de las redox enzimas/proteínas a los electrodos pueden proveer un modelo de trabajo para el mecanismo de estudio de la transferencia de electrones en sistemas vivientes [42-43]. Aun así, es generalmente difícil de establecer una transferencia de electrones directa entre la proteína/enzima y los electrodos convencionales debido a la inaccesibilidad de los sitios redox de la proteína/enzima asentado en la gran estructura tridimensional [44].

2.2.1. Receptores Biológicos

Una de las principales características del material biológico empleado para la fabricación de biosensores es su alta selectividad, permitiendo diferenciar en algunos casos, isómeros de una misma molécula. Esta particularidad hace que estos componentes sean de gran interés en su aplicación como receptores en la fabricación de sensores.

Los biosensores, sobre todo los basados en transductores electroquímicos, son uno de los campos que más ha avanzado en cuanto a investigación en estos últimos años.

Existen diferentes tipos de bioreceptores que se pueden inmovilizar sobre transductores electroquímicos como son los: anticuerpos, ácidos nucleicos, microorganismos, tejidos orgánicos y enzimas.

Las enzimas son elementos más comúnmente utilizados para la fabricación de biosensores debido a su bajo coste, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación [48].

En los siguientes apartados se describirán los diferentes tipos de receptores, haciendo especial énfasis en las enzimas ya que son los receptores biológicos que se utilizan en el trabajo.

2.2.2. Anticuerpos

Los anticuerpos son, junto con el ADN, los agentes biológicos más selectivos que existen. Debido a su estructura tridimensional puede enlazarse con una sustancia, antígeno, de una manera muy específica. En los últimos diez años, se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar inmunosensores [49].

El inconveniente de este tipo de material para aplicaciones en la fabricación de biosensores es que no tiene capacidad catalítica, lo que implica el empleo de anticuerpos o antígenos marcados, con un isótopo radioactivo, enzimas, partículas luminiscentes, etc. [50].

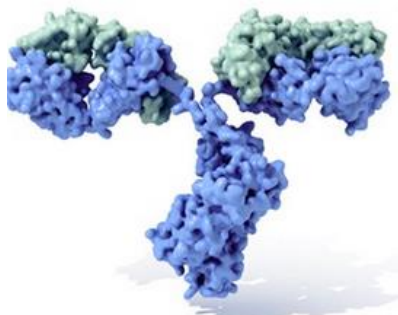


Imagen 3. Molecula de inmunoglobulina en su típica forma Y

En el caso de los inmosensores basados en transductores amperométricos, el marcaje más utilizado es mediante enzimas [50]. La corriente recogida por el transductor es proporcional a la concentración de las especies electroactivas generadas por la reacción enzimática, y por tanto, proporcional a la cantidad de anticuerpos marcados [51].

2.2.3. Ácidos nucleicos

La alta especificidad de los pares de bases, adenina/timina y citosina/guanina, distribuidas a lo largo de la doble hélice que forma la cadena de ADN, hace de este material de gran interés en la fabricación de biosensores.

Como en otros biosensores las cadenas cortas de DNA (ssADN) están inmovilizadas sobre superficies en forma de electrodos, chips o cristales según el tipo de transductor utilizado. La hibridación de esta molécula inmovilizada con su par es detectada por el transductor.

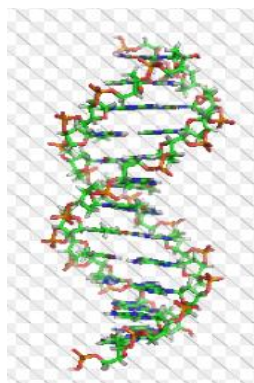


Imagen 4. Ácido nucleico AND, ácido desoxirribonucleico

Como en el caso de los anticuerpos, este tipo de material no tiene capacidad catalítica, por tanto, para su detección necesita ser marcado [48]. En el caso de utilizar transductores amperométricos, éstos suelen estar modificados con enzimas.

En este tipo de detección es muy reciente [52,53]. Las primeras publicaciones basadas en transductores electroquímicos datan de los años 90 [54-56] por tanto, aún no se ha podido aprovechar el gran potencial de este material biológico [54-56].

2.2.4. Microorganismos

Los microorganismos tienen una gran importancia en diferentes procesos biotecnológicos, en la industria vitivinícola, en procesos de síntesis de fármacos o tratamiento de agua.

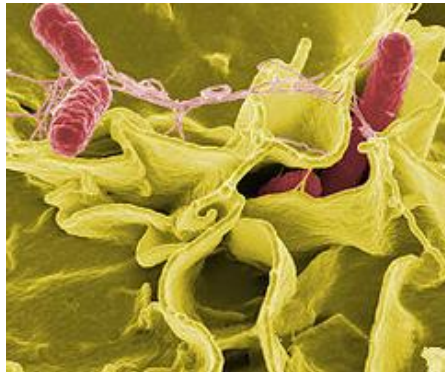


Imagen 5. Salmonella "Salmonella Typhimuriml" en rosa, en un cultivo de células humanas

Muchos biosensores basados en células han sido desarrollados para el control de dichos compuestos [57].

Los microorganismos pueden asimilar compuestos orgánicos y generar un cambio que es detectado por el transductor. Existen publicaciones donde se utilizan sensores amperométricos con microorganismos inmovilizados para el control de la calidad de aguas residuales basados en el seguimiento de la respiración celular [58,59].

2.2.4.1. Tejidos orgánicos o celulares

Los tejidos orgánicos pueden ser utilizados como elemento de reconocimiento prácticamente sin preparación. Generalmente, tienen una gran variedad de enzimas inmovilizadas, y por tanto no son tan selectivos como otros materiales biológicos. Por el contrario, están en su medio natural y es más difícil su degradación, lo que aumenta el tiempo de vida del biosensor.

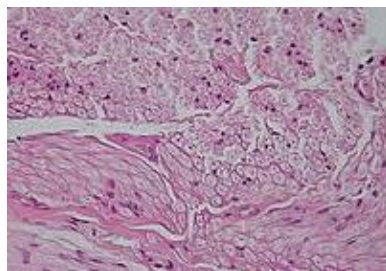


Imagen 6. Tejido nervioso obtenido a partir de una imagen con un microscopio óptico (tinción con hematoxilina-eosina)

El número de publicaciones existentes en este campo es mínimo comparado con otros receptores bioquímicos, aun así, se reportan algunos trabajos [60, 61, 62].

2.2.4.2. Enzimas

Las Enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química. Reaccionan de manera selectiva con un analito o familia de analitos, acelerando la reacción química, y sin consumirse. El mecanismo básico de la catálisis enzimática es el siguiente,



Donde S es el sustrato, E el enzima, ES el complejo enzima-sustrato y P el producto.

La actividad enzimática, está regulada por el pH del medio, la fuerza iónica, la temperatura y, requiere en algunos casos, la presencia de un cofactor.

El cofactor es un producto químico no proteico necesario para que la reacción enzimática se lleve a cabo, por ejemplo NAD⁺ u oxígeno. En el caso de este proyecto, se utilizará en gran medida la Glucosa Oxidasa, de forma que el cofactor necesario para la reacción enzimática es FAD (flavín adenín dinucleótico), el cuál es un componente común en reacciones de óxido reducción biológicas.

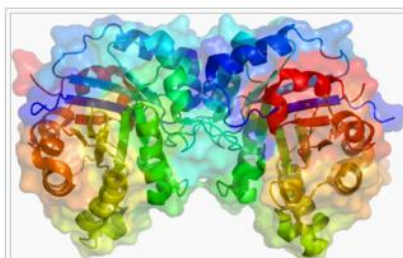


Imagen 7. Estructura de la triosafosfato isomerasa. Conformación en forma de diagrama de cintas rodeado por el modelo de relleno de espacio de la proteína. Es una eficiente enzima en el proceso de transformación de azúcares en energía en las células

Las enzimas están formadas por una estructura tridimensional compuesta por péptidos, con una zona activa que reacciona con el sustrato. Esta zona activa, que confiere especificidad a la enzima, suele estar situada en el interior de esta.

Existen diferentes tipos de enzimas, clasificados según el tipo de reacción que llevan a cabo,

- Transferasas, catalizan la transferencia de un grupo químico, de un sustrato a otro.
- Hidrolasas, catalizan reacciones de hidrólisis.
- Liasas, catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
- Isomerasas, catalizan la interconversión de isómeros.
- ligasas, catalizan la formación de enlaces C-C, C-S, C-O, y C-N por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP.
- Oxidoreductasas, catalizan reacciones de óxido reducción, es decir, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro. Debido a esta capacidad redox, son el candidato ideal para su utilización como bioreceptores en biosensores electroquímicos.

Las enzimas fueron los primeros bioreceptores utilizados, y siguen siendo hoy en día los más empleados para la fabricación de biosensores.

Una de las grandes ventajas de la utilización de enzimas, a parte de la alta selectividad que estas poseen, es su menor tiempo de respuesta en relación con los otros tipos de bioreceptores. Como inconvenientes, se debe tener en cuenta que pierden actividad al ser inmovilizadas sobre la superficie del electrodo y tiene un tiempo de vida relativamente corto.

En el presente proyecto se han utilizado tres enzimas para la conversión de los sensores a biosensores:

- Glucose oxidase G7141 Type X-S
- Tyrosinase from mushroom T3824-250KU (Lot ≠ SLBB1018U)
- Laccase from Trametes versicolor 53739

2.3. Métodos de Inmovilización

La inmovilización del material biológico es un proceso por el cual se confina el bioreceptor sobre el transductor electroquímico para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad.

Los métodos de inmovilización son los pasos más importantes en la realización de los biosensores ya que las características más importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad, dependen en gran medida de la metodología de inmovilización elegida.

Las ventajas del empleo del material biológico inmovilizado principalmente residen en [64]:

- Aumento de la estabilidad del receptor biológico
- Posible reutilización del biosensor, disminuyendo por lo tanto el coste del proceso.

No obstante, este proceso presenta inconvenientes como pueden ser [65]:

- Alteración de la conformación del material biológico respecto a su estado nativo.
- En el caso de que se utilicen Enzimas, existe pérdidas de su actividad catalítica.

Los métodos de inmovilización pueden ser divididos en dos grupos [65]:

- Retención física
- Unión química

Se puede observar un organigrama de la clasificación de los métodos de inmovilización en la *imagen 8*.

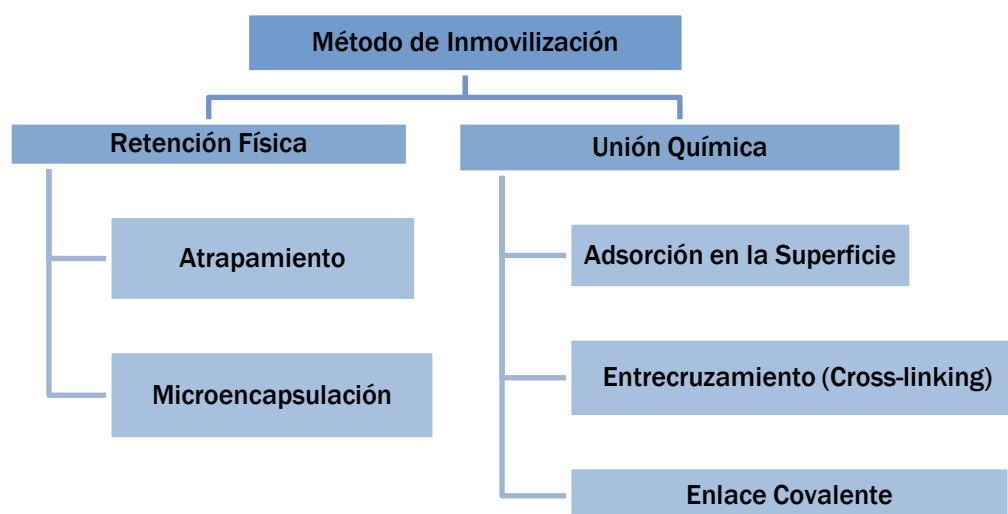


Imagen 8. Clasificación de los métodos de inmovilización

En el presente trabajo de modificación de sensores voltamétricos con nanopartículas de TiO₂, se presenta también la modificación con enzimas para dar lugar a biosensores modificados con nanopartículas, el proceso elegido para ello, han sido los métodos de inmovilización, y por ello en los apartados a continuación se explicarán estos en más detalle.

2.3.1. Atrapamiento

Este método de inmovilización consiste en la retención física del enzima en las cavidades inferiores de una matriz sólida porosa como aparece en la *imagen 9*, que se constituye habitualmente de monómeros fotocurables, o polímeros del tipo poliacrilamina, colágeno, alginateo, carraginato o resinas de poliuretano. También se suelen utilizar hidrogeles como poli-(2hidroxyetil metacrilato) (p (HEMA)) o polímeros conductores como puede ser el polipirrol, componente que ha sido utilizado por el grupo de investigación de sensores de la Universidad de Valladolid en sus últimas investigaciones [67].

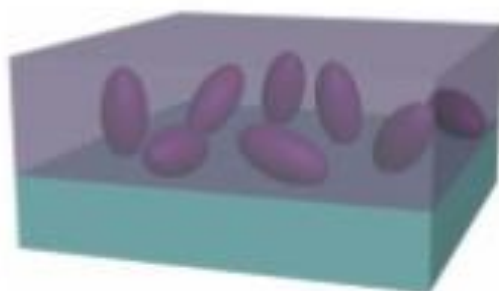


Imagen 9. Inmovilización enzimática por atrapamiento

El atrapamiento, desde el punto de vista experimental, es de gran sencillez, y además no requiere de una gran cantidad de material biológico para su realización. Por último, la enzima utilizada, durante el proceso de conversión de un sensor en biosensor, no sufre ninguna alteración en su estructura.

Por el contrario, uno de sus inconvenientes es la barrera creada que dificulta la difusión del analito hasta el centro activo de la enzima, aumentando el tiempo de respuesta del sensor [57].

Durante este proceso se requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, debido a que pueden alterarse los grupos reactivos de la proteína, provocando así pérdidas en la actividad enzimática que estábamos buscando.

2.3.2. Microencapsulación

Esta técnica se basa en rodear las enzimas con membranas semipermeables que permitan el paso de moléculas de sustrato y producto pero no de encima.

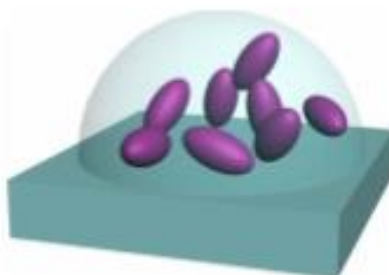


Imagen 10. Inmovilización enzimática mediante microencapsulación

De esta forma se permite que el material biológico esté en contacto directo con el transductor, con la ventaja de que a su vez, se mantiene la alta selectividad de los enzimas puesto que no se ven afectados por los cambios de pH, temperatura o fuerza iónica en el medio [57].

2.3.3. Adsorción en la superficie

Durante la adsorción de la enzima, esta, se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Para realizar este proceso, se suelen utilizar diferentes sustancias con gran capacidad de adsorber material biológico, como por ejemplo, alúmina, arcilla, grafito y sílica de gel.



Imagen 11. Inmovilización enzimática por adsorción sobre la superficie

Este proceso de unión entre la enzima y el sensor se ve afectado por diferentes factores, entre los que se pueden destacar:

- El pH del medio, que controla el número y naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y el sólido.
- La fuerza iónica, al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción del enzima, debido a que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.
- El diámetro del poro, que debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima.
- La presencia de iones, los cuales actúan como cofactores del enzima, ya que pueden incrementar a carga enzimática del derivado.

Este método de preparación es muy sencillo, de bajo coste y no implica un cambio de especificidad de la enzima, pero algunos de sus inconvenientes es que es poco estable mecánicamente, de forma que la unión con el soporte es débil.

2.3.3. Entrecruzamiento (cross-linking)

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estabilizar enzimas [68]. El método se basa en la utilización de reactivos bifuncionales como pueden ser los dialdehidos, diminoésteres, disocianatos, sales de bisdiazonio, e incluso, diaminas, si están activadas con carbodimida, que originan uniones intermoleculares entre moléculas de enzima. Los entrecruzadores más habituales están el glutaraldehido, hexametildisocianato y 1,5 dinitro- 2.4- diflorobenzeno [57].



Imagen 12. Inmovilización enzimática por adsorción sobre la superficie

El entrecruzamiento hace posible eliminar las pérdidas de actividad enzimática por efectos difusionales, entrecruzando el material biológico con proteínas sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina.

2.3.4. Procedimientos mixtos

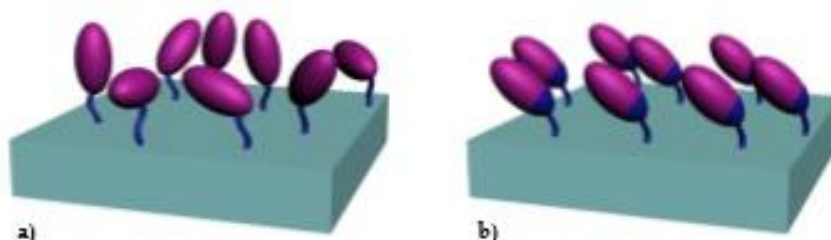
Debido a que todos los procesos tienen inconvenientes, surge la posibilidad de combinar procesos y así poder combinar los efectos positivos de ambos, resultando un procedimiento final, con ventajas debidas a la combinación que previamente no se podían obtener.

Un procedimiento mixto muy común en la inmovilización es el que primero se inmoviliza la enzima por adsorción en una matriz polimérica, de forma que se consigue una carga enzimática elevada, y posteriormente se modifica, mediante entrecruzamiento [69-70].

2.3.4.1. Unión covalente

Es una metodología distinta en el proceso de unión entre el transductor y la enzima que se realiza mediante una unión covalente. Esta se basa en activar dos grupos químicos del soporte, de forma que reacciones con nucleófilos de las proteínas.

En la estructura de las enzimas se encuentran 20 aminoácidos diferentes, pues bien, los más empleados para la formación de estos enlaces covalentes son principalmente la lisina, mismo aminoácido utilizado en el proceso de cross-linking, la cistena, la tirosina y la histidina principalmente. El resto de los aminoácidos no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie protéica debido a su carácter hidrófobo por lo que no pueden intervenir en una unión covalente [57].



*Imagen 13. Inmovilización enzimática mediante unión covalente
a) no orientada, b) orientada*

Durante la ejecución de este proceso de inmovilización, es necesario el control de parámetros como el pH o la fuerza iónica de la solución, además de la necesidad de una superficie del transductor perfectamente limpia. Mientras que la principal ventaja de este método es el tiempo de vida de entre 4 y 14 meses, considerados en este tipo de metodologías, duraciones de carácter muy largo [57].

2.4. El dióxido de titanio

El TiO_2 es un material conocido por tener un buen efecto catalizador de muchas reacciones químicas y por ello funciona como detector de antioxidantes. En los últimos años, los óxidos de metales de transición han sido estudiados extensamente. Entre ellos el TiO_2 , debido a que es un importante material semiconductor. Así mismo es uno de los principales componentes de pinturas, pigmentos, cosmética y productos alimenticios. Sus aplicaciones incluyen además la oxidación catalítica del monóxido de carbono [4,5].

El dióxido de titanio existe en tres formas cristalinas, anatasa, rutilo y brookita. Comencemos por describir brevemente alguna característica de las estructuras cristalinas de estas tres formas del TiO_2 .

Rutilo: Cristaliza en el sistema tetragonal, grupo espacial, $P4_2/mnm$

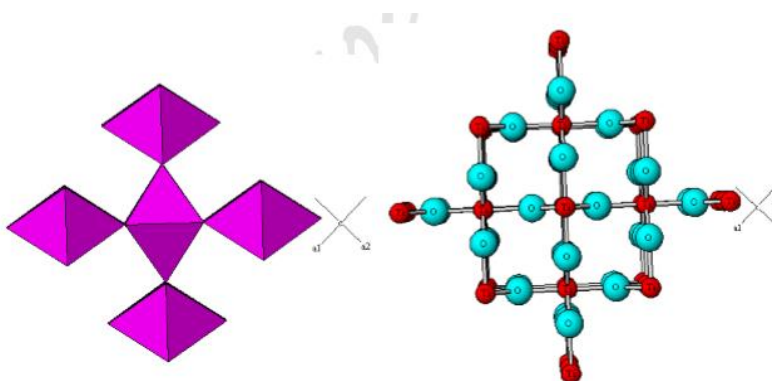


Imagen 13. Estructura cristalina de rutilo

El TiO_2 aparece en dos polimorfos relativamente raros a parte del rutilo, anatasa, la cual cristaliza en el sistema tetragonal ($I4_1/amd$), y brookita que cristaliza en el sistema rómbico ($Pcba$). Ambos polimorfos tienen empaquetado AB de O, pero la secuencia de dicho empaquetado es distinto [6].

En la anatasa los octaedros de TiO_6 comparten 4 aristas, en brookita 3 y en rutilo solamente comparten 2.

Si bien la anatasa es la fase más utilizada en la catálisis heterogénea, es importante controlar la transición entre fases en el dióxido de Titanio [5]. Además se ha observado que la fase de rutilo en el microscopio es la fase más estable con tamaños menores a 14nm, mientras que las partículas amorfas de la titania se transforman en anatasa con tamaños mayores a 2.5-3 nm.

La transición entre estas dos fases depende de los reactivos y condiciones de la síntesis así como de la forma y tamaño de la partícula. La importancia de determinar en qué fase del dióxido de Titanio se está trabajando recae en que la

eficiencia de este compuesto está relacionada principalmente con su estructura cristalina y en su morfología.

Durante la síntesis del TiO_2 se utilizan distintos elementos químicos como dopantes. Estos han sido estudiados en una gran cantidad de metales, debido a que actúan como receptores de electrones y minimizan la recombinación de cargas generadas. No obstante, estos metales actúan como sitios de recombinación de cargas y provocan una disminución notable de la actividad catalítica.

Para nuestro proyecto hemos elegido la fase de la anatasa ya que esta es la fase más comercial del dióxido de titanio y además ha sido la forma cristalina más investigada debido a su alta actividad en aplicaciones fotocatalíticas [1].

La anatasa tiene una estructura cristalina tetragonal como ya ha sido expuesto con anterioridad, además tiene una banda de salto de 3.23 eV, por ello ha sido utilizada en procesos fotocatalíticos y fotoelectrolíticos.

No obstante el proceso por el que se obtienen las nanopartículas es muy amplio, hay muchas técnicas que nos permiten obtener nanopartículas procedentes de la titania, pero el método sol-gel nos ofrece una alta homogeneidad, que como se verá posteriormente es una de los puntos claves en la fabricación de los sensores. Además tiene una temperatura de procesamiento baja, tiene estabilidad y por último mucha versatilidad en los procesos.

Por todas estas razones en este proyecto se eligió este material entre todos los óxidos de metales que en los últimos años han sido objetivo de investigación en la mejora de las propiedades de los sensores. El dióxido de Titanio modificará la pasta de nanopartículas de Carbono inicial, proporcionándole a esta unas ciertas propiedades electrocatalíticas objetivo de estudio.

2.5. Electrodo de pasta de carbono

Como se ha desarrollado a lo largo de este proyecto, existen varios tipos de electrodos y como consecuencia, múltiples métodos de preparación de electrodos.

La reciente, pero importante, adición de nanopartículas a los sensores ha sido decisiva a la hora de aumentar la relación superficie/volumen, provocando así una mayor rapidez de la adsorción y desadsorción de las moléculas de analito. Otra de las grandes ventajas de la adición de nanopartículas a los la organización estructural que se consigue, es la obtención de propiedades diferenciadas frente a materiales de molécula gruesa.

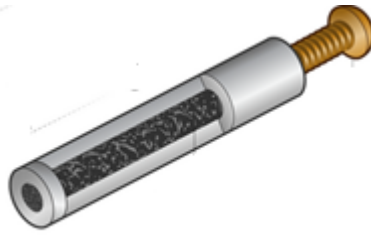


Imagen 14. Electrodo de pasta de carbono en un nanotubo con un tornillo de Cobre como conductor eléctrico

Los métodos de preparación de electrodos han sido referenciados en múltiple bibliografía que mencionan diferentes investigaciones relacionadas con este tipo de metodologías, siendo los más frecuentes los métodos Langmuir-Blodgett , Layer-by-Layer y monocapas autoensambladas [62, 70, 71].

Algunos otros métodos de fabricación de electrodos son casting, adsorción, Screen Printing método Sol-Gel o electrodos de pasta de carbono. Siento estos últimos la base de nuestra investigación

Estos electrodos serán nuestro punto de partida, los cuales serán modificados mediante la adición de nanopartículas y material biológico como enzimas.

2.6. Vino y componentes

El vino es un componente básico de la dieta mediterránea, puede incluso, ser uno de los factores responsables de la baja incidencia de enfermedades del corazón en la población según estudios realizados. Así mismo, la dieta mediterránea ha demostrado durante mucho tiempo los beneficios a la salud que se obtienen con la ingesta de alimentos y bebidas ricas en antioxidantes como manzanas, aceite de oliva y vino.

Una de las grandes cualidades del vino es la gran variedad de sabores, colores, olores y sensaciones en boca que este produce. Si bien con el paso de los años el sector vinícola ha ido avanzando en la detección de todas estas variedades, con la ayuda de los catadores de vino que enseñan a su lengua a distinguir sabores y sensaciones, es necesario establecer otro tipo de ayuda para determinar todas las características de un vino.

Las empresas vinícolas han contado a lo largo de su historia con laboratorios, que durante el proceso de creación del vino, les han ayudado a tener una idea las propiedades que tendría el producto final, aun cuando el vino simplemente se estaba fermentando. Pese a dichas herramientas, con el paso de los años se ha hecho palpable la necesidad de una forma de medición más precisa, rápida, y barata de los componentes del vino [8].

Si bien, el desarrollo de nuevos métodos se basa en la productividad y mejora de procedimientos y productos finales en la elaboración del vino, también se puede entender como una anticipación a los procesos de catas que se realizan mediante expertos, los cuales, han estudiado los vinos y sus características en profundidad.

La evaluación sensorial de los alimentos, y en concreto del vino, es una disciplina científica cuyo objetivo es estudiar las sensaciones que producen dichos productos. Cuando consumimos un alimento, nos llegan unos estímulos visuales, como pueden ser el color, forma, brillo, estímulos táctiles, olorosos y gustativos que percibimos en las papilas gustativas, e incluso podemos llegar a percibir estímulos auditivos.

Dentro de la evaluación sensorial, existen gran variedad de pruebas en función del resultado buscado. El análisis sensorial descriptivo cuantitativo, que pretende cuantificar los estímulos que se perciben en los alimentos, tiene especial relevancia.

Esta evaluación sensorial presenta como dificultad asociada la variabilidad en las respuestas del instrumento de medida utilizado, esto es, los órganos de los sentidos de un catador en el caso del vino. Pues bien, en el desarrollo de las nuevas actividades, esta variabilidad sigue estando presente, y es por ello, por lo que se han ido desarrollando en los últimos años, diferentes métodos de detección de componentes, como pueden ser las lenguas electrónicas.

Si bien es conocido que la percepción de un mismo estímulo no es igual para todas las personas, es posible incluso, que un mismo estímulo presentado en diferentes momentos, pueda ser percibido de forma distinta por un mismo individuo. Por ello, y para superar dificultades que se puedan presentar, es muy importante lograr asegurar la fiabilidad de los resultados [63].

Las características que tendrá un vino tras el proceso de elaboración dependerán de los compuestos que estuvieran presentes en la uva y en las concentraciones en las que se encontraban. Especialmente las propiedades organolépticas y antioxidantes de las uvas, mostos y vinos, las cuales, están íntimamente relacionadas con la composición química [62].

Es por ello, de gran interés satisfacer la necesidad de desarrollar una herramienta que sea capaz de discriminar entre el máximo de estos compuestos, de forma que se pueda determinar perfectamente las características finales que tendrá el vino, no solo hablando en un ambiente químico, sino también en cuanto a las propiedades alimenticias que poseerá.

La capacidad de determinar los diferentes compuestos y las concentraciones en las que estos aparecen, dará una idea del color, sabor y sensación en boca que se obtendrá en el producto final, pudiéndose así, realizar modificaciones durante el proceso de creación de la bebida fermentada a base de uva. Principalmente, en las denominaciones de origen, existe una finalidad de proteger y promocionar el origen y calidad de los productos alimenticios.

La evaluación de la calidad sensorial del vino, posee una larga lista de antecedentes, y han sido muy numerosos, los intentos por desarrollar métodos en este sentido, por ejemplo, la cata de vinos mediante el gusto humano. Si bien, con el desarrollo de proyectos como este, la capacidad de evaluación de la calidad sensorial del vino, puede ser mejorada, mediante la utilización de métodos desarrollados con últimas tecnologías como puede ser la nanotecnología.

Para evaluar la calidad sensorial de los vinos, incluso dentro de una misma denominación de origen, es indispensable conocer las características organolépticas y con ello, desarrollar una metodología apropiada [7].

Concretamente, y debido a las propiedades que los compuestos químicos existentes en las uvas confieren al vino, es evidente que existirán diferencias entre un vino blanco, rosado o tinto, no solo en apariencia, si no también, químicamente hablando. *Franco María Martinetti* presidente de la Academia Internacional del vino comenta sobre la bebida derivada de fermentación de las uvas, “el vino no es un producto sin personalidad. El vino cuando se evoluciona en su consumo y se profundiza en su conocimiento es elegancia, equilibrio y expresión”.

2.6.1 Proceso de cata, propiedades químicas y componentes

Durante el proceso de la cata de un vino se habla de un parámetro denominado equilibrio que puede ser definido como, la situación en la que el dulzor del vino compensa el conjunto formado por la acidez, la astringencia y el amargor.

El dulzor del vino viene determinado principalmente por el etanol y el glicerol.

La acidez se debe a los ácidos orgánicos que contiene el vino, principalmente el ácido tartárico y el ácido láctico, aunque también contribuyen otros como pueden ser el ácido cítrico, acético, succínico, etc.

El amargor viene determinado por los flavonoides, siendo las catequinas (monómeros tánicos), más amargas que sus polímeros. Las procianidinas, algunos glicósidos, terpenos y alcaloides también pueden proporcionar amargor. El origen de estas sustancias se localiza en los hollejos, raspón y especialmente en las pepitas del racimo de uva. Es por ello, que el procesamiento del racimo y de las uvas contribuirá al resultado final del vino.

La astringencia viene dada por los polifenoles o taninos, muy diversos y presentes en el vino con diferentes grados de polimerización. Los taninos de tamaño medio son los principales responsables de la astringencia. Muchos de estos compuestos, pueden también, aportar sabores amargos, es por ello que la astringencia de un vino es potenciada si la acidez del vino es alta. Los polifenoles están presentes en las pepitas y hollejos, y en menor cantidad en el raspón.

El envejecimiento de los vinos en una barrica suele disminuir la astringencia, debido a que durante la crianza, se produce la polimerización de muchos de estos compuestos astringentes, dando lugar a moléculas de mayor tamaño, incapaces de unirse a la mucina de la saliva. Así mismo, la madera, material utilizado en el envejecimiento en barrica, contribuye en la aportación de polifenoles en el vino.

La evolución de la astringencia es de gran importancia durante la creación de un vino, y es por ello, que resulta muy interesante encontrar métodos que sean capaces de determinar la evolución en concentración de compuestos como los fenoles [63].

Tal y como se ha dejado plasmado en este apartado, la uva le confiere al vino unas propiedades únicas. De esta forma, el vino rojo es una bebida mucho más compleja que el vino blanco y contiene un mayor número de polifenoles, incluyendo formas oligoméricas y polifenólicas. Los vinos rojos contienen altas concentraciones de flavan-3-ols, ácido caféico y sus derivados, y ácido gálico [7,8]. Todos estos componentes químicos son capaces de oxidarse y por ello podrán ser observados mediante técnicas como la voltametría cíclica, donde a través de la determinación de los picos de oxidación y reducción podremos determinar, el tipo de fenol y la concentración en la que aparece en una muestra. Mientras que, el vino blanco presenta apenas astringencia, o lo que es lo mismo una cantidad menor de polifenoles, caracterizados por ser colorantes presentes en los hollejos [63].

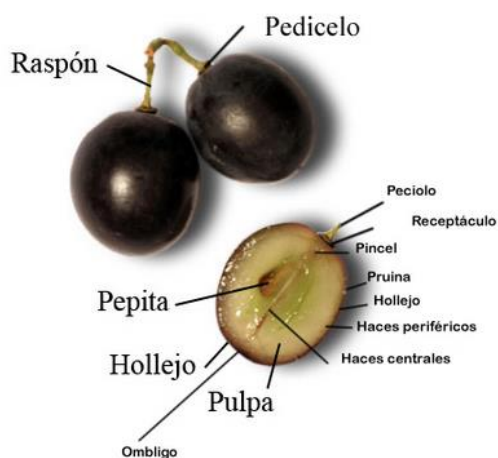


Imagen 15. La uva y sus diferentes partes

Como se ha comentado en los párrafos anteriores, tanto las uvas, como los vinos son sustancias, complejas, formados por una variedad de compuestos químicos entre ellos podríamos destacar los siguientes:

Ácidos orgánicos, los cuales afectan a la estabilidad del zumo, además, son utilizados como indicadores de alteraciones microbiológicas en la bebida [62].

Los principales ácidos que podemos encontrar en los jugos precedentes de las uvas son el ácido tartárico y málico. El vino también cuenta en su composición con ácidos cítricos que se presentan en concentraciones más bajas [62]. Por último, durante la última etapa de elaboración del vino, nos encontramos con ácidos como el ácido láctico, el cual también juega un papel importante en el resultado final del producto.

Los fenoles también son algunos de los componentes en los que es rico el vino. Son estos compuestos, los que han atraído un especial interés debido a su actividad antioxidante y su importante influencia en las propiedades organolépticas [62]. En particular, los ácidos fenólicos, como el gálico el Catecol y el Cafeíco han sido estudiados por su capacidad antioxidante y por actuar como dilatador venoso [62].

Los antioxidantes presentes en un vino, no solo son beneficiosos para la salud sino que además están íntimamente relacionados con la calidad de los alimentos y bebidas ya que contribuyen a sus características organolépticas. Además, dichos compuestos son un punto clave en la preservación de alimentos.

Las ventajas beneficiosas para la salud de estos compuestos, derivan principalmente de la acción de los antioxidantes como liberadores de radical libre e inhibidores de la oxidación de la lipoproteína. En este sentido, existen evidencias, de que las propiedades antioxidantes del vino recaen directamente en los compuestos fenólicos. Por ello, los antioxidantes y su detección en vinos, será uno de nuestros principales objetivos a lo largo de este proyecto.

Las razones por las que su estudio es tan importante no se quedan aquí, ya que, los compuestos fenólicos del vino, incluyen un gran grupo de especies químicas que afectan al sabor al color y a la sensación en la boca que se obtendrá en el vino final.

Al introducirse en el estudio de la actividad antioxidante de los vinos, ha sido recomendado en diferentes bibliografías consultadas, el uso de múltiples métodos de estudio, de forma que, se reúna diferente información. No todos los antioxidantes reaccionan con ciertas especies de oxidación pero pueden hacerlo con otras. Como consecuencia, diferentes métodos proporcionan información complementaria [8,9].

Hasta el momento, muchas de las técnicas usadas en la detección de antioxidantes han sido desarrolladas para el análisis de muestras a nivel de laboratorio que requieren de técnicas pretratamiento complejas y lentas. Por ello la introducción de nuevas tecnologías, como es el uso de electrodos a base de carbono y modificados con nanopartículas, ha sido de tanto interés en el ámbito vitivinícola.

Debido al interés de determinar estos compuestos, que son tan importantes en la calidad de la uva y el vino, no solo se ha intentado desarrollar sensores, sino que, además, se han llegado a desarrollar biosensores, como alternativa a técnicas de laboratorio tradicionales. Las principales razones son su reducido precio y la simplicidad de las herramientas necesarias.

En concreto, en la detección de antioxidantes, con biosensores ha sido hasta ahora con el uso de sensores amperométricos en los que se han inmovilizado tres enzimas principalmente, lacasa, tyrosinasa y/o peroxidasa.

Este tipo de sensores para el análisis de antioxidantes es muy prometedor y representa una alternativa muy llamativa para la detección de estos compuestos, pero aún es necesario un mayor trabajo futuro para eliminar o determinar el origen de las interferencias observadas en este tipo de análisis.

Así mismo el hecho de que la astringencia y la acidez del vino estén relacionadas, nos da a entender que los fenoles y los ácidos estarán presentes en forma de mezcla en un vino. Por tanto, es de gran interés el estudio de sensores modificados con nanopartículas o biosensores, capaces de distinguir entre los elementos de la mezcla, tal y como se ha comentado en los últimos párrafos, y tal y como se presenta en los objetivos de este proyecto.

2.6.2. Azúcares

Dentro de los azúcares podemos encontrarnos tres tipos distintos en función del número de sacáridos que contienen:

- Monosacáridos o azúcares simples, como la glucosa o la fructosa.
- Disacáridos, compuestos de dos sacáridos en la cadena. Pertenecen a este grupo la lactosa, la sacarosa o la maltosa.
- Oligosacáridos, compuestos por tres sacáridos en la estructura. Pertenecen a este grupo la maltotriosa o rafinosa.

Debido al importante papel de un azúcar como la glucosa en este proyecto se describirá en otros apartados este compuesto en más profundidad.

CAPÍTULO III. Desarrollo

En este apartado se desarrolla el grueso del proyecto antes de mostrar los resultados obtenidos tras la experimentación realizada en los meses de investigación.

Primero se comentará y explicará brevemente cual ha sido el método de experimentación y medida utilizado, la voltametría cíclica. A continuación se desarrollará el procedimiento de fabricación de los electrodos, tanto de pasta de carbono como las modificaciones de estos, así mismo, se explicará cuál es el método de modificación para obtener biosensores. El siguiente y último paso será mostrar el material necesario para realizar las medidas necesarias en el laboratorio.

3.1. Método de experimentación y medida

En el presente proyecto se han realizado un gran número de experimentos de laboratorio, y como se desarrollará durante la exposición de los resultados obtenidos en posteriores apartados, no solo el proceso, pero también el material utilizado es de gran importancia a la hora de poder comparar resultados y poder evaluar la reproducibilidad de los datos obtenidos.

Dentro de la química analítica, campo en el que se desarrolla el presente proyecto, se encuentran, diversas técnicas electroquímicas para determinar las características de un analito, como por ejemplo las que aparecen en la *imagen 16*.

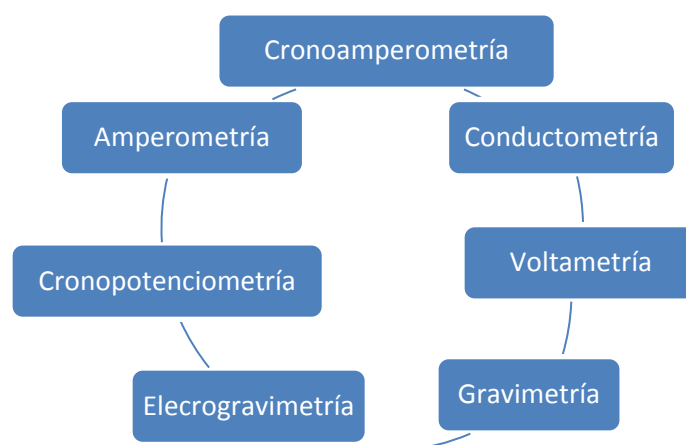


Imagen 16. Esquema de las técnicas electroquímicas para la detección de un analito

En el presente proyecto se utilizará como técnica de análisis electroquímico para la caracterización de analitos la voltametría cíclica. A continuación explicamos brevemente en qué consiste.

3.1.1. Voltametría cíclica

La voltametría es un grupo de técnicas electroquímicas en las que se tiene una respuesta corriente frente potencial de un electrodo polarizable en una solución que se analiza.

El interés de estas técnicas reside, en el estudio de los cambios de corriente función del potencial aplicado a través de una celda electrolítica. Estos cambios nos darán una idea de que solución se analiza y nos posibilita el trabajar a bajas concentraciones de analito.

El proceso de una voltametría se basa en una electrólisis de una o más especies electroactivas, que se plasma en un gráfico intensidad-corriente denominado voltamograma. La electrólisis consiste en una oxidación y reducción de un analito que se encuentra en la celda electrolítica, debido a una aplicación de potencial a través de un electrodo de trabajo.

El analito que se pretende analizar en una voltametría posee una especie electroactiva que será la que realmente se detecte mediante este proceso. Para ello, es necesaria la creación de una celda electroquímica, que en el caso de este proyecto será de tres electrodos (referencia, trabajo y contraelectrodo), y por supuesto una disolución en la que se encuentre nuestro analito.

Un esquema de la configuración de una celda electrolítica se representa a continuación en la *imagen 17*.

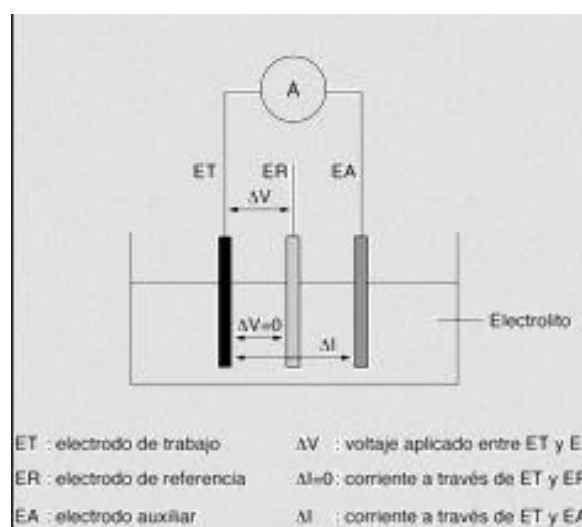


Imagen 17. Esquema de configuración de una celda electrolítica típica de tres electrodos

En la celda electrolítica se origina una diferencia de potencial entre el electrodo de referencia (RE) y el de trabajo (ET) y existe una medición de intensidad entre el electrodo de trabajo (ET) y el electrodo auxiliar o contraelectrodo (EA).

En el presente proyecto se ha trabajado en la fase experimental con un electrodo de referencia $\text{Ag}|\text{AgCl}/\text{KCl}$ 3M, uno de los más utilizados como electrodo de referencia a la vez que los calomelanos saturados. El electrodo de referencia consta de un hilo que se recubre con AgCl (cloruro de plata), este se localiza en una solución de cloruro potásico (KCl) 3M. Se puede observar un esquema típico de este electrodo a continuación.

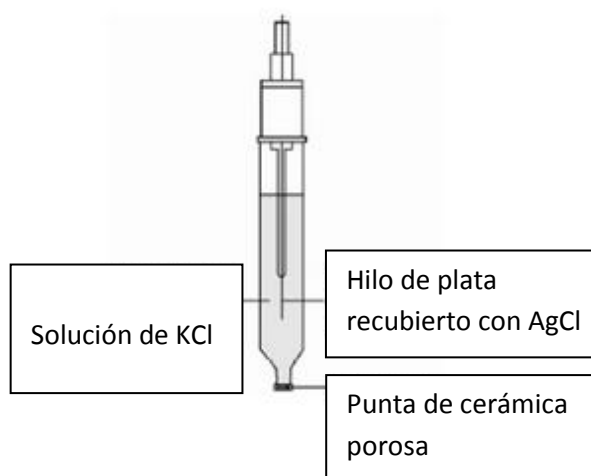


Imagen 18. Esquema típico de un electrodo de referencia

El electrodo de referencia se encarga de medir la diferencia de potencial que hay entre él y el electrodo de trabajo. Este electrodo se encontrará constante a dicho potencial.

En cuanto al contraelectrodo o electrodo auxiliar, se trata de un material conductor, que transmite la corriente desde la fuente al electrodo de trabajo a través del analito. Durante la fase experimental se utilizó un hilo de platino de 1 mm de diámetro como contraelectrodo.

Por último el electrodo de trabajo, del que existen una gran variedad de opciones de sustratos. En este proyecto se ha utilizado una matriz base de pasta de carbono modificada con otros elementos como catalizadores y enzimas, que modifican las propiedades de este.

El electrodo de trabajo es la parte más importante en el desarrollo de la investigación y será desarrollado en profundidad tanto su fabricación, como su utilización y por supuesto, la respuesta que nos ofrece ante distintos analitos analizados. Como electrodo de trabajo también se empleará en el desarrollo de este proyecto biosensores.

En la celda electrolítica se originan las reacciones que nos proporcionan las distintas señales que podemos observar en un potenciostato. Estas reacciones de reducción u oxidación de una especie contenida en una disolución se obtienen en un cierto potencial de trabajo, para esos puntos se producen aumentos de intensidad que se traducen como picos en los voltamogramas.

Los voltamogramas que observamos en el potenciostato, componente que proporciona el voltaje de polarización y que mide la intensidad de corriente producida en el proceso, son característicos de una concentración, de un electrodo, del analito que se esté analizando, de la velocidad de reacción... etc.

Es decir, obtenemos una señal única que nos relaciona nuestro electrodo de trabajo con el analito que se está midiendo, este voltamograma pasa a ser, de algún modo, la huella dactilar de nuestro sensor en ese analito.

El proceso de obtención de un voltamograma sucede en el interior del potenciostato con las diferencias de potencial e intensidades que este mide en la celda electroquímica. Se genera a partir de una función de barrido una tensión que se aplica a los electros, se mide una respuesta en forma de intensidad y se representan ambas variables en el voltamograma.

Los voltamogramas, por tanto, dependen de la función de barrido que se introduzca en el potenciostato, algunas de ellas son la onda cuadrada, el impulso diferencial...etc. Además de la técnica de análisis utilizada para la medición de la señal, en nuestro caso la voltametría cíclica tal.

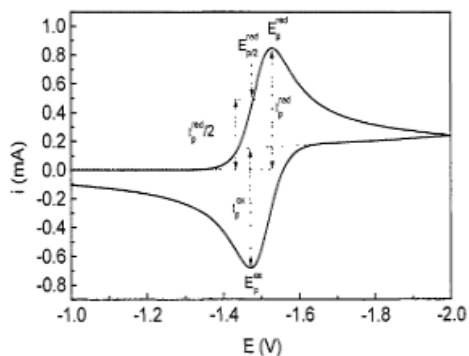


Imagen 19. Esquema de un ciclo de voltametría cíclica típico

En el presente proyecto se ha utilizado una voltametría cíclica cuya función de barrido aparece en la imagen 20 en la esquina superior izquierda.

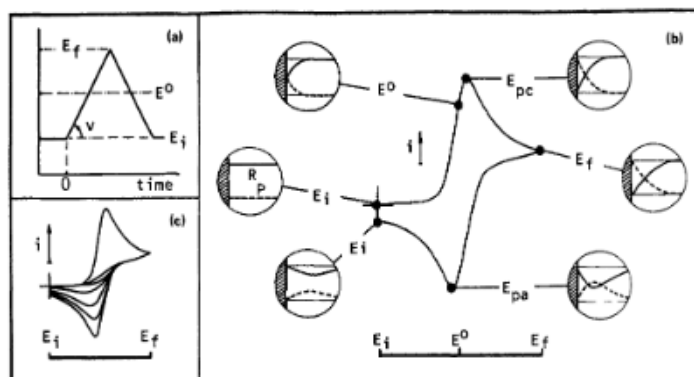


Imagen 20. Esquema de barrido (arriba izquierda), fenómeno de repetitividad voltametría cíclica (abajo izquierda), puntos característicos de un voltamograma cíclico (derecha)

La voltametría cíclica se basa en la variación de potencial en un electrodo estacionario colocado en una disolución no agitada, de forma que esta disolución, genera una señal o función de barrido triangular como en la imagen 21.

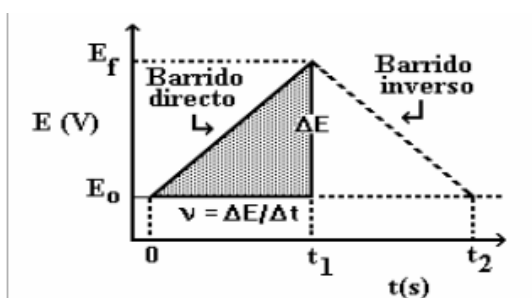


Imagen 21. Señal o función de barrido triangular típica

Como se puede observar en la figura anterior, el potencial oscila entre E_0 y E_f , valor para el cual el barrido se invierte hasta que el potencial vuelve a su valor de inicio E_0 . Este ciclo se repetirá tantas veces como la experimentación así lo requiera.

El potencial al que se produce la inversión se denomina potencial de cambio (E_c). Dicho potencial de cambio es un intervalo, variable en función del experimento. Será elegido en cada experimento ya que es donde tiene lugar la reacción de oxidación o reducción, controlada por difusión de una o más especies.

La dirección de barrido puede ser positiva o negativa en función del estudio, lo cual da pie a la necesidad de un convenio que en el presente proyecto se ha considerado de la forma que sigue:

- Intensidades positivas serán las corrientes anódicas
- Intensidades negativas serán corrientes catódicas

El punto de inversión del potencial E_r , en la *imagen 21*, es decir puntos con el valor de la tensión más alto que en el entorno, ya sea a intensidades positivas o negativas, lo denominaremos pico. Dicho pico corresponde a puntos de reducción u oxidación del analito en función del signo de la intensidad de corriente:

- Pico a intensidades positivas obtendremos picos de oxidación
- Pico a intensidades negativas obtendremos picos de reducción

Estas relaciones entre tensiones e intensidad se observan en los voltamogramas de forma similar a la *imagen 22* en la que podemos observar un esquema general de registro de intensidad en función de la tensión aplicada. En él, se observa:

- Pico de reducción para una intensidad de -0.6 mA y tensión de -1.45 V
- Pico de oxidación para una intensidad de 0.8 mA y tensión de -1.55 V

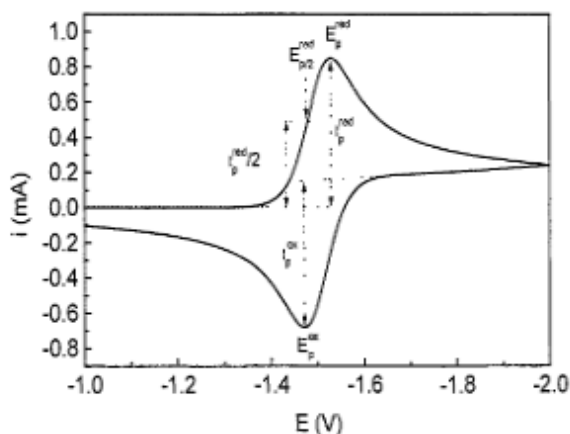


Imagen 22. Voltametría cíclica y la representación de los picos existentes en un voltamograma cíclico

Teniendo en cuenta la información que nos proporciona un voltamograma, podemos describir y caracterizar un analito a partir de reducciones y oxidaciones (picos redox), por su morfología y sus intensidades de corrientes producidas.

Existen varias propiedades en la voltametría cíclica de gran importancia a la hora de describir el proceso y los resultados obtenidos en un voltamograma. Una de ellas es la reversibilidad o irreversibilidad de un proceso redox calculada a través de la respuesta obtenida en forma de voltamograma que se explica a continuación.

Una de las características que se van a buscar en un ensayo será si el proceso es reversible o irreversible. Para que nos encontremos en un proceso del primer tipo, es necesario que, al realizar el barrido inverso del potencial durante un experimento, haya un desplazamiento a través de las posiciones de equilibrio de

forma que se reduzca el producto de la electrólisis y se obtenga así, el componente inicial.

A la hora de medir la reversibilidad o irreversibilidad de un proceso se han de cumplir una serie de condiciones relacionadas con los parámetros básicos de la voltametría:

- La diferencia de potencial entre ambos picos ha de cumplir:

$$\Delta E = E_{oxi} - E_{red} = \frac{59}{n} mV$$

Ecuación 5. Diferencia de potencial entre picos

Siendo n el número de picos

- El potencial de aparición de los picos no varía con la velocidad de barrido
- El cociente entre las intensidades de los picos de reducción y oxidación es 1, es decir, ambas intensidades coinciden:

$$\left| \frac{I_{oxi}}{I_{red}} \right| = 1$$

Ecuación 6. Cociente entre intensidades

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

A la hora de realizar el proceso de la voltametría cíclica en el ensayo de los sensores y biosensores se ha utilizado un potenciostato-galvanostato EG&G PARC 273 y una celda electrolítica de tres electrodos similar a la comentada previamente.

3.2. Reactivos y disoluciones

Los reactivos utilizados durante el desarrollo de este proyecto han sido usados sin ser purificados más allá de la forma comercial en la que se obtuvieron, a continuación se muestran los reactivos utilizados, con sus datos técnicos, laboratorios de compra y características más importantes.

Todos los experimentos, la limpieza y la base utilizada para disolver los tampones químicos y blancos, será agua des-ionizada Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

La mayoría de las disoluciones obtenidas en el laboratorio a base de estos reactivos, se han realizado, disolviendo los compuestos en una solución de Tampón fosfato (Buffer Fosfato), en algunas ocasiones se ha utilizado Cloruro de Potasio.

3.2.1. Buffer Fosfato

El blanco de esta solución de tampón químico se ha realizado de la siguiente forma para la obtención de 500 mL

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \rightarrow 0.3659 \text{ g}$
- $\text{NaHPO}_4 \rightarrow 0.2697 \text{ g}$
- Agua des-ionizada

Las características de esta solución es 0.01 M y pH 7, será conservada en una cámara frigorífica, incluso durante semanas, y sellada con Parafilm de forma que no se contamine cuando no sea usada.

Esta disolución la utilizaremos para disolver analitos (ácidos tartárico, málico gálico, para el catecol, y glucosa oxidasa), de forma que aportamos al medio un pH neutro, lo cual es una característica esencial a la hora de medir con enzimas, ya que estas han de trabajar en un pH neutro.

3.2.2. Cloruro de Potasio

La disolución de KCl que vamos a utilizar en este proyecto será 0.1 M y pH 5 aproximadamente. Se preparará a base de KCl obtenido de los laboratorios SIGMA-ALDRICH disolviéndolo en agua des-ionizada. Las disoluciones realizadas serán en grandes cantidades y serán cerradas y selladas al igual que el Buffer fosfato y conservadas en una cámara frigorífica.

3.2.3. Glutaraldehido

El Glutaraldehido es un compuesto químico de la familia de los aldehídos. Ha sido usado como elemento entrecruzador de las cadenas proteicas de las enzimas, gracias a los vapores que a temperatura ambiente este compuesto expulsa. Se ha utilizado Glutaraldehido al 25% en agua, de los laboratorios SIGMA-ALDRICH. Su fórmula molecular es $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ y una masa molecular de 100 g/mol.

Se han tomado las precauciones de sellar correctamente la disolución utilizada con Parafilm y posteriormente papel de aluminio, para conservarlo congelado hasta su siguiente uso.

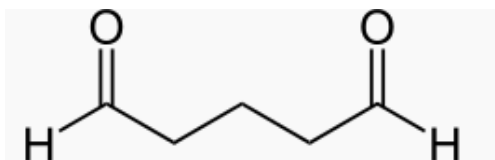


Imagen 23. Estructura molecular del Glutaraldehído

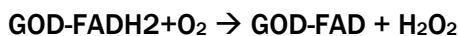
Así mismo, y debido a que ha de ser conservado en el congelador para evitar el desprendimiento de los gases utilizados en el entrecruzamiento de las cadenas, el Glutaraldehído ha de sacarse aproximadamente 15 minutos antes de ser utilizado para que este se descongele. Se colocará en la campana de seguridad durante este proceso y en caso de que no haya dado tiempo a que se descongele en su totalidad antes de ser utilizado, ha de situarse debajo del grifo con agua templada durante unos segundos para poder utilizarlo correctamente.

3.2.4. Glucosa Oxidasa

La glucosa Oxidasa (GOD) es una glycoproteína de estructura rígida con un peso molecular de 152 000 - 186 000 Da. Y consiste en dos cadenas idénticas de polipéptidos, cada cual contiene una adenina dinucleótido de flavina centro de redox, los cuales están profundamente incrustados en la apoenzima. Como resultado, incluso si la enzima se acerca a la superficie del electrodo, la distancia entre el centro de esta adenina dinucleótido de flavina (FAD), y la superficie del electrodo sobrepasa la distancia a través de la cual los electrones son transferidos en una tasa medible, de forma que la transferencia directa del electrodo desde la enzima hacia el electrodo no puede ser observada.

La forma de lanzar los electrones entre los centros redox de la glucosa oxidasa y el electrodo es habitualmente mediante la aplicación de mediadores electrónicos de transferencia creando así la segunda generación de biosensores [26].

Experimentos más avanzados demuestran que el montaje de la glucosa oxidasa retiene su actividad catalítica. En presencia de oxígeno, la enzima reducida es oxidada muy deprisa en la superficie el electrodo de la forma:



La regeneración catalítica de la enzima en su estado de oxidación causa la pérdida de reversibilidad y el crecimiento del pico de reducción. En consecuencia, la adición

de glucosa modera la reacción electrocatalítica conduciendo a la disminución de la corriente de reducción. Esta disminución de la corriente de reducción ha sido empleada para determinar la concentración de la glucosa y probar la actividad enzimática de la glucosa oxidasa [33].

En concreto el tipo de Glucosa oxidasa que se va a utilizar en este proyecto será α -D-glucosa de SIGMA-ALDRICH

Compuesto de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ con masa molecular de 180 g/mol y densidad de 1.54 gr/cm³.

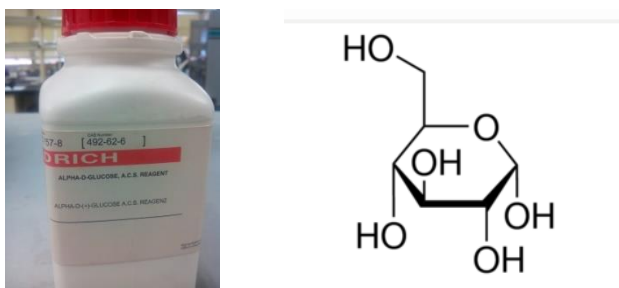


Imagen 24. Compuesto de la GOX utilizada en el proyecto (izquierda), estructura molecular de la Glucosa Oxidasa (derecha)

3.2.5.Catecol

El Catecol será uno de los reactivos que se van a utilizar en este proyecto a la hora de la obtención de disoluciones para análisis de analitos con los sensores desarrollados en el proceso experimental.

El Catecol recibe otros nombres como 1,2-dihidroxidobenceno o pirocatecol, posee una fórmula estructural $C_6H_6O_2$, un peso molecular de 110.1 g/mol y densidad de 1.34 g/cm³. El reactivo utilizado en la experimentación ha sido obtenido en los laboratorios PANREAC SINTESIS.

El aspecto comercial son cristales de plumas blancas, con facilidad de disolución en agua.

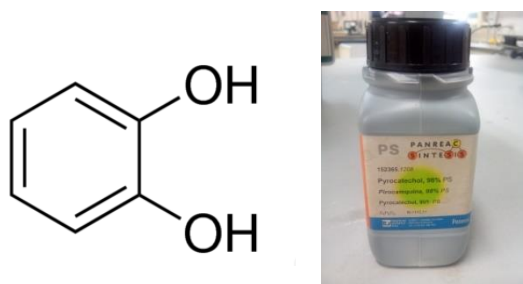


Imagen 25. Estructura molecular del Catecol (izquierda), compuesto químico Catecol utilizado en el proyecto (derecha)

Para el Catecol se ha utilizado Buffer Fosfato como disolvente. Ha de tenerse en cuenta que la disolución ha de utilizarse en el momento en el que se realizó, y esto es por la rapidez con que se oxida el Catecol. En el momento en el que no se esté utilizando, es necesario taponar el matraz en el que esté preparada con papel de aluminio y ponerla en el frigorífico.

3.2.6. Ácido tartárico

Utilizaremos como analito ácido tartárico o también conocido como 2,3-dihidroxibutanodioico, es un compuesto orgánico polifuncional cuyo grupo principal es el carboxilo, su fórmula molecular es $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, tiene un peso molecular de 150 g/mol y una densidad de 1.79 kg/m^3 obtenido de SIGMA-ALDRICH

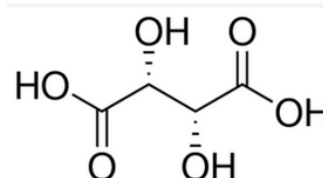
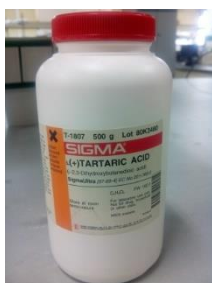


Imagen 26. Compuesto Químico del Ácido tartárico utilizado en el proyecto (izquierda), estructura química del Ácido tartárico (derecha)

3.2.7. Ácido Gálico

Al igual que el ácido Tartárico, el Gálico es un ácido orgánico, conocido también como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, y se encuentra formando parte de los taninos. Su fórmula molecular es $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ con un peso molecular de 170 gr/mol y densidad de 1.694 kg/m^3 . En este proyecto se ha utilizado el producto procedente de SIGMA-ALDRICH

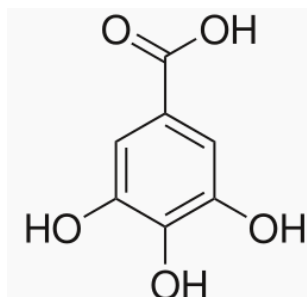


Imagen 27. Compuesto del Ácido Gálico utilizado (izquierda), estructura química del Ácido Gálico (derecha)

3.2.8. Ácido Vanílico

El ácido Vanílico es conocido también como 4-hidroxí-3-metoxibenzoico, perteneciente al grupo de los ácidos dihidroxibenzoicos, dentro de los fenoles naturales que se encuentran en alimentos. Su fórmula molecular es $C_8H_8O_4$ con peso molecular de 168 g/mol. Se ha adquirido en SIGMA-ALDRICH.

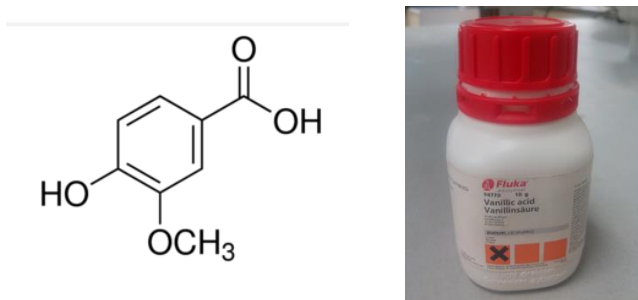


Imagen 28. Estructura química del Ácido Vanílico (izquierda) y compuesto químico utilizado (derecha)

3.2.9. Ácido Málico

El ácido Málico es uno de los ácidos más abundantes de la naturaleza, y es también conocido como 2- hidroxibutanodioico cuya fórmula molecular es $C_4H_6O_5$ y su peso molecular es 134 g/mol y una densidad de 1.609 gr/cm³. El producto utilizado ha sido adquirido en SIGMA-ALDRICH.

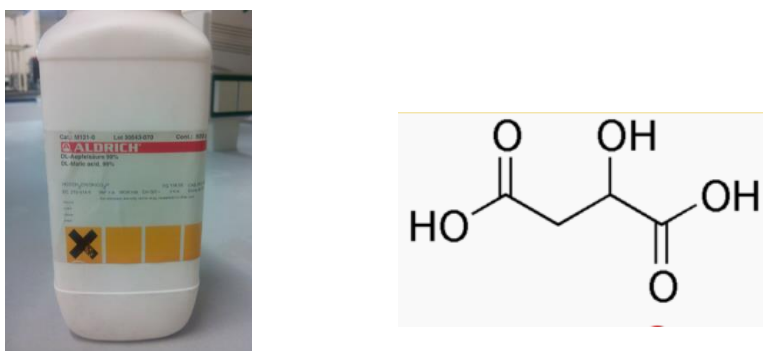


Imagen 29. Compuesto químico utilizado para el Ácido Málico (izquierda) y estructura química del Ácido Málico (derecha)

3.2.10. Pirogalol

El Pirogalol es un fenol y es conocido también como 1,2,3 - benzenotriol su fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ con masa molecular de 126 g/mol y una densidad de 1.45 gr/cm³.

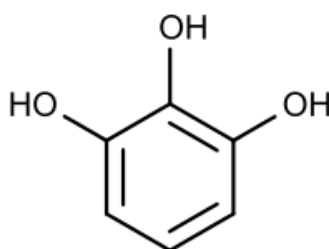


Imagen 30. Estructura química del Pirogalol

3.2.11. Tirosinasa

La Tirosinasa también conocida como monofenol monooxigenasa, es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles y es muy extendida en plantas y animales.

Esta enzima lleva a cabo la oxidación de fenoles como la Tirosina y Catecol, compuesto principal en la investigación usando dioxígeno. En presencia de Catecol, los hidrógenos extraídos de este se combinan con el oxígeno para formar agua y benzoquinona tal y como aparece a continuación en la *imagen 31*.

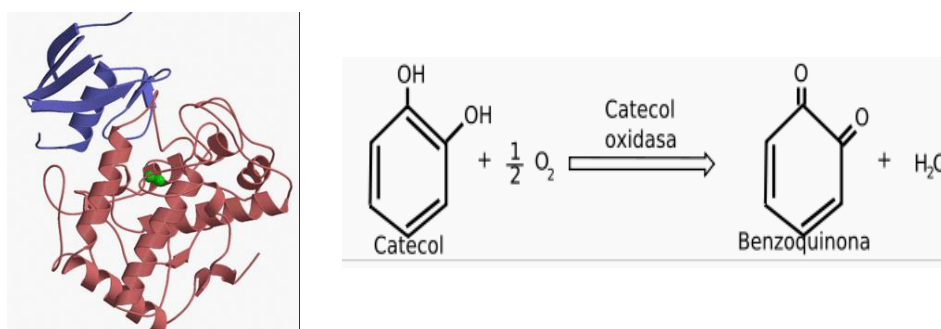
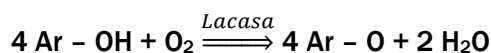


Imagen 31. Estructura de la Enzima Tirosinasa (izquierda) y reacción de oxidación del Catecol gracias a la enzima Tirosinasa (derecha)

3.2.12. Lacasa

Es una enzima perteneciente al grupo de las oxidasas de cobre azul. Catalizan la oxidación de un substrato orgánico o inorgánico y la reducción de oxígeno molecular a agua, por medio de un mecanismo de transferencia de un electrón tan y como aparece a continuación:



En resumen cualquier substrato con características similares al p-difenol puede ser oxidado por la Lacasa, aunque esta enzima también puede oxidar substratos como complejos metálicos orgánicos o inorgánicos como ferrocianidas, anilinas, benzioles, y otros compuestos biológicos cuyos potenciales redox son menores a 1V.

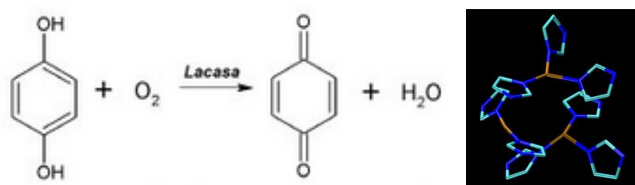


Imagen 32. Mecanismo de reacción de la Lacasa frente a los fenoles (izquierda) y sitio trinuclear presente en las lacasa, cada centro de cobre está enlazado al imidazol, cadena lateral de la histidina, Cobre en color café y nitrógeno en azul (derecha)

3.3. Procedimiento fabricación sensores

Durante el desarrollo del trabajo se desarrollaron los sensores y biosensores necesarios para realizar las pruebas experimentales en el laboratorio. Para la fabricación de los electrodos se utilizó un procedimiento procedente del grupo de investigación de sensores de la Universidad de Valladolid.

El procedimiento tiene en cuenta la creación del soporte material en el que irá alojado el electrodo de pasta de carbono, y el desarrollo del propio electrodo a base de una pasta de carbono modificada con nanopartículas de TiO₂.

3.3.1. Materiales utilizados

Los materiales que han sido necesarios para fabricar los electrodos han sido los siguientes:

- Grafito Ultracarbon F purity
- Chuchara - Espátula

- Vidrios de reloj
- Pipeta Pasteur
- Agente conglomerante (aceite mineral Nujol)
- Nanopartículas modificadoras (TiO_2)
- Balanza analítica de precisión
- Soporte: jeringuilla PVC 1ml (Cod. 07642157 1ml BD Suministros Jimeno)
- 20 cm de cable Cu/Sn de 1.5 mm de diámetro
- Tijeras, cúter y pinzas
- Clips
- Mechero
- Papel de plata
- Papel de laboratorio

Todo el material de laboratorio que será necesario usar durante la creación de los electrodos ha de estar escrupulosamente limpio, para ello utilizaremos jabón neutro y agua, aclararemos con agua destilada y des-ionizada y se dejará secar en papel de laboratorio hasta que no queden restos de agua.

3.3.2. Preparación de la pasta

Dado que los sensores que se han fabricado son una modificación de los electrodos de pasta de carbono, introduciremos un material metálico con un gran efecto catalizador para aumentar las prestaciones de los sensores, en nuestro caso serán nanopartículas de Titanio o también de TiO_2 , y por último el tercer elemento de la pasta será un aceite orgánico, en este caso utilizaremos Nujol, y desarrollará el trabajo de agente conglomerante.

Las cantidades a utilizar serán tales que obtengamos una cantidad de pasta final de entre 0.30 y 0.40 g.

Las cantidades de cada material a utilizar ha de intentarse que sean siempre las mismas, orientativamente las cantidades a usar serán las descritas a continuación, pero habrá que añadirse más Nujol o menos dependiendo de la consistencia de la pasta.

La cantidad de Nujol que se añada a la pasta es una de las características claves a la hora de trabajar la mezcla hasta que esté lista para poder ser introducida en el soporte material y formar el electrodo. De ello depende la consistencia de la pasta y por consiguiente la calidad de la matriz de nanopartículas del electrodo.

De la pasta final, 0.2 g, serán los elementos con nanopartículas sólidos, es decir, sin contar con el Nujol, y la adición de este será lo que conseguirá que llegue la mezcla hasta el peso total descrito en el párrafo anterior.

Las proporciones utilizadas en concreto serán las empleadas por Constantin Pretei en la creación de electrodos de pasta de carbono son:

- Carbono: 17g
- TiO₂: 0.03 g
- Nujol: 0.15g

El pesado de los componentes se ha realizado en una balanza analítica de precisión como la que aparece en la imagen a continuación



Imagen 33. Balanza analítica de precisión utilizada en la experimentación

El proceso comienza utilizando un vidrio de reloj para pesar los componentes de la pasta y se utilizará una balanza eléctrica. Colocaremos el vidrio de reloj en la balanza y anotaremos su peso. A continuación, sumaremos la cantidad correspondiente de pasta de carbono, 17g.

El siguiente paso, sin mover el vidrio de reloj de la balanza, es pesar la cantidad de 0.03g de nanopartículas de Titano o TiO₂ y por último añadiremos el agente conglomerante, Nujol, 0.15g.

Esta última adición será realizada con una Pipeta Pasteur limpia, y se hará en el borde del plato de vidrio gota a gota para que en caso de ser necesario retirar aceite mineral, sea de manera limpia, sin retirar nanopartículas de la mezcla.

Debido a que el agente conglomerante utilizado no es conductor su pesada ha de ser hecha con precisión y no añadir más Nujol del necesario para conseguir una pasta con la consistencia y peso necesario.

El siguiente paso de la fabricación de los sensores, es la homogenización de la pasta, hasta obtener una mezcla totalmente homogénea, oscura y brillante.

Con una espátula de acero se acerca despacio la mezcla de grafito/dióxido de Titanio al Nujol y se va mojando el polvo. Seguidamente ha de homogeneizarse al máximo esta mezcla, para lo cual se trabajará durante 45 minutos.

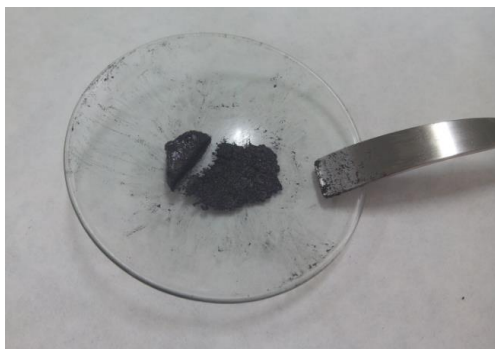


Imagen 34. Proceso de homogenización de la pasta de nanopartículas para la creación del electrodo

En primer lugar se extiende la pasta en el centro del vidrio de reloj y con la espátula colocada de forma plana, se van separando pequeñas proporciones desde el centro de forma radial y luego se junta toda la pasta en el centro y se vuelve a empezar. Transcurridos los 45 minutos de trabajo continuado, la pasta tiene que quedar fina y brillante.

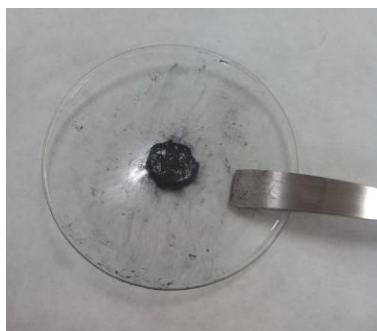


Imagen 35. Apariencia de la pasta de nanopartículas después del proceso de trabajo de 45 minutos

La pasta se guarda protegida de la luz (debajo de un folio) y se deja reposar 4-5 horas.



Imagen 36. Diferencia de aspectos entre la pasta de nanopartículas de Carbono y la modificada con nanopartículas de TiO_2

3.3.3. Fabricación de los electrodos

La jeringuilla de PVC sirve de soporte para el electrodo sólido. Esta consta de tres piezas: el émbolo que tiene 4 ranuras, una caperuza negra de plástico en la que se inserta el émbolo y el cilindro externo que termina en un estrechamiento destinado a la inserción de la aguja y que en nuestro caso rellenaremos con la pasta sólida.



Imagen 37. Jeringuilla de PVC que se utiliza en la fabricación de sensores (izquierda), elementos constituyentes de la jeringuilla (derecha)

Previo a la carga de la pasta sólida en la punta de la jeringa tenemos que insertar un hilo de Cu/Sn que posibilite el paso de corriente de la matriz electródica al potenciostato.

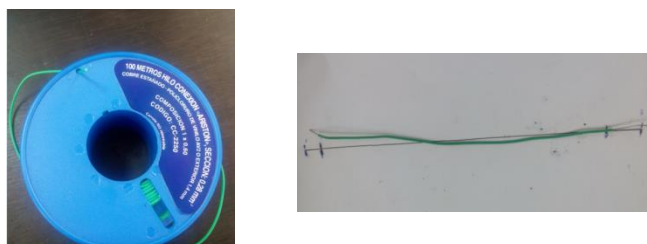


Imagen 38. Cable de Cobre utilizado en la creación de sensores (izquierda), forma del cable que utilizaremos para montar el soporte eléctrico con los extremos pelados (derecha)

El cable de cobre, que es necesario para realizar el circuito por el que pase la corriente eléctrica, es de 20 cm de cable Cu/Sn de 1.5 mm de diámetro. De esos 20 cm que se cortan habrá que eliminar el aislamiento de plástico, por una orilla se pelarán 2cm y por el otro tan solo 1 cm.

El extremo de 2cm será la conexión al potenciostato mediante una pinza, y el extremo más corto será el que esté en contacto con la matriz electródica, pasta de nanopartículas.

Antes de crear el soporte sólido del sensor es necesario dar tres pasos para adecuar todos los materiales, este proceso se describe a continuación:

- a) Extracción de la caperuza negra de la jeringa y agujero de la misma: Se hace un agujero en el centro, utilizando la punta de un clip quemado a la llama que sujetamos con unas pinzas o alicates pequeños.

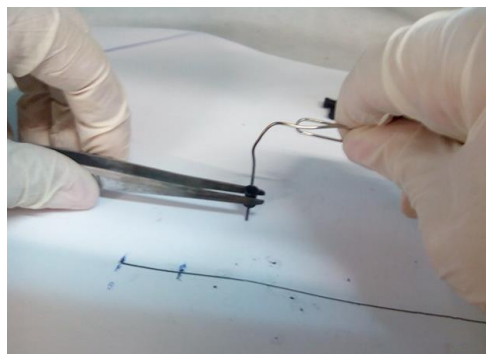
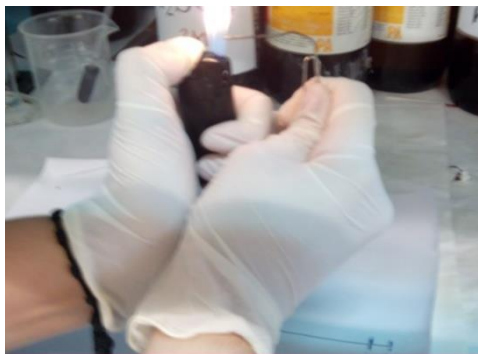


Imagen 39. Proceso de quema y perforación de la caperuza en la que se localiza el cable de Cobre

- b) Es preciso limpiar la caperuza tras quemarla para eliminar cualquier residuo. El proceso de limpieza se realiza con un clip húmedo y papel de laboratorio, se introducirá el clip húmedo varias veces en el orificio hasta que al extraerlo no haya restos de suciedad. El agujero debe de ser suficientemente grande para que quepa bien el hilo de Cu/Sn y el extremo del émbolo que se insertará en dicha caperuza.



Imagen 40. Limpieza de la caperuza negra de la jeringuilla

- c) Con un clip incandescente o con un cúter se corta la parte final del émbolo, siguiendo una de las ranuras originales de dicho émbolo y continuando hasta el final de la bolita situada en el extremo (con cuidado de no romper la conexión de la bolita con el resto del émbolo). Con esto obtenemos un conducto continuado a lo largo del mismo. Este conducto servirá para situar el cable conector del electrodo.

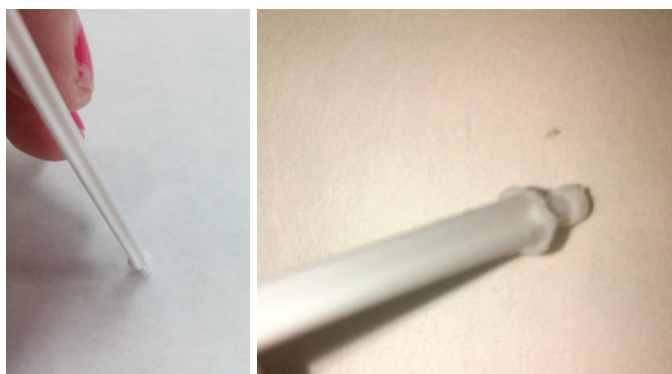


Imagen 41. Modificación del émbolo de la jeringuilla para la colocación posterior del cable de Cobre

- d) Fijar el cable en el conducto fabricado e introducir el émbolo con el hilo dentro de la caperuza negra. El conjunto se inserta en el cilindro exterior de la jeringa para lo que hay que ejercer un poco de fuerza. El final del cable debe quedar a aproximadamente 2 mm del borde de la jeringa y se tiene que procurar que quede recto, podemos ayudarnos con el extremo de un clip. Este tercer paso conviene hacerlo con guantes para evitar ensuciar el soporte. Alrededor de la parte superior del émbolo se enrolla el otro extremo del cable.

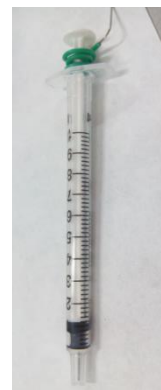
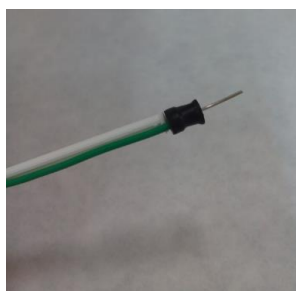


Imagen 42. Preparación del soporte material del electrodo, proceso de montaje de izquierda a derecha

Una vez ha transcurrido el tiempo de reposo de la pasta de 4-5 h se puede comenzar a rellenar los electrodos. Antes de cargar la punta de la jeringa con la pasta sólida, debemos mezclar un poco la pasta. A continuación, se extiende sobre la parte central del vidrio de reloj.

Cogemos la jeringa, cuya punta queremos cargar, con una cierta inclinación, unos 45° y la arrastramos delicadamente desde el extremo de la pasta hasta el centro,

donde la colocamos perpendicular y picoteamos. Hacemos este proceso de nuevo y la pasta que queda alrededor del extremo de la jeringa la depositamos poco a poco dentro. Para ello nos ayudamos de una espátula.

Es importante no apretar la pasta hacia dentro del orificio, lo que se deba hacer es desplazar la espátula de forma paralela sobre el agujero varias veces. Todo este proceso hay que hacerlo muchas veces hasta que la punta de la jeringa se vea opaca y con un color negro muy intenso. La jeringa cargada se deja toda la noche reposando en posición horizontal.

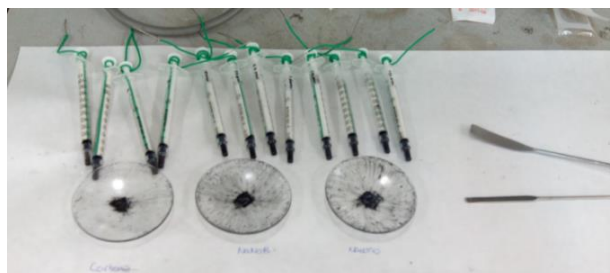


Imagen 43. Resultado final tras el primer relleno de los electrodos

El día siguiente se volverán a rellenar las jeringas, la pasta se extiende sobre la parte central del vidrio de reloj; cogemos la jeringa, cuya punta queremos cargar, con una cierta inclinación, unos 45° y la arrastramos delicadamente desde el extremo de la pasta hasta el centro, donde la colocamos perpendicular y picoteamos. El objetivo es alcanzar una matriz electródica compacta en la que no haya ningún espacio de aire.

Una vez acabemos de rellenar por segunda vez los sensores picoteando al final, limpiaremos la parte exterior de la jeringuilla con un trozo de papel, con cuidado de no tocar la superficie del sensor que contiene la pasta de nanopartículas, en este punto del proceso nuestro electrodo ha de ser como aparece en la *imagen 44*.

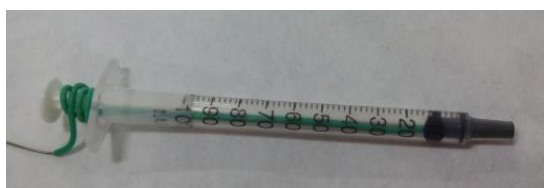


Imagen 44. Resultado final del proceso de fabricación de un electrodo completamente relleno y homogéneo

Uno de los pasos que han de realizarse durante este proceso de fabricación, es identificar los electrodos correctamente, respecto a la pasta de nanopartículas que se ha utilizado en su fabricación. Esto es importante, ya que los electrodos pueden contaminarse fácilmente con otro electrodo de nanopartículas distintas, pudiendo así, modificar los resultados obtenidos. Por tanto los electrodos han de marcarse y

especificar la pasta utilizada. Así mismo hemos de cambiarnos los guantes cuando trabajemos con distintas nanopartículas por el mismo motivo anterior.

Como se puede ver en la *imagen 44* hemos obtenido un electrodo cuya punta está totalmente rellena con pasta de carbono y nanopartículas. También se aprecia la homogeneidad en la matriz electródica, tiene un color negro uniforme, brillante, y no queda ningún orificio de aire.

Este es el aspecto que tiene un electrodo correctamente fabricado. Cualquier deficiencia en su fabricación, es causa de obtener una señal distorsionada o incluso un sensor que no funcione en absoluto. Este dato quedará mejor documentado en apartados siguientes, en los que se mostrarán resultados de electrodos defectuosos, justificando así, la importancia del proceso de fabricación.

Una vez estén limpios los electrodos, se partirá un trozo de papel de unas dimensiones aproximadas de 10x30 cm y se localizará en la superficie de la mesa de laboratorio extendido. Respecto del borde izquierdo se deja un espacio de 10 cm aproximadamente y se coloca el primer sensor teniendo en cuenta que la punta de la jeringa ha de estar fuera del contacto con el papel.

Después de haber colocado la primera jeringuilla cogemos la segunda a continuación lo más pegada que podamos a la primera pero con cuidado de no rozar la zona donde está localizada la pasta de nanopartículas. El siguiente paso es colocar la tercera jeringuilla y por último el trozo de papel que había quedado libre. Se dobla el trozo de 10 cm que se había reservado de tal forma que cubra los tres primeros sensores que se habían colocado y sobre el borde, lo más cerca posible del tercer sensor, se coloca el cuarto de forma que sujete el papel con el que hemos cubierto las tres jeringuillas anteriores.

Una vez se han colocado los cuatro electrodos que se fabricaron de la forma anteriormente descrita, a continuación se hará un paquete con el papel libre que nos ha sobrado. Lo que haremos es enrollar los cuatro electrodos en el papel sobrante, y siempre teniendo cuidado de que no hemos de tocar o manipular la superficie de las jeringuillas.



Imagen 45. Envoltorio de los electrodos en papel de laboratorio para colgarlos en posición vertical

A continuación se coge un trozo de papel de aluminio de unas dimensiones suficientes como para cubrir el paquete de papel que se ha preparado anteriormente.



Imagen 46. Proceso de reposo de los electrodos en posición vertical mediante paquetes de papel de aluminio.

Se colocan los sensores envueltos en papel colgados en posición vertical de unas pinzas de laboratorio sujetándolos para que no puedan descolgarse o caerse. Una vez estén bien sujetos, se utilizará el papel de aluminio que habíamos preparado antes, lo colocaremos tapando el paquete de sensores de forma que los sensores están ocultos de la luz, y se mantendrán en esa posición durante veinticuatro horas.

Se descolgarán los sensores al día siguiente y ya como últimas directrices, cabe decir que antes de la utilización del electrodo, la superficie activa de este ha de ser suavizada y homogenizada sobre un papel de filtro limpio.

Se recomiendan movimientos espirales sobre el papel, imponiendo una ligera presión con el émbolo. Tras el uso de los electrodos, éstos pueden ser renovados por eliminación y nuevo suavizado de su capa superficial.

Este proceso lleva consigo un factor muy a tener en cuenta, la matriz debe de ser compacta por lo que al ir retirando finas capas de pasta se quedarán espacios huecos por lo que este proceso marcará la vida del electrodo.

3.4. Procedimiento fabricación biosensores

3.4.1. Materiales utilizados

- Sensores ya fabricados y ciclados en blanco.
- Enzimas

- Glucose oxidase G7141 Type X-S
- Tyrosinase from mushroom T3824-250KU (Lot ≠ SLBB1018U)
- Laccase from Trametes versicolor 53739
- Micropipeta Pluripet.
- Soporte para localizar los electrodos en vertical durante el proceso de modificación de los sensores
- Tapa para el vaso de precipitados donde localizaremos el Glutaraldehido
- Glutaraldehido
- Vasos de precipitados
- Caja de cartón
- Papel de aluminio

Para la fabricación de los biosensores partiremos del mismo procedimiento experimental de la fabricación de sensores.

Una vez tenemos nuestros electrodos ya preparados para ser utilizados para ensayos, lo primero será ciclar los sensores en nuestro blanco para conocer la señal característica de cada electrodo. Esto lo haremos en una disolución de Buffer fosfato de PH 7 en una concentración de 0,01 M, aunque en alguna ocasión se utilizará un blanco de disolución de KCl 0,1 M.

Después de conocer la señal en blanco de nuestros sensores, se puede proceder a la modificación de estos, utilizando un elemento vivo como son las enzimas para fabricar nuestros biosensores.

El procedimiento elegido entre los que hemos desarrollado en el apartado 2.3.3. es decir, el proceso de *Cross-linking* y será una combinación de dos. Primero para la inmovilización de la enzima utilizaremos primero la técnica de adsorción y después haremos un proceso de cross-linking o entrecruzamiento.

La elección del material biológico a utilizar dependerá del compuesto que queramos medir principalmente, no obstante en el desarrollo de este proyecto se han utilizado distintas combinaciones con el objetivo de determinar, el método más preciso en la detección de ciertos compuestos, especialmente azúcares.

Así mismo, se ha buscado durante todo su desarrollo, un método no solo correcto, pero, eficiente, para lo que se han desarrollado matices que ayudarán a aumentar la vida del electrodo modificado con material biológico.

A lo largo de este proceso de investigación se han utilizado tres tipos de enzimas:

- Glucose oxidase G7141 Type X-S
- Tyrosinase from mushroom T3824-250KU (Lot ≠ SLBB1018U)
- Laccase from Trametes versicolor 53739

La Glucosa Oxidasa será utilizada para medir azúcares como es la glucosa. Mientras que la Tirosinasa la utilizaremos a la hora de medir antioxidantes como el Catecol; por último la Lacasa la utilizaremos cuando midamos un antioxidante como el pirogalol.



Imagen 47. Enzima Glucosa Oxidasa utilizada en el proyecto

3.4.2.Fabricación de los viales de enzima

Para comenzar la creación de biosensores lo primero es crear los viales de enzima que serán utilizados en el proceso de inmovilización. Antes de explicar el proceso de creación de viales, es conveniente destacar la necesidad de las enzimas de ser conservadas en todo momento congeladas o en hielo de forma que no se desnaturalicen.

Se preparará un recipiente con hielo, preferentemente picado previamente, donde localizaremos los eppendorfs, que ejercerán el papel de viales de las enzimas.

Se cogerá la enzima que se quiera preparar para modificar los sensores, se saca del congelador y se mantiene en el hielo picado mientras se coloca un eppendorf en la balanza de precisión. Se utilizará una espátula fina, esta se habrá quemado a la llama y dejado enfriar en papel de aluminio, ayudándonos de esta, haremos una pesada de 5 mg de enzima.

A continuación se añade 1ml de la disolución de Buffer fosfato que se ha utilizado a lo largo de todo el proyecto y se disolverá la enzima en ella. Este proceso se denomina homogenización y se realizará con el eppendorf sumergido en el hielo. Se necesita una micropipeta y una punta de 1 ml, se coge una medida con la pipeta y la soltaremos de nuevo en el vial, muy despacio, evitando la formación de espuma en el vial. Se repetirá dicho proceso tantas veces como sea preciso hasta que

veamos que la enzima tiene un color amarillento homogéneo y se ha disuelto en su totalidad.

Se cierra el vial y se prepara el resto de eppendorfs en los que se dividirá el material biológico. Se cogerán 50 μ l y se dispondrán en los viales, siempre con ellos en hielo. El aspecto de los eppendorfs terminados ha de ser como el que aparece en la figura siguiente:



Imagen 48. Eppendorf preparado con Enzima Glucosa Oxidasa para ser conservado y utilizado en el futuro en la fabricación de biosensores

Una vez se tengan las muestras preparadas, se colocarán en un vaso de precipitados de 100 ml, se sellará con parafilm y papel de plata, y se guardará en el congelador hasta que tengan que ser usados.

3.4.3. Inmovilización de la enzima en el electrodo

Para el desarrollo de este proyecto se han utilizado dos de los métodos mencionados como combinados. Durante la creación de biosensores, se ha optado por la elección de una adsorción de la enzima en la superficie del transductor, tras la cual se ha realizado un entrecruzamiento de las cadenas, obteniendo así un proceso de cross-linking en el desarrollo de los biosensores.

El proceso de adsorción de la enzima se ha realizado mediante una doble repetición, en la que se han respetado los tiempos de adsorción necesarios en función del transductor y las condiciones ambientales en las que se realizara el procedimiento. El proceso de entrecruzamiento posterior, se ha realizado inmediatamente después de la última adsorción del material biológico.

Se comienza el procedimiento con el procedimiento de adsorción de la enzima al electrodo, para ello lo que haremos será, en un vaso de precipitados se colocan unos 20 ml de Buffer fosfato a temperatura ambiente en las mismas condiciones y concentración que el utilizado como blanco en los ensayos.

En un principio, en la realización del proyecto se utilizó una misma disolución de Buffer fosfato para la adsorción de la enzima en el electrodo, sin discriminar entre las nanopartículas que estos tuvieran.

Como ya ha sido comentado en el proceso de fabricación de sensores, la contaminación de la pasta es uno de los factores que influyen en la respuesta de estos ante un analito, es por ello que, en los últimos pasos de este proyecto, en la creación de biosensores se cambió el procedimiento de adsorción de Buffer fosfato, colocando un vaso de precipitados con una disolución para cada tipo de electrodo, evitando así una posible contaminación.

El siguiente paso es colocar la enzima, la forma de proceder será a partir de los eppendorfs que se han preparado previamente con la enzima, cuyo procedimiento ha sido desarrollado en el apartado anterior.

En este caso se utilizará como ejemplo la preparación de unos electrodos para medición de un azúcar, como es la glucosa, por lo que la enzima que se utiliza es la Glucosa Oxidasa.

Para la colocación de la enzima, primero se mojan los electrodos en PBS (solución de buffer fosfato) durante 2 minutos.

El siguiente paso es colocar los sensores en un útil en el que estos se queden en posición vertical, con la punta hacia arriba para dejar que la enzima se adsorba simplemente al aire como aparece en la *Imagen 49*.

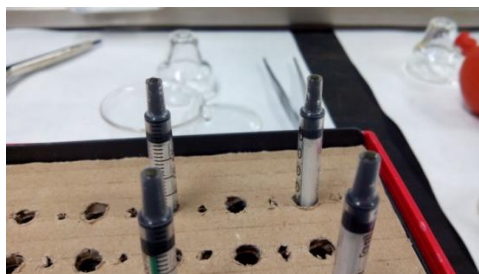


Imagen 49. Posicionamiento de los electrodos para ser modificados con enzimas durante el procedimiento de fabricación de los biosensores

Una vez se tengan los electrodos en la posición deseada, el siguiente paso es preparar la enzima para su colocación en el electrodo. La enzima ha de estar totalmente descongelada antes de ser colocada, por ello se sacará el material biológico del congelador y se moverá el eppendorf entre los dedos, para descongelarla. A continuación con ayuda de una micropipeta como la que aparece en la *imagen 50* y con una punta de 1 ml homogenizaremos la enzima de la misma forma que hicimos cuando preparamos los viales. Realizaremos movimientos verticales con la micropipeta de 200 μ l, cogiendo y soltando la enzima con mucho cuidado de no crear espuma.



Imagen 50. Micropipeta de 200 μ l utilizada para el proceso de modificación de sensores

Una vez la enzima esté totalmente homogeneizada, tal y como aparece en la *imagen 51* se puede depositar en los electrodos con la ayuda de la micropipeta.



Imagen 51. Enzima homogeneizada preparada para ser utilizada en la deposición en los electrodos durante el proceso de adsorción

Hay que comprobar primero que no quede una gota de PBS en la superficie del sensor, de haberla, con la ayuda de un papel de laboratorio con cuidado de no dañar la superficie del electrodo se secará dicha gota.

Se depositará entonces, una gota de 10 μ l de la enzima, en este caso Glucosa Oxidasa, en la superficie del sensor con la pasta de nanopartículas visible.

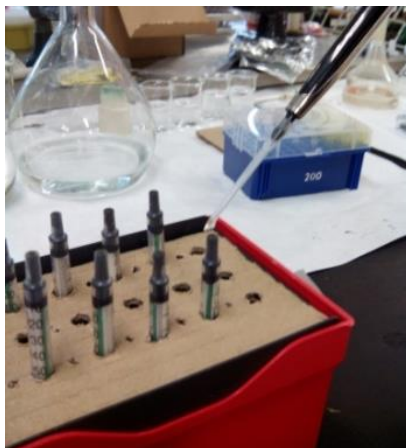


Imagen 52. Localización de la gota de enzima sobre los sensores durante el proceso de adsorción de la enzima

Para la deposición de la gota, se procederá con mucho cuidado, pues no queremos dañar el electrodo, nos aproximamos despacio con la pipeta y dejamos salir la gota de enzima como aparece en la imagen.

Una vez esté cerca de desprenderse de la punta de la micropipeta, nos acercamos al electrodo y dejaremos que la gota de enzima toque la pasta de nanopartículas. Entonces, presionamos del todo la micropipeta para soltar la gota, con precaución de soltar todo el contenido de la alícuota, moviéndola ligeramente hacia los lados para procurar que la enzima queda perfectamente colocada en el centro de la punta del electrodo, tal y como aparece en la *imagen 53*.

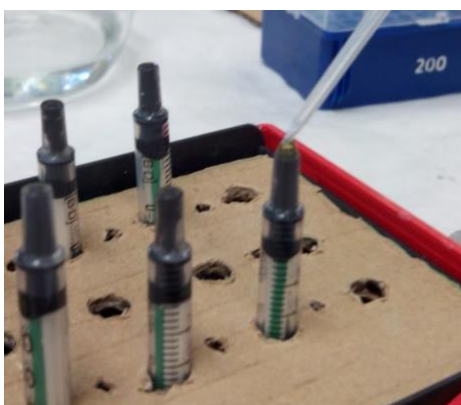


Imagen 53. Detalle de la localización de la gota en la superficie del sensor

El siguiente paso será esperar a que la gota de enzima colocada se seque, teniendo los electrodos al aire a temperatura ambiente.

El proceso de adsorción con secado al aire tarda entre unos 30 y 45 minutos dependiendo de la temperatura ambiente del lugar. El eppendorf con la enzima se dejará en el frigorífico a una temperatura fría para evitar que se desnaturalice la enzima mientras la gota que se localiza en el electrodo se seque.

Una vez la gota se haya secado por completo, se pondrá una segunda gota, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, teniendo en cuenta que esta segunda vez la gota tardará ligeramente más en secarse.

Cuando falten aproximadamente unos 15 minutos para que se seque la segunda gota, sacaremos el Glutaraldehído al 25 % en agua y se dejará en la campana de seguridad para que se descongele siempre cerrado, para que los gases que produce no se escapen, ya que son estos los que producen el efecto de cross-linking entre las cadenas de la enzima. Como precaución de seguridad dejaremos la campana encendida siempre que estemos trabajando con el glutaraldehído.



Imagen 54. Localización del glutaraldehído en la campana de seguridad durante el descongelamiento de este para ser utilizado en el entrecruzamiento de la Enzima

El segundo paso del procedimiento sería el de cross-linking. Para ello se cogen los electrodos y se separan del útil que se ha utilizado durante la adsorción de la enzima, y se colocarán en el vaso de precipitados en el que está el Glutaraldehído descongelándose con la ayuda de una tapa de cartulina con la forma de vaso de precipitados con unos orificios donde irán colocados los sensores.

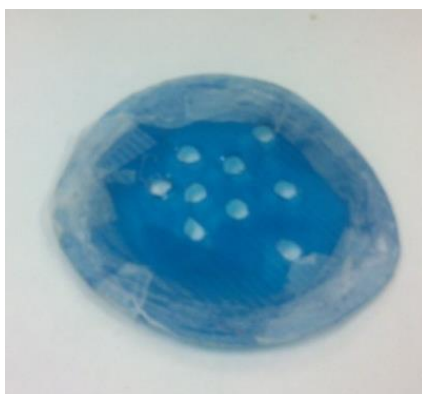


Imagen 55. Elemento auxiliar para tapar el Glutaraldehído y localizar los sensores modificados durante el proceso de Cross-linking

Hemos de conseguir que el cierre del vaso de precipitados y de la cartulina que sujeta los sensores sea lo más hermético posible, esto lo realizaremos con la ayuda de un útil de laboratorio como es el parafilm, dando varias vueltas en la unión para evitar la fuga de los gases que aparecen cuando se descongela el Glutaraldehído.

Se colocarán los electrodos en los orificios de la cartulina de forma que queden con la superficie de pasta de nanopartículas dentro de los gases del Glutaraldehído y se dejarán en posición vertical durante 20 minutos.

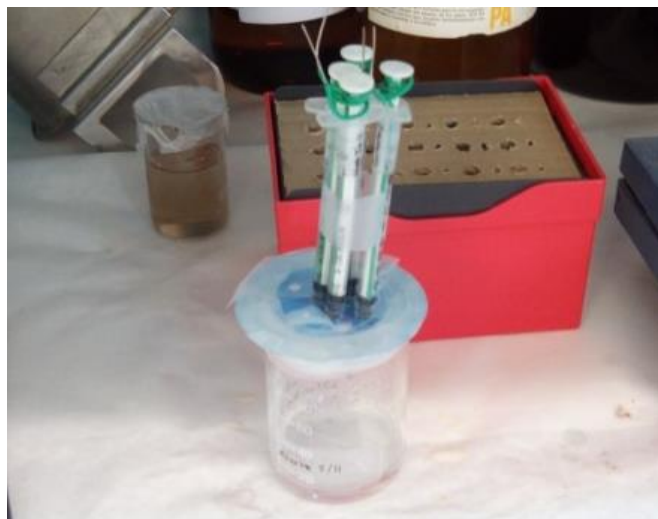


Imagen 56. Proceso de Cross-Linking para los electrodos

Cuando haya transcurrido este tiempo se dejarán secar los electrodos una vez más al aire durante 15 minutos. Y por último se volverán a meter en una disolución de PBS durante 30 segundos.

Para finalizar el proceso de fabricación, se colocan los biosensores en una caja en posición horizontal, se les tapa con papel de aluminio y se cerrará la caja, posteriormente se meterá dicha caja con los biosensores al frigorífico a baja temperatura hasta que sean utilizados.

3.5. Medición de señales y resultados

Para la medición de señales y resultados, de nuestros electrodos durante la experimentación, una vez ya hemos fabricado los sensores y biosensores, necesitaremos material de laboratorio y disoluciones que serán descritas en este apartado.

3.5.1. Materiales utilizados

Para el desarrollo del procedimiento de ensayo se han utilizado los siguientes elementos:

- Matraces de 50,100,200,500, y 1000 mL
- Vasos de precipitados de 5, 25,50, 10 mL
- Espátulas
- Vidrios de reloj

- Eppendorfs
- Probetas
- Pipetas Pasteur
- Parafilm
- Tijeras
- Guantes de latex
- Papel de aluminio
- Mechero
- Micropipeta Ecopipette
- Reactivos
- Electrodo de trabajo
- Contraelectrodo
- Celda Electroquímica de 3 electrodos
- Potenciostato-galvanostato EG&G PARC 273
- Agua des-ionizada Milli-Q (Millipore, Bedford, MA)
- Papel de laboratorio
- Septum

3.5.2. Mediciones electroquímicas

Para realizar las mediciones electroquímicas, primero es necesario crear una celda electroquímica para ello es necesario los siguientes elementos:

- ***Electrodo de trabajo***, en nuestro caso contaremos con los electrodos de pasta de carbono, y los electrodos modificados, además de los biosensores.



Imagen 57. Electrodo de trabajo preparado y listo para utilizarse

- ***Electrodo de referencia***, usaremos un electrodo Ag/AgCl/KCl 3M. Para su utilización es necesario purificarlos mediante el lavado del extremo con agua pura des-ionizada. Una de las características principales que ha de tener este electrodo es que no quede ninguna burbuja de aire dentro de la disolución exterior, de las dos que lo componen, para que la transmisión de la señal sea buena.



Imagen 58. Electrodo de Referencia utilizado en el proyecto ya montado en su totalidad

- **Contraelectrodo**, en el desarrollo del proyecto se ha utilizado un hilo de platino. Al igual que el electrodo de referencia, es necesario purificarlo y limpiarlo, esto se hace quemando el extremo que estará en contacto con la disolución analito y posteriormente se utilizará agua desionizada para limpiar perfectamente el hilo de platino. Se secará para eliminar los últimos restos con papel de laboratorio. Ha de tenerse cuidado de que en ningún momento la pinza que sujeta el hilo de platino entre en contacto con la disolución de analito, de forma que se cree un cortocircuito y no obtengamos una buena lectura.



Imagen 59. Contraelectrodo de Platino utilizado en el desarrollo del proyecto

Es importante que durante los periodos en que los electrodos no se estén utilizando en la celda para realizar análisis, estos estén colocados de forma que no se contaminen ni deterioren, en nuestro caso se utilizan estructuras de sujeción de tubos de ensayo como los que aparecen en la *Imagen 60*.

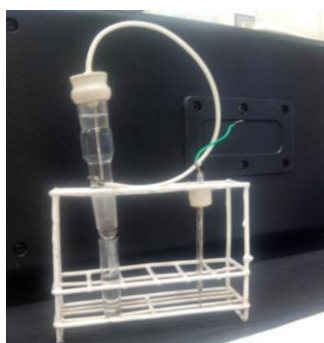


Imagen 60. Rejilla utilizada para el descanso de electrodos

Para localizar la disolución del analito, se utiliza una celda, de dos tamaños, en función de la cantidad que necesitemos para trabajar. Serán como las que aparecen a continuación



Imagen 61. Celda utilizada para el análisis de analitos durante el proyecto, de 25 ml (izquierda) y de 50 ml (derecha)

Todos los elementos los sujetaremos en una útil de sujeción donde se localiza el accesorio que servirá para cerrar nuestra celda y donde se localizan los electrodos de trabajo, de referencia y de contra.



Imagen 62. Accesorio de sujeción de la celda utilizada para el análisis de analitos

Para comenzar el proceso de medida será necesario colocar los electrodos en la configuración de trabajo elegida. Esta configuración ha de conservarse a lo largo de toda la experimentación, ya que influirá en los ciclos de la voltametría, dando lugar a variaciones, de forma que no seríamos capaces de comparar resultados.

Además, todos los orificios que no sean utilizados para localizar electrodos han de ser tapados con septums, de forma que no entre aire dentro de la celda electrolítica durante su uso en una medición. Por esta razón, los electrodos utilizan unos accesorios de goma que se adecuan al orificio de la celda y el diámetro de los electrodos para evitar la entrada de aire.

Por último, la posición de los electrodos ha de ser muy cuidada, no solo en cuanto su localización, pero en la rectitud y la distancia entre electrodos, ya que esto influirá en la forma de la voltametría obtenida. Se pretende que los electrodos estén lo más verticales posibles y de forma que haya equidistancia entre ellos.

La configuración elegida en esta experimentación ha sido la siguiente

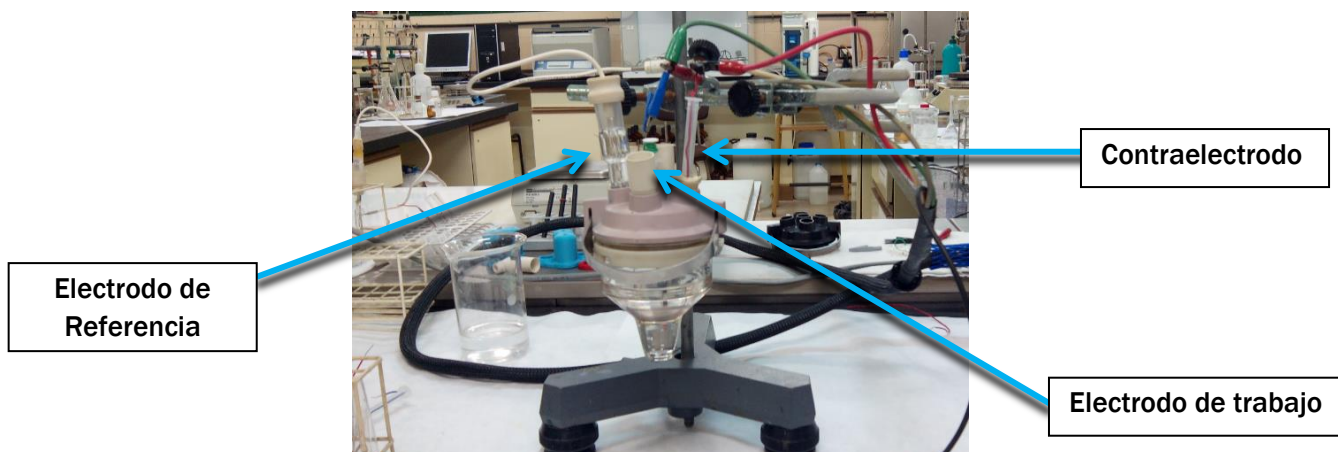


Imagen 63. Configuración de trabajo utilizada en el proyecto

Para establecer el potencial de polarización que es necesario, registrar la densidad de corriente para cada valor de potencial y representar los resultados con ayuda del software elegido, ha sido utilizado el Potenciostato/Galvanostato PARSat 2273.



Imagen 64. Potenciostato/Galvanostato PARSat 2273

El potenciostato/Galvanostato se une a los electrodos mediante cables, la disposición para este *setup* es el siguiente:

- **Cable blanco**, será el que se una al electrodo de referencia
- **Cable rojo**, será el utilizado para unir el contraelectrodo
- **Cable verde**, se utilizará para unir el electrodo de trabajo

Por último, las mediciones se han realizado con ayuda del software Electrochemistry PowerSuite, de Princeton Applied Research. Este ha sido utilizado

para representar y generar gráficas de resultado de los análisis a las que se ha realizado un tratamiento de datos.



Imagen 65. Software Electrochemistry PowerSuite

En ocasiones también se ha utilizado también CorrWare para la realización de los ensayos y su correspondiente visualizador CorrView2

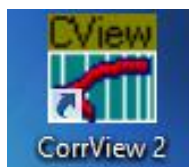


Imagen 66. Software CorrWare / CorrView

En el desarrollo de la investigación, para obtener los analitos utilizados para la caracterización de los electrodos se han utilizado distintas disoluciones.

Para todas ellas se ha utilizado agua destilada y des-ionizada MilliQ MILLIPORE,



Imagen 67. Sistema agua destilada y des-ionizada MilliQ MILLIPORE

Para la medición de las cantidades de reactivos a utilizar en las disoluciones, se utilizará la misma balanza digital analítica que se utilizó en la pesada de las cantidades de nanopartículas a utilizar en la fabricación de los electrodos. La escala de la balanza es de 10^{-4} g.

También se utilizará un dispositivo de ultrasonidos para disolver el soluto en caso de que el disolvente este a una temperatura baja y no se pueda disolver

correctamente el reactivo o en caso de que esté muy concentrado. En esta experimentación se ha utilizado Selecta Ultrasons que aparece a continuación:



Imagen 68. Sistema de ultrasonidos Selecta Ultrasons

CAPÍTULO IV. Resultados

En este apartado se procederá a mostrar los resultados obtenidos en los ensayos realizados durante el proyecto utilizando los sensores y biosensores descritos en el apartado anterior.

Para la realización de las experimentaciones se han utilizado dos softwares, como ya se ha comentado, a la hora de realizar las mediciones los primeros pasos que han de darse son la determinación de los parámetros de ensayo.

Se utilizará como ejemplo el software Electrochemistry PowerSuite, de Princeton Applied Research, siendo el proceso semejante con CorrWare.

Para determinar las características de nuestro ensayo nos hemos de fijar en el electrodo de trabajo que vamos a usar y el analito que queremos medir. En el caso de esta investigación se han utilizado sensores voltamométricos, y es por ello que se utilizarán voltametrías cíclicas a la hora de realizar las mediciones.

Como aparece en la *imagen 69* haremos click en “Experiment → new” para comenzar con nuestro ensayo.

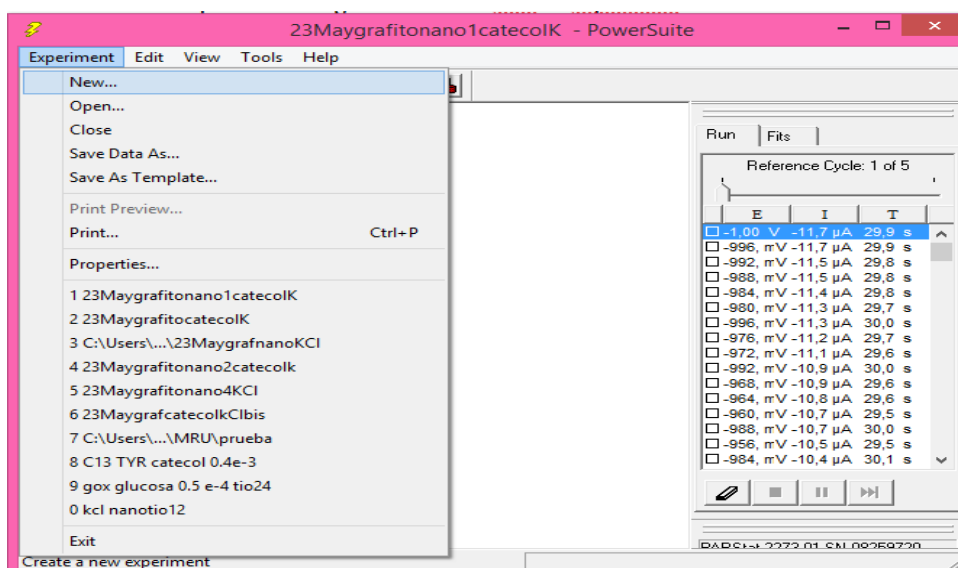


Imagen 69. Selección del nuevo experimento a realizar

A continuación, se elige el tipo de ensayo que queremos realizar, en nuestro proyecto se va a utilizar dentro de PowerCV → Cyclic Voltammetry (Ramp), es decir, un voltamograma cíclico en rampa como vemos en la *imagen 70*.

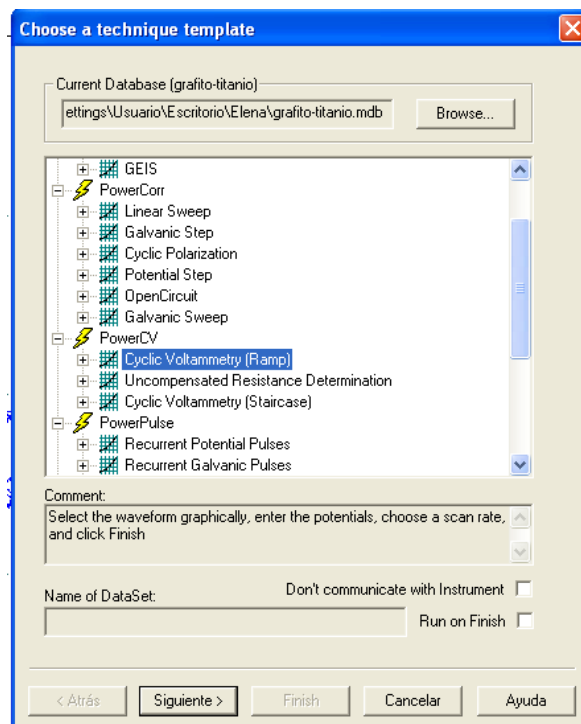


Imagen 70. Elección del template a elegir para la voltametría cíclica

Una vez se ha elegido el proceso electroquímico a usar, será necesario elegir un *template* que ha sido previamente guardado en el programa. En este especificaremos, el potencial inicial y los potenciales extremos. Además tenemos que especificar el electrodo de referencia que estamos usando y el área de nuestro contraelectrodo.

Debido a que la respuesta que obtengamos en el voltamograma depende del analito que estemos ensayando, se han de guardar templates típicos para cada analito, por ejemplo, durante el desarrollo de mi proyecto se crearon templates para el Buffer Fosfato, KCl, antioxidantes, ácidos y glucosa ya que los potenciales de barrido varían en cada caso.

No obstante, la elección de un template no implica la necesidad de utilizar los datos que se hayan grabado en él, durante la configuración del ensayo será posible modificar algún dato, en caso que fuera necesario.

Tras seleccionar el proceso, haremos click en siguiente y la ventana que aparece en el programa, nos pide la definición de la celda electroquímica que vamos a utilizar como se observa en la *imagen 71*.

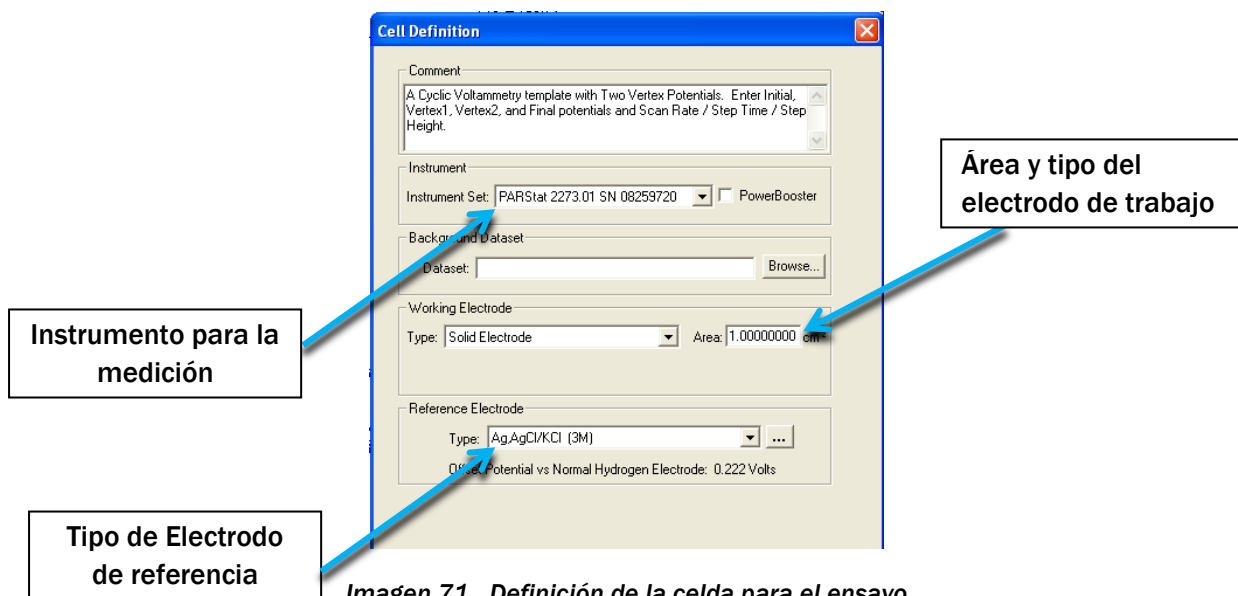


Imagen 71. Definición de la celda para el ensayo

En nuestro caso, se seleccionará el instrumento utilizado para medir, en nuestro caso, PARStat 2273.01 SN 08259720. Así mismo, se seleccionará el tipo de electrodo de trabajo en la lista desplegable pinchando en *Solid Electrode*, ya que trabajamos con un electrodo de pasta sólido, en este mismo apartado especificaremos el área del electrodo que será de 1.00 cm². Por último se determina el Electrodo de referencia que como se ve en la imagen 71 es un electrodo de plata-cloruro de plata.

Se da a Siguiente, y aparecerá una nueva ventana, donde podremos especificar los parámetros de la función de barrido que queremos utilizar, tal y como figura a continuación:

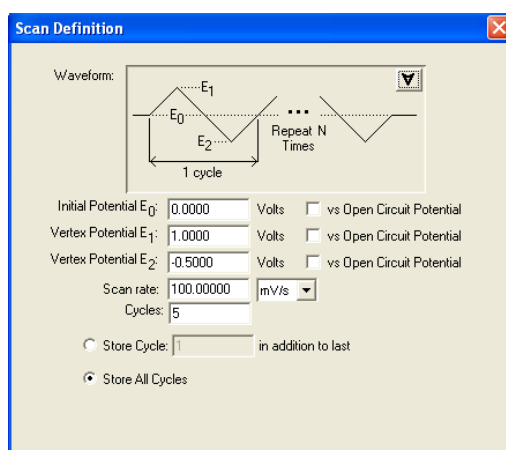


Imagen 72. Determinación de las características de la función de barrido

Dependiendo del analito que se ensaye, esta ventana variará, mientras que las anteriores son iguales para cualquier ensayo. Para definir correctamente la función

de barrido, necesitaremos dar los valores de potencial que definen esta, una velocidad de barrido y el número de ciclos que queremos realizar el barrido.

En el desarrollo de este proyecto se han realizado varias funciones de barrido dependiendo del ensayo que se estuviera realizando. Una de las variables que se han mantenido constantes independientemente del analito ha sido la velocidad de barrido, siendo 100 mV/s en todos los ensayos. En algunas ocasiones, y ante la necesidad de realizar cinéticas químicas, para determinar cómo varía la señal ante la velocidad de barrido, se ha de modificar este dato en estos casos se utilizan velocidades variables desde 10 mV/s hasta 1000 mV/s.

El número de ciclos al inicio de la experimentación se situó en 10, pero debido a los largos tiempos de ensayo y a que la señal se estabilizaba en ciclos anteriores, se decidió bajar el número de ciclos a 5. De esta forma se reduce el tiempo de ensayo pero se consigue estabilizar la señal de tal forma que se pueda observar la señal real del electrodo ante el analito y no una estabilización de la señal. En la *tabla 3* se muestra un resumen de todas las funciones de barrido utilizadas durante la experimentación, en función de la muestra a ensayar.

Analito	Velocidad (mV/s)	Potencial Referencia (V)	Potenciales extremos (V)
Buffer Fosfato	100	0	[-1 ,1]
KCl	100	0	[-1 ,1]
Ácido Tartárico	100	-0.5	[-1 ,1]
Acido Málico	100	-0.5	[-1 ,1]
Ácido Vanílico	100	-0.5	[-1 ,1]
Ácido Gálico	100	-0.5	[-1 ,1]
Catecol	100	0	[-1 ,1]
Pirogalol	100	0	[-0.6 ,1]
Glucosa	100	0	[-0.6 ,1]
Catecol Tyrosinasa	100	0	[-0.5 ,1]
Pirogalol Lacasa	100	0	[-0.6 ,1]
Mosto	100	0	[-1 ,1]

Tabla 3. Resumen de las condiciones de ensayo ara cada analito. Puntos característicos de las funciones de barrido

Se pulsará una vez más al botón de siguiente, y se visualizará la ventana de definición del pre-escaneado. La función de estas variables es estabilizar la tensión de ensayo que se va a utilizar en la medida del voltamograma.

En la experimentación de este proyecto se ha utilizado un tiempo de equilibrado en un potencial de circuito abierto (*Measure Open Circuit Potential as Required*), y el tiempo de equilibrado de potencial inicial elegido ha sido de 5 s.

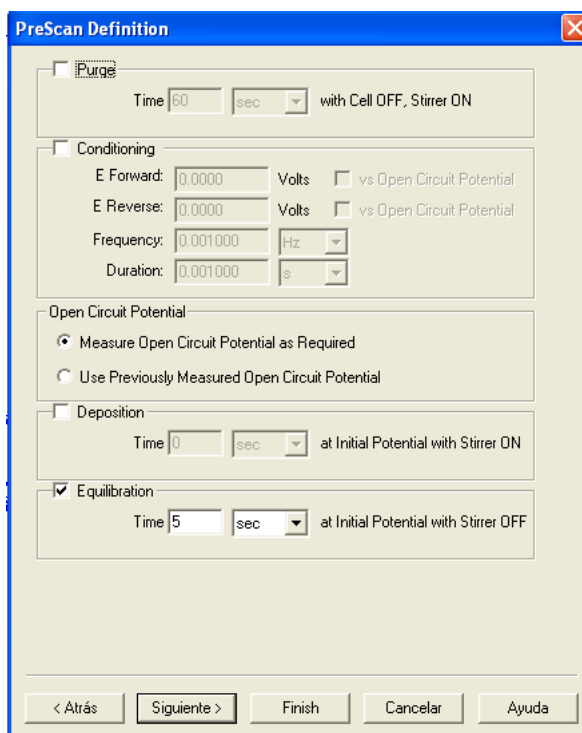


Imagen 73. Determinación de las características de la medida a circuito abierto

Procedemos a dar una vez más a siguiente, y nos aparece una ventana de configuraciones particulares que en esta investigación no ha sido necesario usar, y por tanto no se va a explicar en profundidad en este proyecto.

Una vez se pulse *Finish*, el ensayo comenzará, es por tanto necesario, montar ahora, si no se ha hecho previamente la celda electroquímica con los tres electrodos en su posición, con la configuración de trabajo elegida. En mi caso, se recuerda, que he trabajado con la siguiente configuración:

Electrodo de Referencia → Electrodo de trabajo → Contraelectrodo

Conectaremos los elementos conductores de la tensión e intensidad de corriente, cada color con el electrodo correspondiente, y nos aseguraremos que los electrodos están en contacto con el analito. Otra de las precauciones que se han de tener en este momento es que todos los electrodos estén lo más verticales posibles y

equidistantes, en cada ensayo procuraremos que la posición de estos sea lo más similar posible para poder tener analizar la reproducibilidad de los resultados y poder compararlos. Por último se ha de evitar el contacto de superficies metálicas o cualquier elemento que pueda variar la medida del potencial/intensidad que se obtiene en un voltamograma.

Es entonces, cuando podemos seleccionar acabar, y comenzar el análisis. Tendremos que encender la celda como se señala en la *imagen 74* y daremos a comenzar el ensayo. El voltamograma comenzará a aparecer en la pantalla, y seguirá siempre que la celda esté en el modo *Cell ON*. Cabe la posibilidad que el primer punto del ciclo quede muy fuera de la señal que se estabilizará con el paso de los ciclos, es por ello que habrá de desestimar los puntos iniciales en los que la señal tensión/intensidad aún no se ha estabilizado tal y como se sugiere en la *imagen 74*.

Para hacer eso, con el botón derecho del ratón se clikea y selecciona un área tal que el punto que queremos eliminar quede fuera. Aparece un cuadro de diálogo, en el que hay que seleccionar *Reject selected Point* (desestimar el punto seleccionado), de esta forma ese punto no se tendrá en cuenta por el programa y no nos modificará el voltamograma.

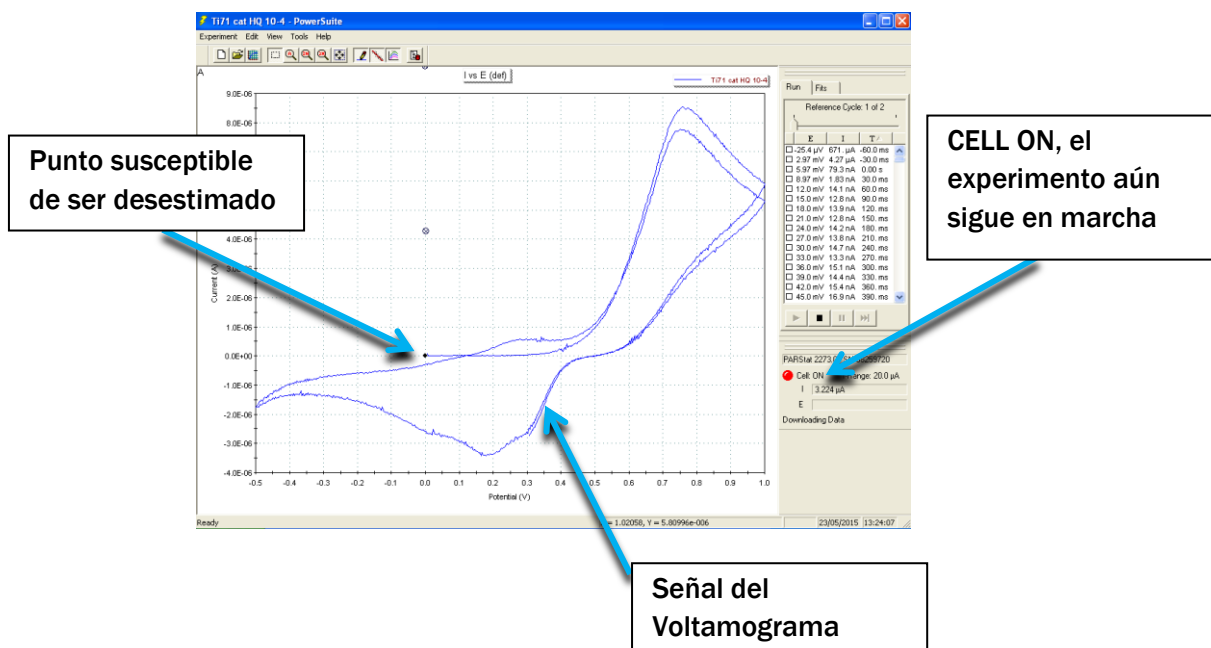


Imagen 74. Ejemplo de Voltamograma obtenido en el software

4.1. Estudio de viabilidad

Antes de comenzar con la exposición de los resultados obtenidos en ensayos realizados durante mis meses de experimentación en el laboratorio, cabe poner de manifiesto, un estudio de viabilidad que acerca de esta temática fue realizado en el grupo de sensores de la Universidad de Valladolid, UvaSens. Gracias al cual he tenido un punto de partida para mi investigación.

Debido a que el principal interés de esta investigación es la detección de antioxidantes, se utilizó el Catecol como analito para discriminar inicialmente entre sensores con y sin nanopartículas con objeto de observar si realmente existía el efecto electrocatalítico deseado proveniente de las partículas de titanio y dióxido de titanio.

Los primeros pasos en esta investigación se dieron modificando los sensores de carbono con nanopartículas de Titanio, metal en suspensión de aceite, que fueron adicionadas a las mezcla de carbono y nujol. Se probaron dichos sensores, ciclándolos en KCl como solución de referencia y en Catecol (10^{-3} M); en ambos analitos, se obtuvieron buenos resultados, con buenas señales mejoradas con respecto a la señal proporcionada por los electrodos sin modificar. A estos sensores se les dio el nombre de NANO. La figura muestra algunos de los resultados que se obtuvieron al utilizar nanopartículas de titanio en el sensor frente a Catecol.

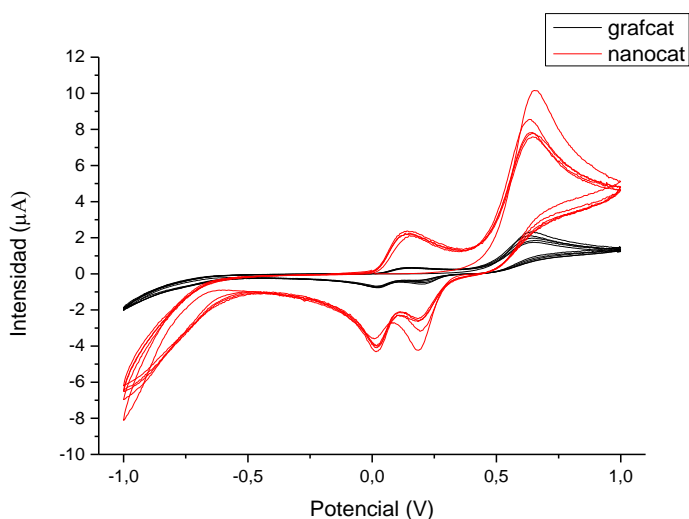


Imagen 75. Respuesta de NANO (negro) y NANOA (rojo) al Catecol 10^{-3} M

En este ensayo se observan dos picos de oxidación y dos de reducción tanto en el electrodo de grafito como en el modificado con nanopartículas de Titanio correspondientes a la oxidación-reducción de Catecol del monómero y del dímero.

Se puede observar como los picos anódicos y los catódicos se dan a intensidades mayores en valor absoluto para el caso de los electrodos modificados con nanopartículas de Titanio que con los electrodos de grafito. Se ve como, especialmente en la reducción, los picos se desplazan ligeramente y por ello la reversibilidad del proceso redox mejora. Por tanto, a priori, podemos decir que la detección de Catecol, con la modificación de los electrodos de carbono con nanopartículas de Titanio, mejora.

El siguiente paso que se dio, fue añadir nanopartículas de TiO_2 a la pasta de carbono, y a continuación un agente conglomerante, en nuestro caso, un aceite orgánico, el Nujol. Esto se hizo pensando en el probable carácter electrocatalítico del dióxido de Titanio, queriéndose comprobar si existía mejoraría en la señal y detección de antioxidantes respecto a los electrodos sin modificar y modificados con nanopartículas de Titanio.

La cantidad que se añadió fue 0.03 g de TiO_2 y el resto hasta el peso final de la pasta fue adicionado en aceite y Carbono.

Uno de los problemas que se encontraron fue la dificultad de mezcla y homogenización de la pasta debido a que las nanopartículas de TiO_2 están en soporte polvo y la mezcla se quedaba muy sólida. Los sensores modificados se testearon en KCl y Catecol como los anteriores obteniendo también unos buenos resultados y con una importante amplificación de la señal correspondiente a los analitos. Estos sensores fueron denominados NANOTIO.

Se puede observar en la *imagen 76* los resultados que se obtuvieron al modificar los electrodos con estas nanopartículas, y la comparación de resultados en una disolución de Catecol en una concentración de 10^{-3} .

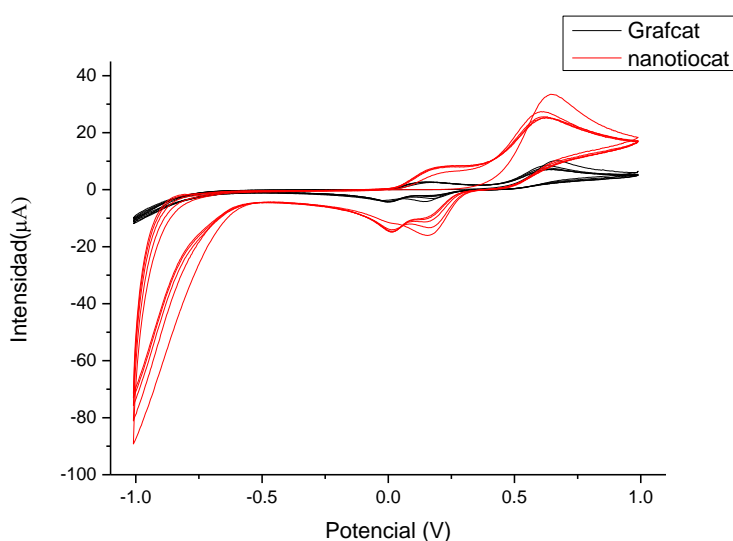


Imagen 76. Comparación de la respuesta de los CPE's (negro) y NANOTIO (rojo) al Catecol en una concentración 10^{-3} M

En la *imagen 76* se ve como la señal del electrodo con partículas de dióxido de Titanio frente a la de un electrodo de pasta de carbono es mucho más intensa. Especialmente se observa como en la oxidación los picos que se obtienen con el electrodo modificado son mucho más intensos y aparecen desplazados hacia la izquierda esto es a potenciales menores. Se observan claramente los dos picos correspondientes al monómero y al dímero.

Si nos fijamos en la reducción, se pueden extrapolar los comentarios en cuanto al incremento de intensidad de la señal, añadiendo la aparición de un segundo pico en torno a 0.2 V que con los electrodos de carbono no se apreciaba prácticamente y que es típico del proceso de dimerización. A medida que ciclamos se observa que disminuye la intensidad de los picos de oxidación y reducción del monómero y aumentan los del dímero, a potenciales menores, que no existen en el primer ciclo.

Además se apreció claramente una mejora en la reversibilidad de proceso. Las señales eran por tanto más intensas y más reversibles incluso que cuando se utilizaba nanopartículas metálicas de Titanio. Por tanto se dedujo como primera hipótesis que el proceso redox era mucho más intenso con la modificación de los electrodos al facilitar las nanopartículas los procesos de intercambio de electrones.

Se puede añadir a mayores que, el pico en reducción que presenta el TiO_2 en potenciales en torno a -1 V, este pico es característico en la descomposición del agua. Como se verá en los resultados de este proyecto, el pico a potenciales negativos en el proceso de reducción, el TiO_2 siempre presentará un pico muy intenso, que será característico en los voltamogramas, este pico aparece en todos los medios, incluso en las soluciones de referencia en KCl y PBS.

A continuación en la siguiente figura se puede comparar la señal que proporcionan los tres electrodos en una disolución con una concentración de 10^{-3} de Catecol:

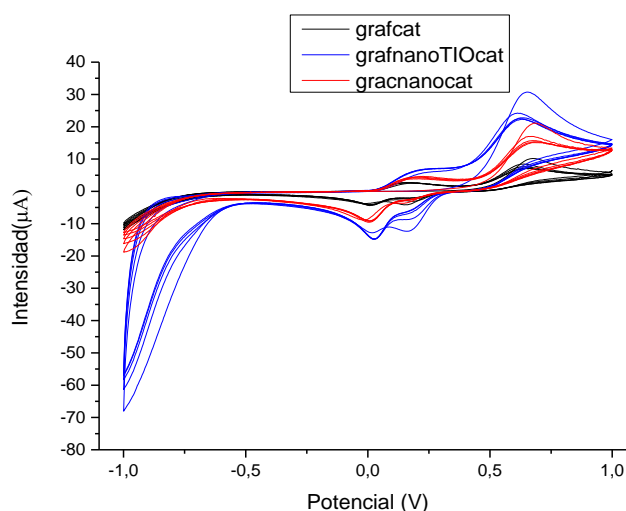


Imagen 77. Respuestas de los CPE's de Carbon (negro) y los modificados NANO (rojo) y NANOTIO (azul) en comparación para un mismo analito, Catecol 10^{-3} M

Se observa como la intensidad de la señal aumenta de forma muy evidente con el uso de los electrodos de pasta de carbono modificados con partículas de Titanio. El voltamograma muestra la forma característica de la descomposición del agua, a potenciales negativos en el caso de la utilización de nanopartículas de óxido de Titanio. Además tanto en la oxidación como en la reducción nos encontramos con picos más próximos y de mayor magnitud. Así mismo, se puede ver como los ciclos se estabilizan enseguida, a parte del primer ciclo en el que la señal solo detecta uno de los picos en la oxidación lógicamente correspondiente al monómero al no existir dímero, el resto de los ciclos son muy similares.

A continuación, en la modificación de sensores se decidió añadir diferentes cantidades de nanopartículas, en los electrodos modificados con Titanio, para intentar ver la relación entre la señal de los electrodos en un analito en función de la concentración de nanopartículas que hubiera en la pasta de carbono del sensor. Los sensores se denominaron NANO A, NANO B, NANO C, en función de la concentración de Ti en la pasta 0.03 g, 0.06 g o 0.09 g respectivamente. Los resultados que se obtuvieron se pueden observar en la *imagen78*.

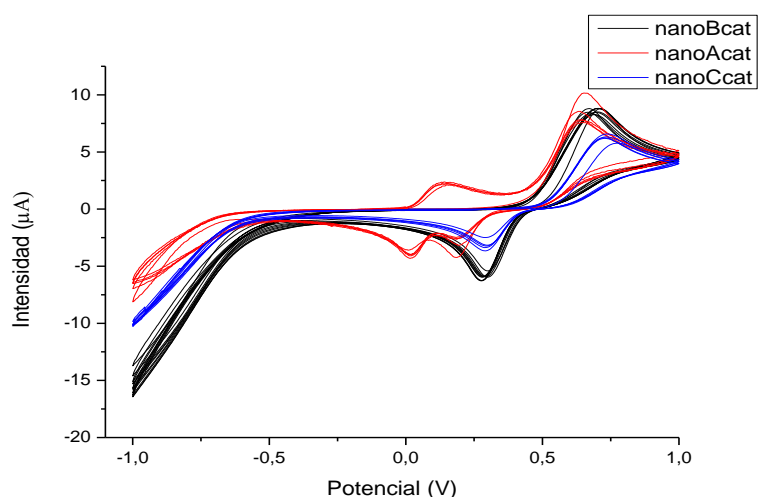


Imagen 78. Comparación de la respuesta al Catecol 10⁻³ M de los electrodos modificados con nanopartículas de Titanio, NANO A (rojo), NANO B (negro), NANO C (azul) al añadir más cantidad de nanopartículas,

Como se observa en el voltamograma los picos de oxidación y reducción del dímero son sólo visibles con electrodos NANO A, es decir los electrodos con una cantidad de 0.03 g de nanopartículas de titanio. Mientras que cuanto más cantidad de nanopartículas añadimos, los picos son menos intensos, esto se puede observar en el voltamograma de los NANO B (0.06 g de Titanio), donde obtenemos un único pico de reducción. Si seguimos aumentando la cantidad de nanopartículas con las que modificamos los electrodos de carbono obtenemos un ciclo con picos menos intensos, como sucede con los NANO C (0.09 g de Titanio).

Por ello podemos concluir que un incremento en la cantidad de nanopartículas no supone una mejora sustancial en la detección de Catecol y por tanto se decide utilizar cantidad constante de 0.03 gramos de nanopartículas que por otra parte es la misma que en los electrodos modificados con dióxido de titanio. En estos últimos fue imposible añadir más cantidad de nanopartículas si se quería que la mezcla tuviera una consistencia adecuada para introducirla en el soporte del electrodo.

Una vez obtenida una línea de investigación con electrodos de carbono, electrodos NANO y NANOTIO, se decidió seguir avanzando y desarrollar biosensores para la detección de azúcares.

El siguiente paso que se dio fue modificar los sensores con enzimas para la fabricación de biosensores, se utilizó Glucosa Oxidasa como enzima. El objetivo que se buscaba era detectar azúcares como la Glucosa. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la *imagen 79*

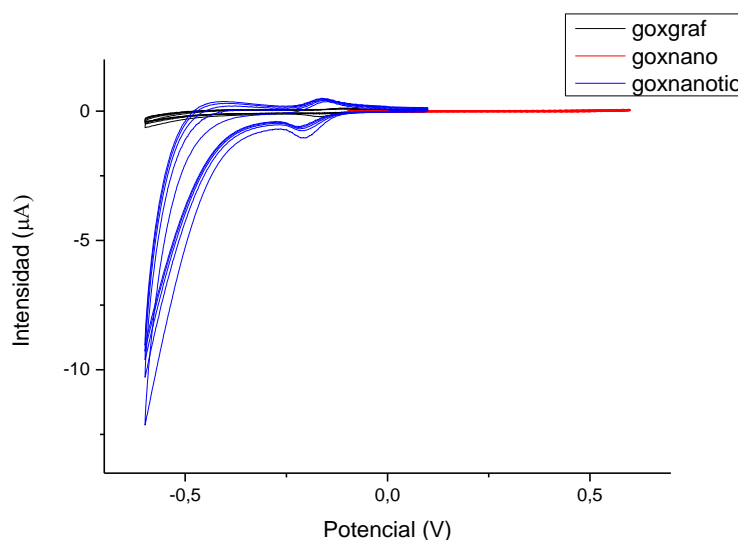


Imagen 79. Comparación de respuesta a la Glucosa en una concentración 20 mM de los biosensores de Carbono (negro), NANO (rojo) y NANOTIO (azul).

Como podemos apreciar en la figura donde se muestra la comparación de estos tres voltamogramas correspondientes a los tres tipos de electrodos, lo más significativo es que sólo en el caso de los electrodos modificados con dióxido de Titanio aparecen picos de oxidación y reducción.

Debido a la gran intensidad del pico característico en los sensores modificados con TiO_2 perdemos la escala para compararlos con los otros dos. Por ello, a continuación se presentan las respuestas de en una nueva escala de forma que podamos comparar los resultados correctamente, además teniendo en cuenta que este proyecto nos hemos centrado en el TiO_2 , será este el que vamos a comparar

con los electrodos de grafito y de esta forma podremos observar el efecto de las nanopartículas.

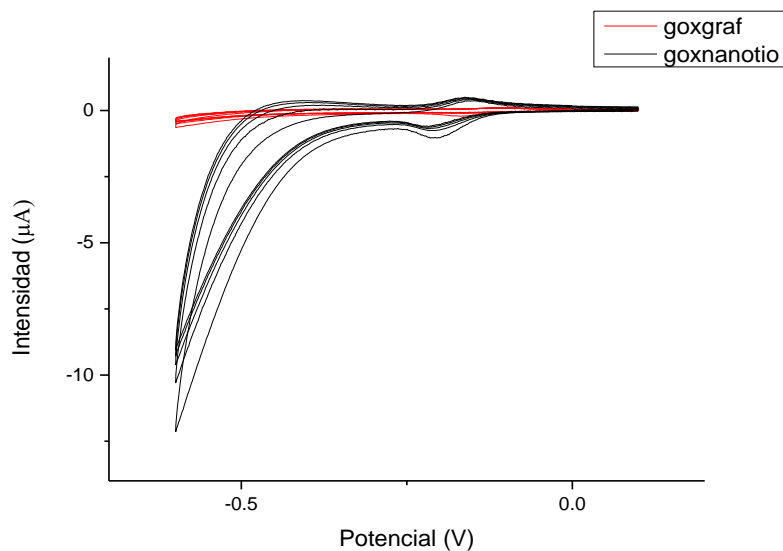


Imagen 80. Comparación de la respuesta de los biosensores de Carbono (rojo) y NANOTIO (negro) a la Glucosa en una concentración 20 mM

Después de estos resultados se probó a comprobar la detección de glucosa utilizando burbujeo de Nitrógeno, de forma que se eliminara el oxígeno del medio, y se comparó a los resultados sin burbujeo. En la *imagen 81* se observan los voltamogramas obtenidos con ambos métodos.

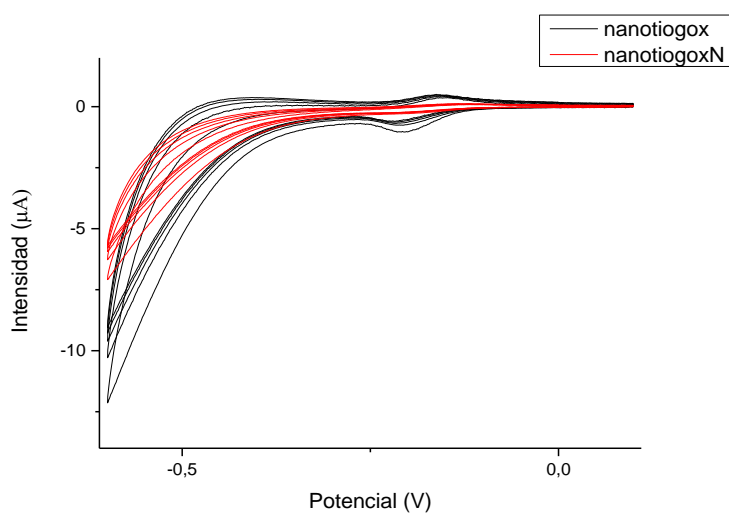


Imagen 81. Comparación de la respuesta de los NANOTIO a la detección de Glucosa 20 mM mediante burbujeo de Nitrógeno (rojo) y sin burbujeo de Nitrógeno (negro)

En los resultados obtenidos se detecta como el ensayo con burbujeo de nitrógeno disminuye como era previsible la señal correspondiente a los picos de oxidación y reducción de glucosa, debido a la eliminación del oxígeno del medio, para poder ver con más detalles los picos de oxidación y reducción a continuación se muestra en la *imagen 82* una zona en detalle.

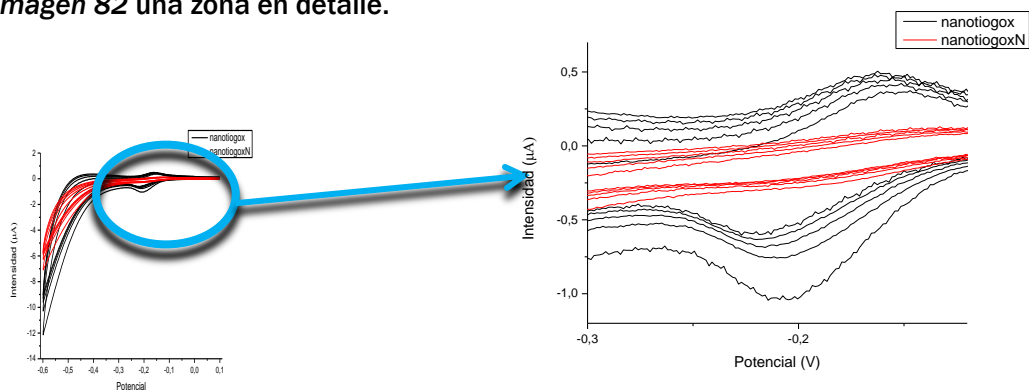


Imagen 82. Detalle de los picos de los voltamogramas de respuesta en la detección de Glucosa en concentración 20 mM con biosensores NANOTIO sin burbujeo de Nitrógeno (negro) y con burbujeo de Nitrógeno (rojo)

Para comprender el comportamiento de estos biosensores se ha de tener en cuenta el esquema de la reacción enzimática y la detección electroquímica mostrados en la *imagen 83*.

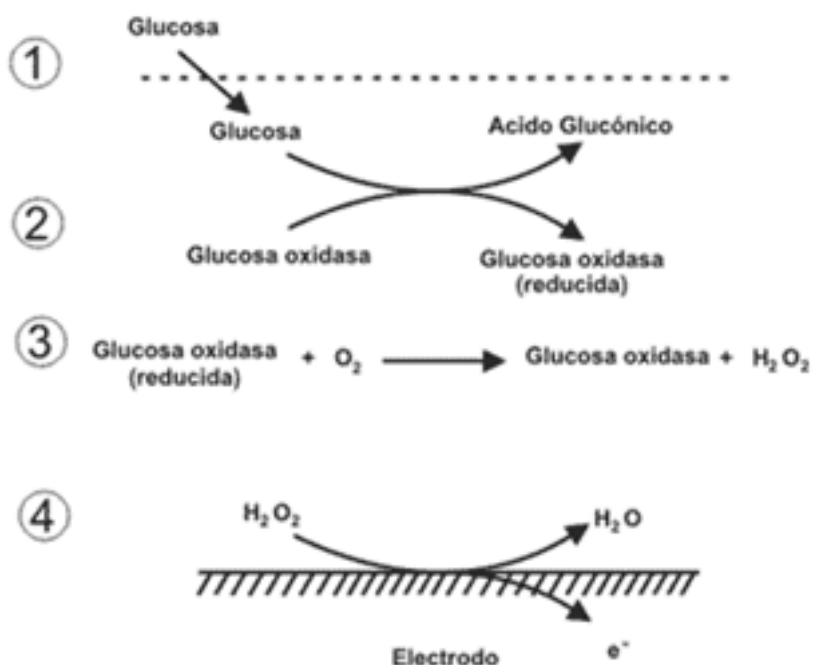


Imagen 83. Esquema de reacción enzimática y detección electroquímica de la Glucosa oxidasa.

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 *imagen 83*. 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. La disminución de intensidad del pico de reducción se puede usar para detectar la glucosa y probar por tanto la actividad enzimática de la glucosa oxidasa.

Por tanto el mecanismo de reacción puesto en juego en la detección de glucosa se basa en la oxidación-reducción del oxígeno y puesto que este disminuye con la desaireación la intensidad de los picos disminuye. Por tanto tenemos una prueba clara de que nuestros sensores modificados eran capaces de detectar glucosa en bajas concentraciones.

4.2. Respuesta electroquímica de los sensores

Los resultados obtenidos en la investigación previa a mi proyecto supusieron un punto de partida para empezar mi experimentación una vez que se había determinado la viabilidad de fabricación de sensores y biosensores modificados con nanopartículas de dióxido de titanio. A continuación se muestran los puntos que se propusieron como objetivos fueron:

- Comprobación de los electrodos utilizados en los antecedentes con varios meses de edad para comprobar su estado y determinar la vida de un electrodo.
- Realización de nuevos electrodos de pasta de carbono, electrodos NANO y NANOTIO.
- Medición con los nuevos electrodos en diferentes analitos, en un principio se determinó el análisis en un ácido como el tartárico, un antioxidante como el Catecol y azúcares como la Glucosa. Con el avance de la investigación en mi proyecto, surgieron nuevos analitos interesantes a la hora de probar los electrodos. A continuación se muestran todos los usados, y no solo los que formaron el punto inicial de la investigación:
 - Ácidos
 - Tartárico
 - Málico
 - Vanílico
 - Gálico

- Antioxidantes
 - Catecol
 - Gálico
 - Vanílico
 - Pirogalol
 - Tirosinasa y Catecol
 - Lacasa y pirtogalol
- Azúcares - Glucosa
 - Gox
- Mosto

Finalmente se realizarán ensayos previos en mostos con objeto de conocer la capacidad de estos electrodos modificados para analizar un medio tan complejo como es el mosto lo que servirá como antecedente para trabajos futuros.

4.2.1. Respuesta ante electrolitos básicos

Como se ha comentado en los apartados anteriores, es necesario conocer la señal que proporciona un electrodo en un electrolito básico o blanco, para poder entender, identificar y comparar las señales que se obtienen al ensayar nuestro electrodo en analitos distintos disueltos en estos electrolitos básicos.

Además estos ensayos de referencia nos sirven como control de calidad del electrodo e igualmente nos permiten conocer si pueden ser recuperados tras los ensayos en otros analitos diversos para otros usos. Esta es una fase importante no solo por estas razones, sino también debido a que en esta fase se pueden encontrar fallos en el electrodo, no solo de trabajo sino también en el de referencia o en el contraelectrodo, así mismo se puede detectar un fallo del equipo de medición.

En el sensor de pasta de carbono, podemos identificar fallos en la fabricación, debido a poros en la matriz de la pasta de carbono, en la interconexión del electrodo con el cable de cobre y otros. Los ciclos en el blanco nos servirán de referencia así mismo para determinar la capacidad de estos de recuperarse después de haber sido utilizados en la medición de un analito al obtener una señal idéntica a la de partida tras una pequeña limpieza en papel de filtro.

El electrolito básico que he utilizado en la investigación ha sido Buffer Fosfato en la gran mayoría de los ensayos, aunque también en algunos ensayos se ha utilizado KCl, por ello se muestran a continuación las respuestas de los electrodos ante un blanco.

Para comenzar, se ha de preparar la disolución de Buffer Fosfato con las cantidades mencionadas en el apartado de 3.2. *Reactivos y disoluciones*. Una de las principales

características de esta disolución es que vamos a obtener 0.01 M y pH7, y ha de asegurarse que es así.

Se han de realizar las pesadas con balanzas de precisión e intentar obtener el peso lo más exacto posible para poder así asegurar así la molaridad necesaria. Para el pH, utilizaremos un poco de papel tornasol, utilizado como medidor de pH.

En los ensayos para medir la señal en blanco de los electrodos, se utilizará la celda electrolítica de tres electrodos, con la celda auxiliar de 25 ml montada. Se localizará una sobre otra, y a continuación se añadirán aproximadamente 20 ml de la disolución que se quiere analizar con los electrodos.

Se colocará la celda en el accesorio de sujeción del potencióstato-galvanostato y pondremos la tapa de la celda. A continuación se tapan los orificios que no se van a utilizar para colocar los electrodos y ponemos en su posición el electrodo de referencia y el contraelectrodo, con la configuración de trabajo habitual (Referencia→Trabajo→Contraelectrodo, de izquierda a derecha en mis ensayos).

Se conectarán las conexiones del galvanostato a los electrodos con ayuda de unas pinzas de cocodrilo o accesorios propios del potencióstato. Entonces es el momento de preparar el electrodo de trabajo para realizar una medición.

Tras haber seguido los pasos descritos en el apartado del 3.3. *Procedimiento de fabricación de sensores*, se tendrá un electrodo con pasta de nanopartículas recién descolgado y desenvuelto de su protección. Lo primero que ha de hacerse es limpiar toda la superficie de la jeringuilla con mucho cuidado de no tocar la punta, donde se localiza la pasta que va entrar en contacto con la disolución. Para ello he utilizado a lo largo de mi experimentación papel de laboratorio, sobre el cual, movía el electrodo haciendo círculos retirando suciedad que este pudiera tener.

Para limpiar la punta, se ha utilizado un procedimiento más cuidadoso, ya que es la zona con la que se ha de medir, y cualquier modificación en la matriz de la pasta, puede variar los resultados obtenidos. Para la limpieza he utilizado papel de filtro de laboratorio, el cual extendía sobre una superficie lisa. Procedía a limpiar la punta del electrodo de la zona más exterior al centro en movimientos concéntricos sin apretar excesivamente contra el papel, y con la jeringuilla ligeramente inclinada unos 20°. Con esto conseguía retirar restos de nanopartículas que pudieran quedar en la superficie de PVC. A continuación, colocaba el electrodo lo más vertical posible y realizaba el mismo movimiento concéntrico realizado con anterioridad, siempre con cuidado de no arrastrar la pasta del interior hacia fuera por realizar demasiada presión en el émbolo o contra el papel. Consideraba que el electrodo estaba completamente limpio cuando no dejaba ninguna marca en el papel auxiliar del laboratorio, (al utilizar pasta de carbono como base para los electrodos, estos dejan un mancha negra, similar a la de un carboncillo de dibujo).

Se coloca el electrodo de trabajo en su posición y se conecta al potencióstato, se arranca este a la vez que el software a utilizar y se determina los parámetros de ensayo. Como se describió al inicio del este capítulo, los parámetros utilizados para un ensayo en electrolito básico son:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0
- Potenciales extremos [-1,1]
- Área del electrodo $A = 1 \text{ cm}^2$
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =10

Si bien anteriormente he descrito que normalmente se realizarían 5 ciclos, al inicio de mi investigación los ciclados de los electrodos los realizaba con 10, debido a que no conocía la respuesta de estos, ni el número de ciclos necesarios para obtener una señal estabilizada.

4.2.1.1. Respuesta de los electrodos de Carbono

Se comenzará por los electrodos de carbono ya que estos son la base para el resto de la investigación y los que se modificarán.

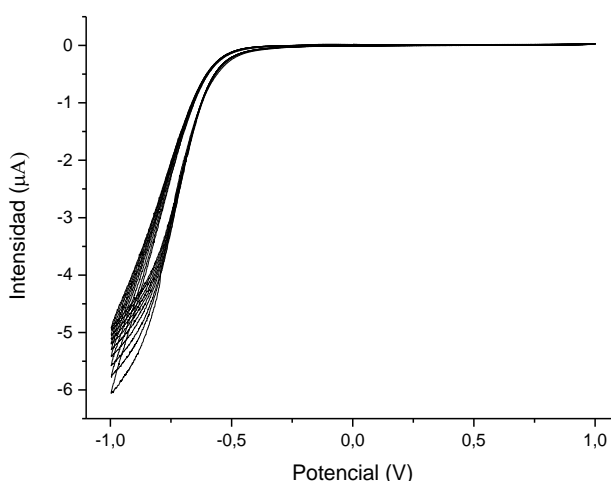


Imagen 84. Respuesta de los electrodos de Carbono al PBS durante un ensayo de 10 ciclos recién fabricados los electrodos

En la *imagen 84* se puede ver una señal típica de un electrodo de pasta de Carbono, una de sus principales características, es un ciclo que sin ningún pico característico, se observa tan solo un estrecho pico de reducción en torno a -1 e intensidades de entre -5 y -6 μA , además la señal que obtenemos es plana. Si nos fijamos en la reproducibilidad en los ciclos se puede observar que en la oxidación, no existe diferencia entre los sucesivos ciclos. Mientras que si nos movemos a la reducción se observa como a medida que los ciclos avanzan las señales se van juntando, es decir, la reproducibilidad aumenta con el paso de los ciclos.

No solamente interesa comparar una sola señal, sino también la señal de todos los electrodos que se fabricaron con la misma pasta de carbono en la *imagen 85*

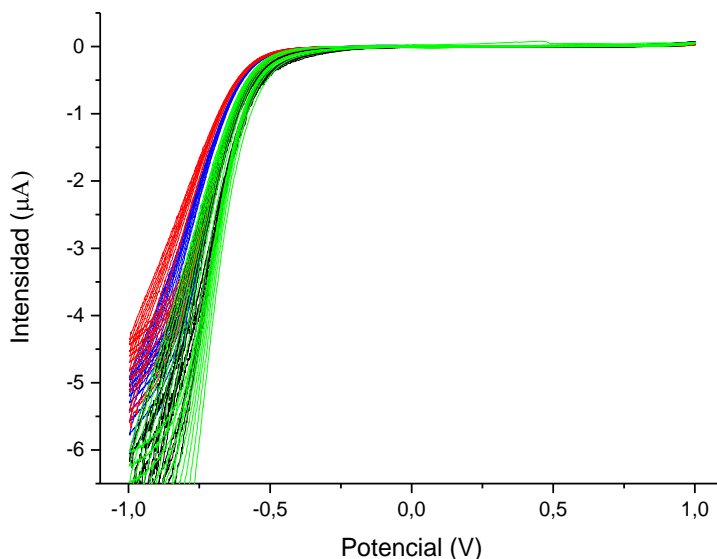


Imagen 85. Respuesta de cuatro electrodos de Carbono fabricados con la misma pasta de Carbono ensayados durante 10 ciclos en PBS

Debido a la presencia de 10 ciclos por cada electrodo y 4 electrodos en este voltamograma no se pueden apreciar con claridad toda la información que este posee.

En cambio sí podemos apreciar como todos comparten la misma señal característica de un pico en reducción en -0.1 V. Podemos ver como todos los electrodos muestran un mismo tipo de respuesta ante un misma disolución de referencia, pero no es exacta entre ellos, ya que, la señal de un electrodo es única, y pese realizar un proceso de fabricación escrupulosamente para evitar grandes diferencias y obtener electrodos que funcionen correctamente, nunca se puede rellenar distintos electrodos de la misma manera.

Es decir, el proceso de fabricación marcará de por vida el electrodo, y ha de ser identificado en estos pasos previos.

Si eliminamos algunos de los ciclos de cada electrodo podremos comparar más en profundidad la señal de cada sensor con pasta de Carbono como se muestra a continuación, en concreto en el primer ciclo de ensayo.

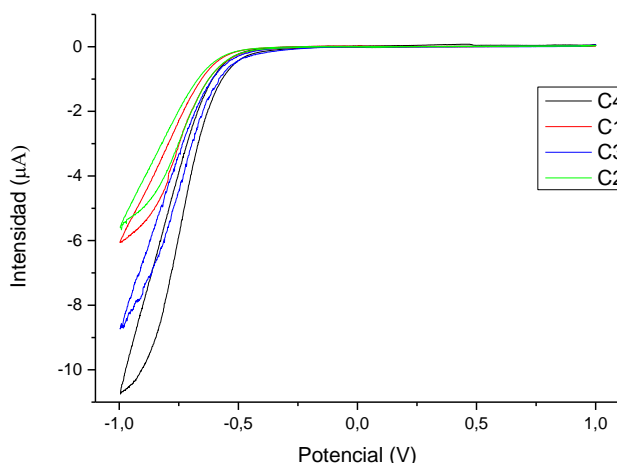


Imagen 86. Respuesta de los CPE's fabricados a partir de una misma pasta de Carbono en el primer ciclo de ensayo en PBS

Las conclusiones que obtenemos de este voltamograma es la diferencia entre electrodos, en su fabricación. Comprobamos como los dos primeros C1 y C2 tienen una señal parecida y ligeramente distinta a C3 y C4. Esto puede ser debido a varios puntos del proceso, como puede ser en el relleno de los electrodos los últimos no se rellenaron en condiciones. Si nos fijamos en los ciclos en sí de cada electrodo, ninguno de ellos se cruza ni tiene oscilaciones muy pronunciadas, lo cual nos indica que podemos seguir utilizando estos sensores.

Se muestra a continuación otros ensayos de electrodos de Carbono para poder determinar mejor la reproducibilidad de estos sensores.

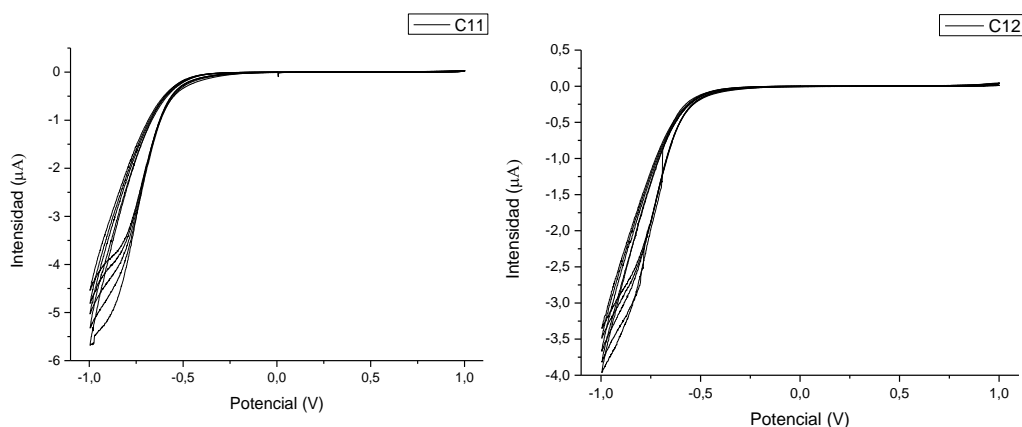


Imagen 87. Respuesta de los electrodos C11 (izquierda) y C12 (derecha) a un ensayo en PBS después de su fabricación

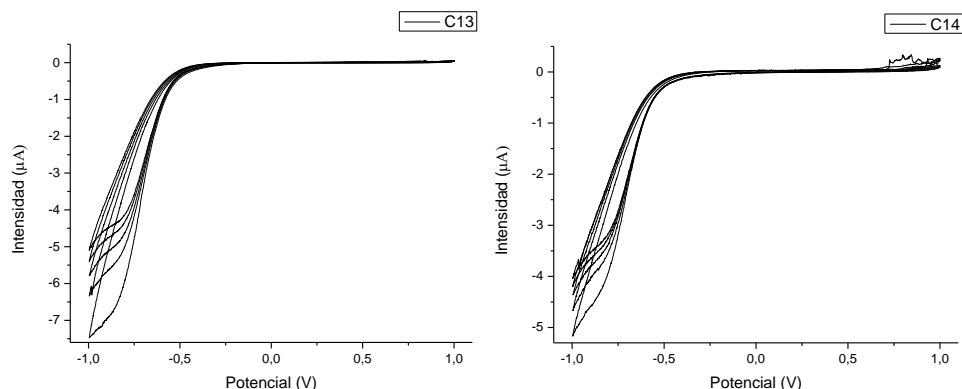


Imagen 88. Respuesta de los electrodos C13 (izquierda) y C14 (derecha) a un ensayo en PBS después de su fabricación

Estos son los cuatro siguientes electrodos de carbono que se fabricaron después de los anteriores, podemos ver algunas diferencias respecto a los anteriores. La reproducibilidad en los ciclos es inferior a la de los anteriores, pudiendo deberse a la pasta de carbono o al relleno de los electrodos que fuera incompleto.

Los dos primeros C11 y C12 que se pueden ver en la *imagen 87* poseen una señal que no se cruza, sin ruido y un pico en reducción fino en torno a -1 V. La intensidad de corriente se encuentra entre - 4 y -5 μA .

En cuanto a C13 y C14 en la *imagen 88* los electrodos poseen diferencias respecto a un ciclo de Carbono como los que he ido comentando anteriormente, primero en el C13, los ciclos varían mucho desde el primero que se mide a los últimos, pese a que al final del ensayo la reproducibilidad mejora, no es un electrodo del todo perfecto.

Si pasamos al C14, podemos ver como en la oxidación existen una zona en la que existe ruido en la señal, concretamente este fenómeno puede deberse a una mala conexión, o simplemente un poro en la pasta de nanopartículas.

Como ya se indicó en el apartado de antecedentes uno de las primeras tareas que realicé fue comprobar como reaccionaban los electrodos tras unos meses de vida y tras haber sido ensayados en diferentes analitos como antioxidantes, ácidos, glucosa... etc. A continuación se muestran los resultados de los electrodos de carbono para comprobar la señal que nos dan después de 5 meses.

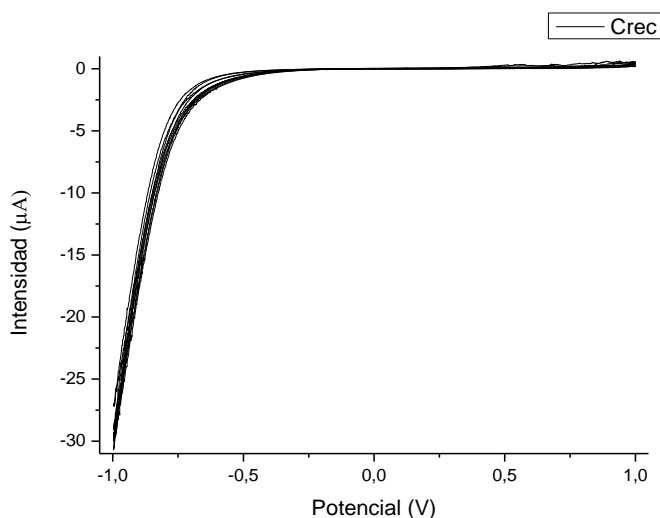


Imagen 89. Respuesta de un electrodo de Carbono a un blanco como PBS transcurridos 5 meses después de su fabricación y su utilización

Podemos ver en la *imagen89* como la intensidad de la señal ha aumentado pero seguimos teniendo un ciclo plano, el pico en la reducción y ninguna otra señal heredada de un análisis con un analito en el que previamente fue ensayado. Una de las cosas que se ven también es la estrechez del pico ha aumentado considerablemente. Algunas de estos resultados puede deberse a la limpieza y recuperación de los electrodos, la forma de realizar este paso es con un cúter cortando una pequeña parte de la punta del sensor para eliminar la pasta de nanopartículas que ha podido ser dañada durante los ensayos y después moveremos en círculos el sensor en un papel de laboratorio repitiendo el proceso de limpieza de los electrodos.

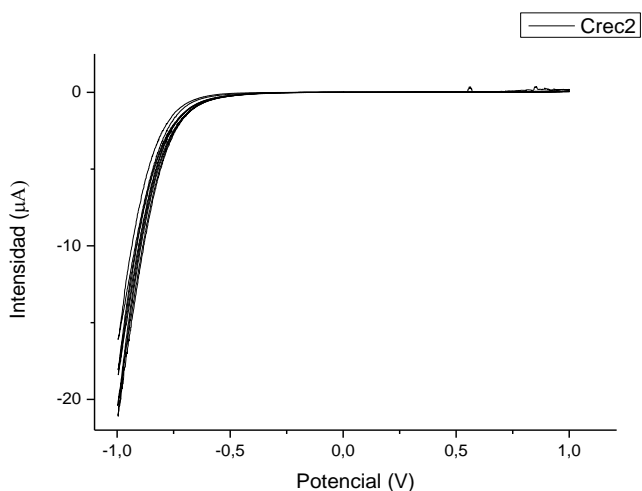


Imagen 90. Respuesta de un electrodo de Carbono al PBS transcurridos varios meses después de su fabricación y utilización

En la *imagen 90* se ve el resultado de otro de los electrodos y podemos observar las mismas conclusiones que con el anterior, pero esta vez la intensidad del sensor es menor que la del anterior, pero la señal sigue siendo plana y solo presenta el pico en reducción en -1 V.

Se procede a comparar ahora la recuperación de los electrodos después de tan solo una semana de su creación y haber sido ensayados anteriormente en Glucosa. Los electrodos se recuperan en Buffer fosfato y con las mismas condiciones de ensayo que la primera vez que se ensayaron en el blanco, en concreto se va a ver la respuesta de los electrodos C1 y C4.

En la imagen podemos ver como el electrodo recuperado posee la una intensidad de corriente muy próxima a la que nos mostraba en el primer ensayo en buffer fosfato, la forma del pico ha cambiado ligeramente, pero seguimos teniendo un voltamograma plano para los sensores C1 y C4

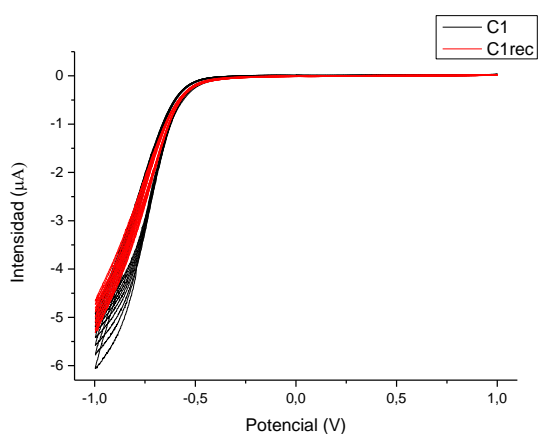


Imagen 91. Respuesta del electrodo de Carbono C1 al blanco PBS, en su primera utilización (negro) y en la recuperación tras haber sido ensayado en Glucosa (rojo)

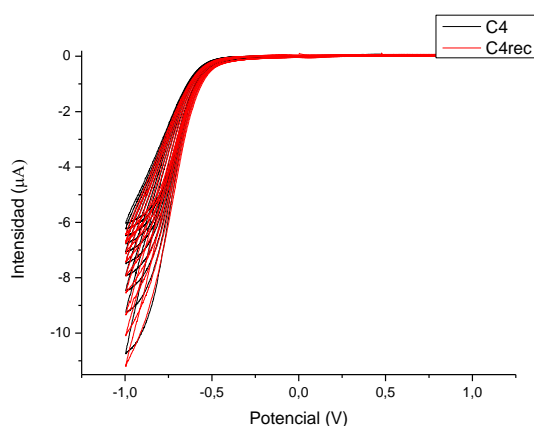


Imagen 92. Respuesta del electrodo de Carbono C4 al PBS, en su primera utilización (negro) y en la recuperación tras haber sido ensayado en glucosa (rojo)

Vemos como ambos voltamogramas se superponen prácticamente, lo que quiere decir que el sensor no ha sufrido daños irreversibles en el proceso de medición de un analito como es la glucosa.

Una de las razones por las que es tan importante el proceso de fabricación, como se ha ido comentando a lo largo de este proyecto es porque pueden resultar catastróficos a la hora de la vida de los sensores, en la detección de compuestos y en las mediciones. Algunos de los ensayos realizados a los sensores fabricados, detectaron algunos de estos problemas durante la experimentación. Estos efectos fueron observados en voltamogramas, cuando se detectaban picos en forma de estrella o mucho ruido en la señal no procedente de un fallo de conexión.

Se procedió por tanto a observar con cuidado la pasta de nanopartículas y el electrodo intentando detectar variaciones respecto a un sensor que funcionara perfectamente. Algunos de los problemas que se consiguió detectar se exponen a continuación, demostrando así la importancia de realizar cuidadosamente todos los pasos experimentales del proceso y proporcionando una posible vía de detección de electrodos con mal funcionamiento.

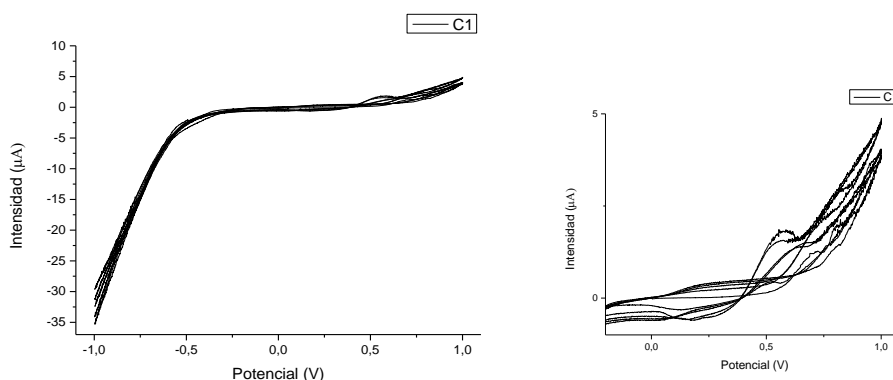


Imagen 93. Respuesta del CPE C1 no recuperado de Carbono tras haber sido utilizado reiteradamente en el que comienza dejar rastros de señales anteriores

Este voltamograma se corresponde a la recuperación de un electrodo de pasta de Carbono tras haber sido ensayado en diversas disoluciones como son la glucosa, el ácido málico, etc... Se puede observar la gran variación que sufre la intensidad de corriente que os da este sensor, la primera vez que fueron ensayados en Buffer fosfato obtuvimos $-6 \mu\text{A}$ y en este momento tenemos intensidades de $-35 \mu\text{A}$.

Aunque la señal del sensor sigue siendo plana, empiezan a detectarse ruido en la señal y obtenemos picos muy finos e intensos. Una de las características que llama la atención fue la aparición de un pico en la oxidación que hasta ahora en ninguno de los ensayos de recuperación había aparecido, esto nos da a entender que el sensor no se ha recuperado de sus usos en la detección de analitos y por ello no será un electrodo fiable a partir de este ensayo. Además podemos observar como en la señal se cruza en alguno de los puntos, para ello aparece al lado una

ampliación del voltamograma para apreciar bien las características que nos muestran que estos electrodos ya no han de usarse en la detección de compuestos.

A continuación se presenta el voltamograma del electrodo C4 tras haber sido usado en varias ocasiones para medir analitos y ser recuperado en Buffer fosfato.

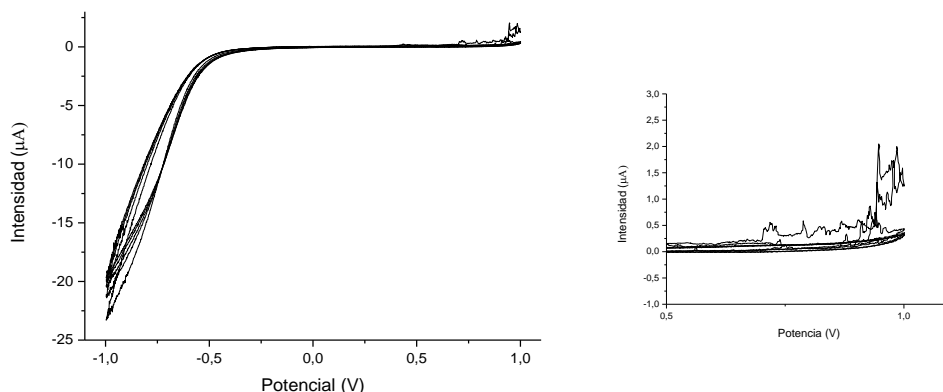


Imagen 94. Respuesta del electrodo C4 ante PBS durante una recuperación después de haber usado reiteradamente en varios analitos.

Se ve como la intensidad de corriente sigue siendo mucho mayor que la que obtuvimos al ensayarlo por primera vez en buffer fosfato, además del ruido que se obtiene en la oxidación, tal y como se muestra en la ampliación en la imagen anterior del electrodo C4.

En el electrodo C1 se detectó después de varios ensayos y recuperaciones la presencia de un poro en la pasta de nanopartículas, y tras ser ensayado en buffer fosfato obtuvimos los resultados que aparecen a continuación. Se sabe por tanto que la presencia de un poro introduce ruido en la señal de los electrodos y además no permite su total recuperación como se muestra en las imágenes.

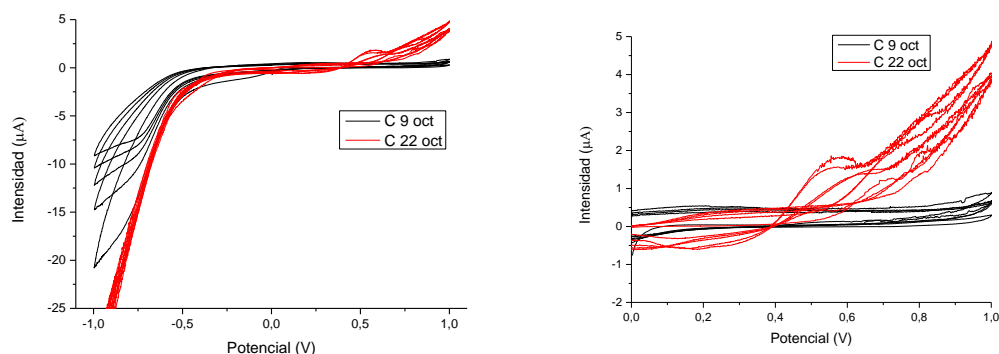


Imagen 95. Diferencia de respuesta de un electrodo de Carbono con 13 días de diferencia en el que ha aparecido un poro en la matriz de pasta de carbono (rojo) que no estaba anteriormente (negro)

En la *imagen 96*, se muestra los efectos de dicho poro en el electrodo tras haber medido en mosto y recuperarse en buffer fosfato. A la hora de determinar la razón del ruido fue cuando se observó el poro de bastante amplitud en la superficie en contacto con la disolución.

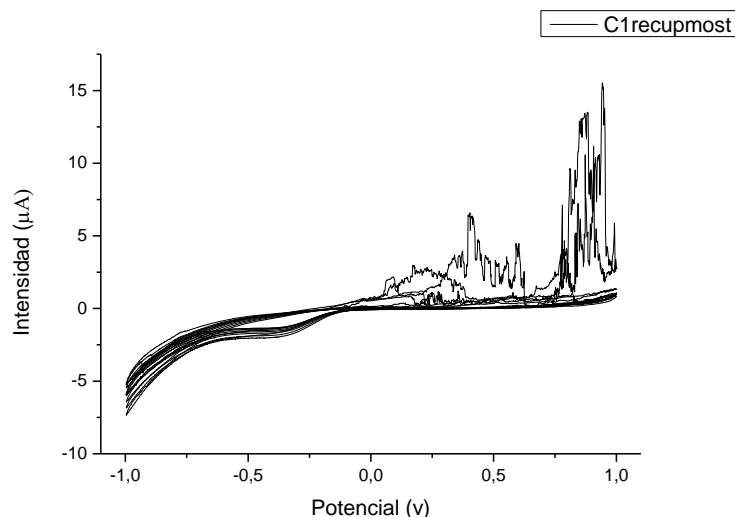


Imagen 96. Respuesta de un electrodo de Carbono en una recuperación en PBS con la presencia de un poro en la matriz de material.

Si bien, en otras ocasiones los electrodos quedan inutilizables por otras razones que no sean puramente fabricación de los sensores, como por ejemplo por la utilización de estos en disoluciones agresivas, o por una modificación o contaminación de la pasta. A continuación se muestra un resultado en la recuperación de un electrodo C4 en el que se produjo una alteración que lo inutilizó ante posibles nuevos ensayos.

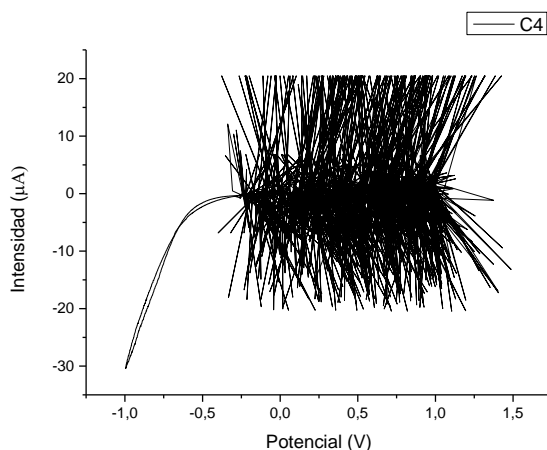


Imagen 97. Respuesta de un electrodo de Carbono ante una recuperación, con una alteración en la matriz que lo hace inutilizable

Por tanto y como conclusión podemos decir que los electrodos de grafito realizados con el procedimiento descrito presentan en general buena reproducibilidad y estabilidad y son igualmente recuperables para su uso en al menos cinco o diez ensayos. El ensayo en el electrolito que actúa como blanco es imprescindible para conocer el estado y el grado de calidad del electrodo.

4.2.1.2. Respuesta de los electrodos con nanopartículas de Titanio

En cuanto a los electrodos de carbono modificados con nanopartículas de titanio la señal de estos ante un blanco se corresponde a la observada en la *imagen 98*

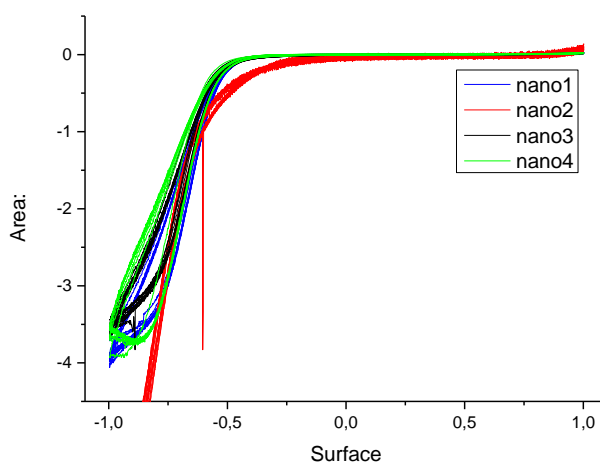


Imagen 98. Respuesta de electrodos NANO ante el Buffer fosfato por primera vez

Podemos ver como los voltamogramas que obtenemos en el caso de los electrodos modificados con nanopartículas de Titanio son ligeramente distintos a los obtenidos con los sensores de Carbono. Se ve como existe un pico en la reducción más intenso en torno a -1 V, son además señales planas salvo en el caso del NANO2, en el que aparece un pico en la reducción y es mucho más estrecho que el resto. En general la señal de estos sensores es de la misma magnitud en intensidad de corriente que los de Carbono, pero los picos obtenidos en la reducción son mucho más anchos. A parte de esto no se detecta ningún otro pico que pueda afectar a la detección posterior de otros analitos con lo que podemos concluir que los electrodos modificados pueden utilizarse como sensores para nuestros analitos.

Podemos ver en más detalle los tres electrodos que nos dan una señal correcta, solamente mostrando un ciclo para poder apreciar en detalle la señal característica de estos sensores.

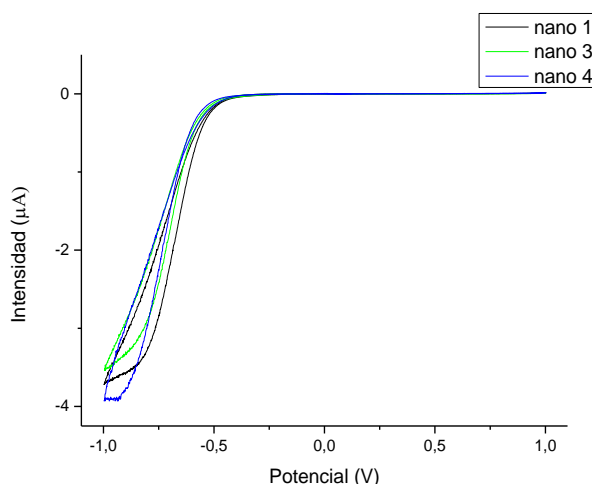


Imagen 99. Respuesta de electrodos NANO correctamente fabricados ante el PBS en su quinto ciclo

También podemos analizar en este caso la respuesta de los sensores a la recuperación tras haber sido utilizados en ensayos como hicimos con los electrodos de Carbono.

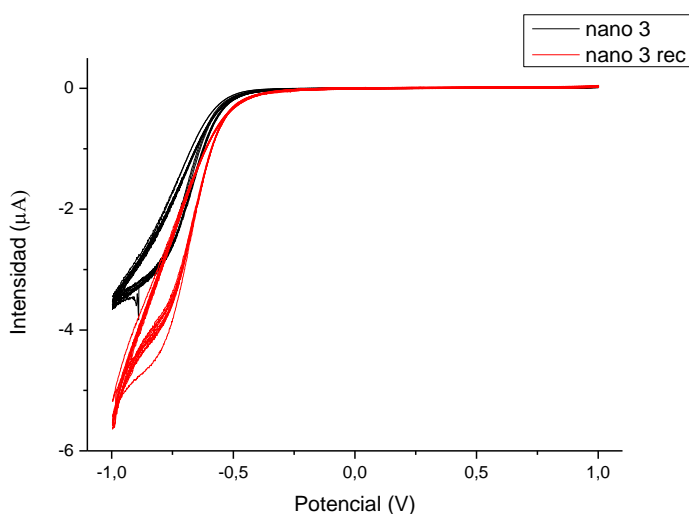


Imagen 100. Respuesta de un electrodo NANO en una recuperación en PBS (rojo) y la señal original de dicho electrodo (negro)

La recuperación de los electrodos es bastante buena, aunque se observa que la forma del ciclo cambia ligeramente en la reducción en el pico de -1V y la intensidad de corriente también varía de forma ligera respecto a la que teníamos antes de utilizarlos previamente.

4.2.1.3. Respuesta de los electrodos de TiO₂

Por último, se muestran los resultados de los sensores NANOTIO en buffer fosfato de forma que identifiquemos sus características principales. A continuación se muestran los cuatro electrodos ensayados en el blanco.

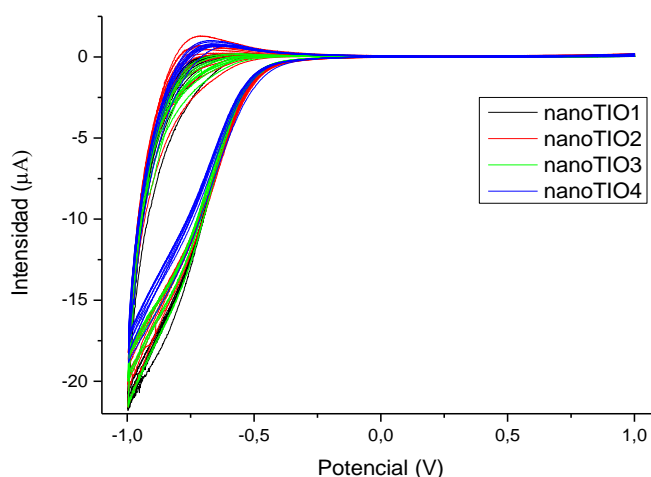


Imagen 101. Respuesta de los electrodos NANOTIO ante el Buffer Fosfato

En los resultados que se ven en la *imagen 101* se observa como son los electrodos con más repetitividad de todos los sensores que se han mostrado por el momento. No solamente en los ciclos de un mismo sensor, sino también entre los 4 sensores, casi no existen diferencias entre los cuatro electrodos distintos de la figura.

Por tanto, podemos determinar que estos son los sensores con mejor repetitividad y reproducibilidad. La señal que hemos obtenido es plana y muy intensa, nos encontramos en torno los -25 µA, mientras que los otros se encontraban en torno a los -6 µA. Además, el pico es mucho más ancho que en los demás pero se sigue localizando en la reducción y en -1 V. Este pico recuerda mucho al de la reducción del agua, y sin duda será característico de estas nanopartículas de dióxido de Titanio. En la oxidación no se presenta ningún pico, pero sí un ligero hombro a potenciales muy negativos, por lo que son aptos para la detección de analitos como los propuestos en esta investigación. Podremos observar a lo largo de la experimentación este mismo pico y el hombro correspondiente de oxidación que son por tanto característicos de estos sensores modificados.

La recuperación de estos sensores después de haber sido utilizados en los ensayos de detección de antioxidantes, ácidos o azúcares se puede ver a continuación.

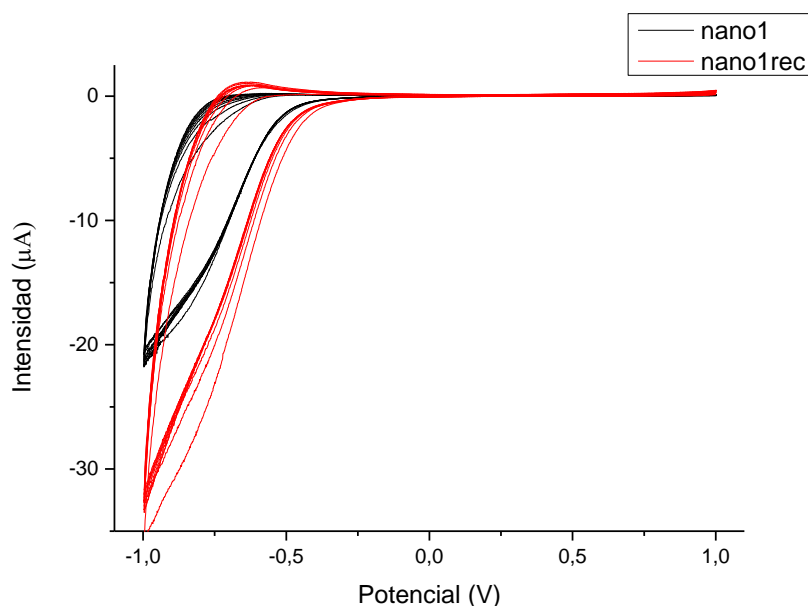


Imagen 102. Respuesta de un electrodo NANOTIO recuperado (rojo) y la respuesta original de dicho electrodo en PBS (negro)

Podemos observar como el ciclo se hace más intenso a medida que se cicla pero la forma es similar y la repetitividad del ciclo se sigue manteniendo. Por último, no se observa ningún ruido en la señal ni nuevos picos en el voltamograma.

Podemos decir entonces que estos sensores tienen buena recuperación y por tanto son sensores que pueden ser reutilizados sin problemas en más de diez ensayos diferentes.

4.2.1.4. Comparativa entre electrodos

A continuación se presenta una comparativa entre las señales en blanco de todos los electrodos, de forma que se puedan mostrar las diferencias entre los sensores de pasta de Carbono, los modificados con nanopartículas de Titanio y por último los que se modifican con nanopartículas de dióxido de Titanio.

En primer lugar vamos a comparar los electrodos de Carbono y los modificados con nanopartículas de Titanio. Los resultados que obtenemos son los que aparecen en la siguiente imagen

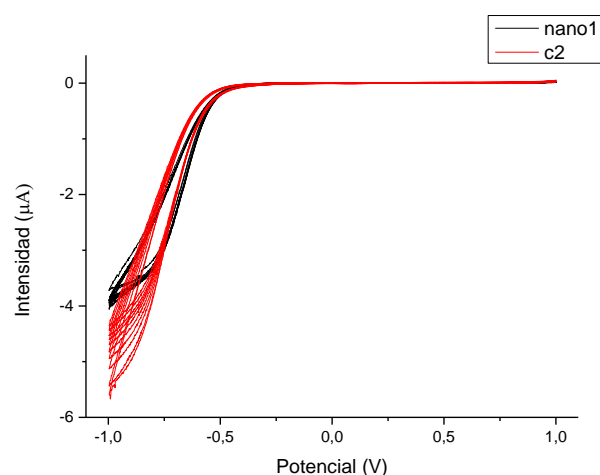


Imagen 103. Comparativa de la respuesta de los electrodos de pasta de Carbono (rojo) y los NANO (negro) ante el PBS

En la comparación de ambos se puede observar como la repetitividad en los sucesivos ciclos de los sensores de nanopartículas de Titanio es mejor incluso que de los de Carbono, eso se puede apreciar en que los ciclos son más parecidos entre sí. Además el ciclo es ligeramente más ancho. Por tanto podemos concluir que los sensores modificados NANO son igualmente fiables que los de carbono.

Podemos comparar los voltamogramas obtenidos de NANOTIO con los de Carbono y los de nanopartículas de Titanio.

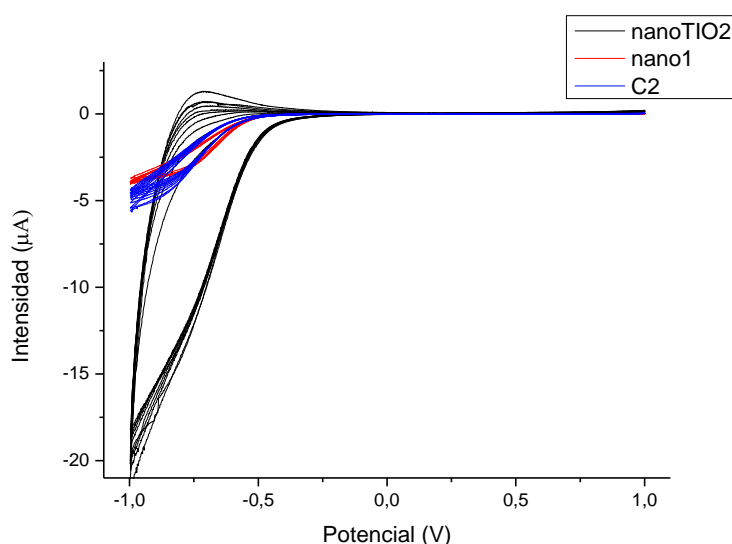


Imagen 104. Comparación de la respuesta de los electrodos de Carbono (azul), NANO (rojo) y NANOTIO (negro) ante el PBS

En la *imagen 104* se puede observar la gran diferencia de intensidad de corriente en la señal entre los tres electrodos. La forma de los ciclos es similar entre el Carbono y las partículas de Titanio pero el dióxido de Titanio cambia por completo el pico de reducción del agua como ya se ha comentado. En cuanto a repetitividad los ciclos son mucho más parecidos en el TiO_2 que en los otros dos sensores, aunque todos son suficientemente fiables ante el buffer fosfato.

Por último se hace una comparación de la señal que se obtiene de cada electrodo en el quinto ciclo para una mejor apreciación de las diferencias de la señal que se obtiene con cada electrodo

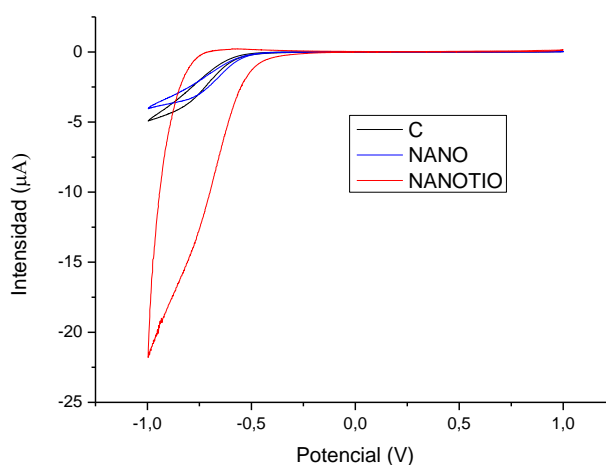


Imagen 105. Comparación de la respuesta de los electrodos de Carbono (negro), NANO (azul) y NANOTIO (rojo) en el último ciclo del análisis en PBS

Observamos como efectivamente la señal que se obtiene con la adición del dióxido de Titanio es cuatro veces más intensa que la de los electrodos de Carbono y los modificados con nanopartículas de Titanio, lo que nos muestra la mejora de señal gracias al efecto autocatalizador del TiO_2 .

El siguiente punto en la investigación fue el ensayo de los sensores en disoluciones que poseen antioxidantes, ácidos y azúcares como la glucosa.

4.2.2. Respuesta ante ácidos

4.2.2.1. Respuesta al ácido tartárico

En esta investigación se comenzó por utilizar los electrodos fabricados para la detección de ácidos presentes en un mosto, se comenzó por el ácido tartárico ya

que es uno de los ácidos más abundantes en el vino. Este ácido es el responsable de los sabores frescos y agradables. Este precipita de forma natural en forma de sales como pueden ser tartárico cálcico o bitartrato potásico, como consecuencia de la acción insolubilizante conjunta del alcohol y el frío formando así los cristales o posos del vino.

Los parámetros de ensayo que aplicaremos para este ensayo serán:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia - 0.5 V
- Potenciales extremos [-1,1] V
- Área del electrodo A = 1 cm²
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

El ácido tartárico lo disolveremos en Buffer fosfato hasta conseguir una disolución de concentración 10⁻² M, a posteriori disolveremos esta para conseguir 10⁻³ Molar.

La primera fase de la experimentación comienza con 10⁻³ M ya que si midiéramos con la disolución más concentrada, los sensores ya no podrían determinar la concentración más baja sin ser recuperados con anterioridad. Así pues mediremos primero la concentración más diluida e iremos aumentando la concentración del ácido.

En relación con la respuesta obtenida en buffer fosfato, se puede ver en la *imagen 106* como todos los sensores aumentan la intensidad de corriente en su respuesta, y siguen ofreciendo un pico en la reducción en -1 V. Por el contrario no se detecta ningún pico en la oxidación en ninguno de los tres sensores, salvo el hombro de oxidación del modificado con óxido de titanio.

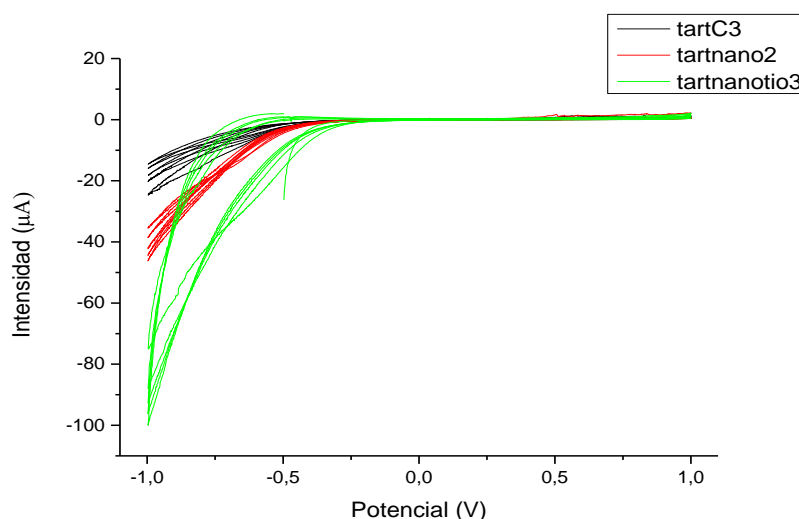


Imagen 106. Respuesta al ácido Tartárico 10⁻³ M para los electrodos de Carbono (negro), NANO (rojo) y NANOTIO (verde)

Debido a que no se observa correctamente la señal por motivo de la escala entre los NANOTIO y los otros dos electrodos, vamos a centrarnos en los sensores de dióxido de Titanio ya que son el punto central de este proyecto, es decir, determinar cómo dichas nanopartículas afectan a los electrodos y las mediciones que estos son capaces de realizar.

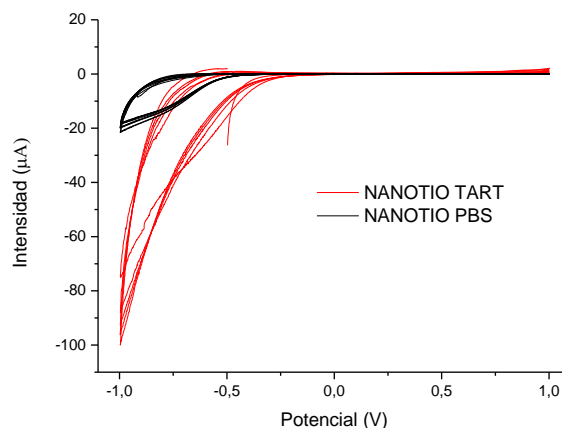


Imagen 107. Respuesta de los CPE's NANOTIO ante el blanco PBS (negro) y el ácido Tartárico 10^{-3} M (rojo)

Como vemos en la imagen 107 no es muy diferente del voltamograma que se obtenía en el blanco, a concentración 10^{-3} M, pero la intensidad de corriente del NANOTIO aumenta en torno a potencial -1 V. Se analizará a continuación si el aumento de molaridad en la disolución ofrece una mejora en la señal.

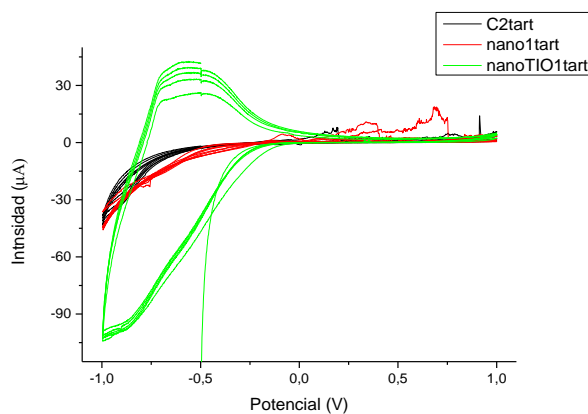


Imagen 108. Respuesta de los CPE's de Carbono (negro) NANO (rojo) y NANOTIO (verde) al ácido Tartárico en una concentración 10^{-2} M

En el voltamograma que se muestra en la imagen 108 vemos como los electrodos C2 y NANO1 aumentan la intensidad de corriente en el pico de -1 V en la reducción,

y en la oxidación muestran ruidos en la señal. Además estos tres ensayos tienen una amplia repetitividad, no hay grandes diferencias entre ciclos.

Si nos fijamos en el sensor NANOTIO1, podemos ver cómo en torno a $E=-0.5$ V aparece un pico en la oxidación con una intensidad de corriente muy elevada, que nos puede estar mostrando el ácido que estábamos analizando también se observa un pico en la reducción en torno a -0.8 V que no es posible observar en los otros electrodos.

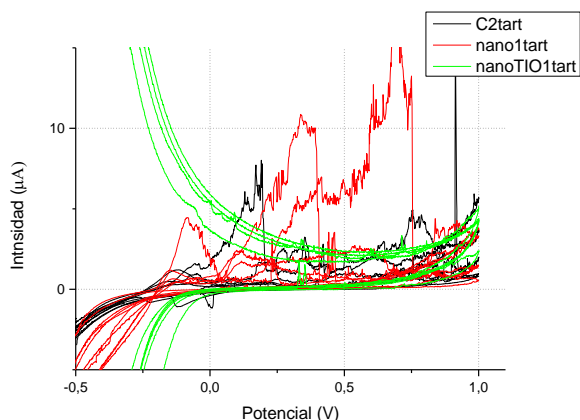


Imagen 109. Detalle del ruido de la respuesta de los CPE's de Carbono (negro), NANO (rojo) y NANOTIO (verde) ante el ácido Tartárico 10^{-2} M a potenciales muy positivos

En la figura anterior, *imagen 108*, se ve una ampliación de $E=1$ V y el ruido de los electrodos de Carbono y los modificados con Titanio, mientras que los de Dióxido de Titanio no se muestra el ruido en la señal y además la intensidad de corriente es mayor.

A continuación se muestran los resultados para varios sensores de Dioxido de titanio, para ver la repetitividad del ensayo.

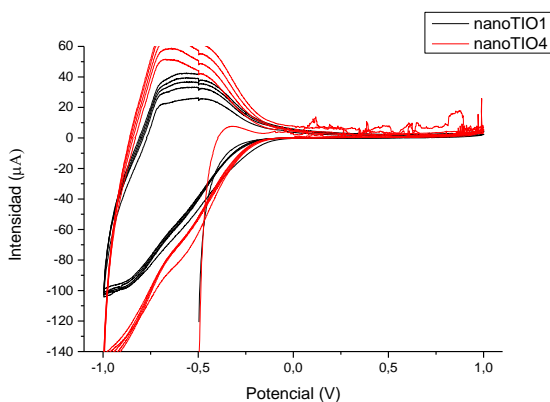


Imagen 110. Respuesta de dos CPE's NANOTIO al ácido Tartárico 10^{-2} M

Podemos ver en la *imagen 110* que tanto en sensor NANOTIO1 como el NANOTIO4 muestran la misma forma del pico en la oxidación en torno a -0.5 V con una intensidad de corriente de -60 μ A. La repetitividad de estos electrodos en ácido es muy buena, no se aprecian prácticamente diferencias entre ciclos.

A la luz de los ensayos realizados podemos ver como la adición de nanopartículas de óxido de titanio añaden a los sensores ciertas características de detección como puede ser la terminación de ácidos que en los electrodos de Carbono y Titanio no se obtenían.

Con estos resultados se decidió probar los sensores en otros ácidos que componen el vino para determinar si los sensores son capaces de detectar otros ácidos y además observar si los picos de oxidación y reducción coincidían con lo que podrían ser utilizarlos para discriminar entre estos compuestos.

4.2.2.2. Respuesta al ácido málico

El siguiente analito utilizado fue el ácido málico el segundo en mayor proporción en mostos y vinos. Es el que proporciona al vino notas ásperas poco agradables. Su concentración es proporcional directamente con la maduración del fruto, cuanto más maduro, menos ácido málico.

En la realización de los ensayos se utilizaron los siguientes parámetros:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia -0.5 V
- Potenciales extremos $[-1,1]$ V
- Área del electrodo A = 1 cm^2
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

El ácido málico lo disolveremos en Buffer fosfato hasta conseguir una disolución de concentración 10^{-2} , a posteriori disolveremos esta para conseguir 10^{-5} y 10^{-6} Molar.

La primera fase de la experimentación comienza con 10^{-6} M ya que si midiéramos con la disolución más concentrada, los sensores ya no podrían determinar la concentración más baja sin ser recuperados con anterioridad igual que sucedía con el ácido tartárico. Así pues mediremos primero la concentración más diluida.

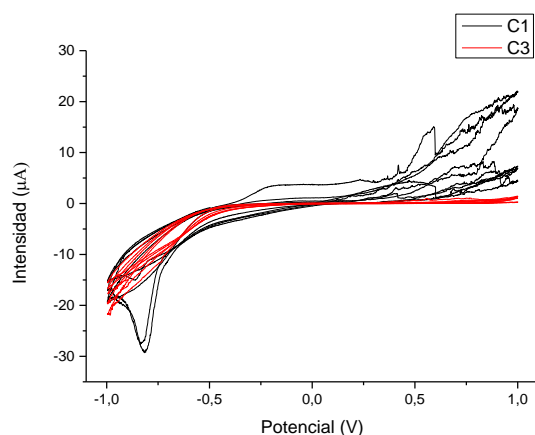


Imagen 111. Respuesta de dos electrodos de Carbono al ácido Málico en una concentración de 10^{-6} M donde C3 está en perfecto estado (rojo) y el C1 es un electrodo con poro en la matriz (negro)

En el voltamograma superior se comparan dos de las señales obtenidos por los electrodos de Carbono utilizados en la medida de ácido málico C1 y C3. El primero C1, se mostró en el apartado anterior que tenía un poro en la matriz y de ahí la gran cantidad de ruido que tiene la señal en la oxidación. Además parece que en la reducción aparece un pico en torno a -0.75 V, que el electrodo C3 no detecta.

Si nos fijamos solamente en la señal del electrodo de Carbono que no tenía poros podemos ver la respuesta del electrodo de Carbono al ácido málico en concentración 10^{-6} . En este diagrama vemos como en el primer ciclo presenta ruido en la oxidación y la Intensidad de Corriente que obtenemos es 5 veces mayor a la que se obtenía en blanco. En este caso, el pico del ácido (reducción) es mucho más claro que el del fosfato (oxidación), aun así no es comparable a la señal que se obtiene en el ácido tartárico, aunque en este caso se ha utilizado una concentración mucho menor. Por el contrario si nos fijamos en la repetitividad del sensor no es extremadamente buena, pero con el paso de los ciclos esta mejora.

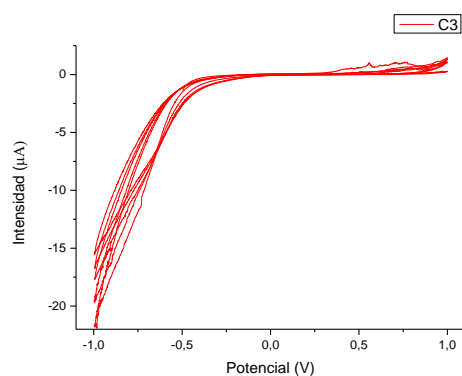


Imagen 112. Respuesta de un electrodo de Carbono en perfectas condiciones al ácido Málico en 10^{-6} M

El siguiente paso es comparar el resultado de los electrodos de Carbono modificados con nanopartículas de Titanio introducidos en un analito de ácido Málico con los sensores con Carbono solamente. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

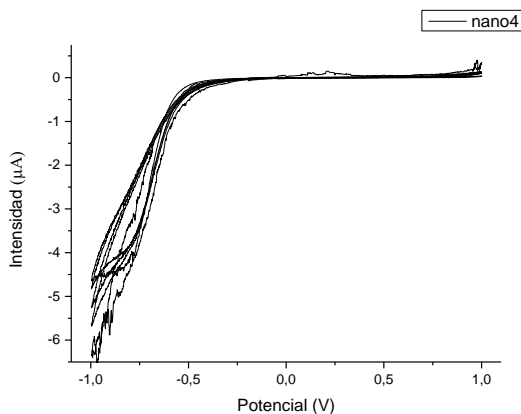


Imagen 113. Respuesta de los CPE's NANO al ácido Málico $10^{-6} M$

En este ensayo se muestran los resultados obtenidos, se muestra un pico en la reducción en $-1V$ y empieza a aparecer un intento de otro pico en $E=-0.75V$, la señal tiene mucho ruido procedente del primer ciclo, donde aún no se había estabilizado la señal aún. La intensidad de corriente del ciclo tiene el mismo orden de magnitud que tenía en el blanco en torno $-5 \mu A$. En la oxidación no hay indicios de picos, salvo ruido en los primeros ciclos de la señal.

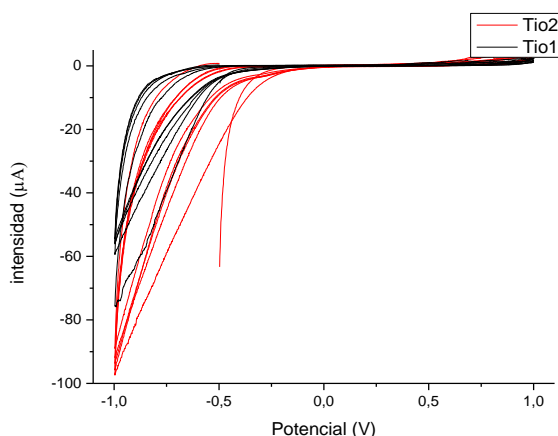


Imagen 114. Respuesta de los CPE's NANOTIO al ácido Málico $10^{-6} M$

En la imagen 114 se ve el efecto del Dióxido de Titanio en los electrodos de Carbono, el voltamograma obtenido muestra la aparición de la alta intensidad de corriente en la reducción en $-1 V$ como la que se veía en el ácido tartárico. No

obstante no aparece pico en la oxidación en torno a $E=-0.5$ V, lo cual puede ser debido a que a bajas concentraciones como es esta no es capaz de detectar el analito. En potenciales positivos parece que el pico comienza a definirse pero aún no es identificable.

Por último si hablamos de la repetitividad de los ciclos, se puede observar que es mejor que la de los electrodos de Titanio y de Carbono, aunque en el primer ciclo este varía respecto a los anteriores la señal enseguida se homogeniza y quedan ciclos idénticos.

Ante la detección del ácido en reducción con altas intensidades pero no del pico de la oxidación, se aumentó la concentración del ácido málico y se ensayaron de nuevo electrodos de los tres tipos. Comenzaremos con el Carbono como con el resto de las respuestas.

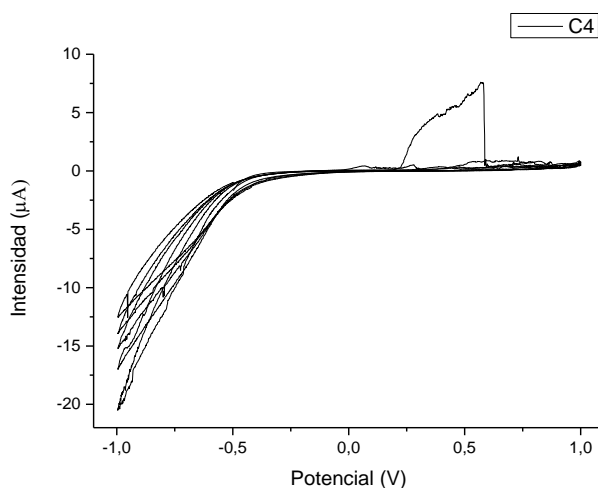


Imagen 115. Respuesta de los CPE's de Carbono al ácido Málico 10^{-5} M

La Intensidad de Corriente que obtenemos son $-20 \mu\text{A}$ igual que la que se obtenía en la concentración inferior. Además en cualquiera de los picos en los que nos fijemos reducción u oxidación, aparece una señal con mucho ruido, además en uno de los ciclos se ve un salto en la Intensidad, que puede ser fruto del ruido del electrodo. La repetitividad de los ciclos no ha mejorado respecto la concentración anterior, se observa como ninguno de los ciclos son iguales.

Así mismo, ni la forma del ciclo ni la intensidad de corriente ha cambiado, por el momento podemos decir que los electrodos de Carbono no detectan los ácidos correctamente en estas bajas concentraciones ya que no ha habido un cambio de la señal ante la concentración. Aún estamos a bajas concentraciones por lo que habrá que ver los resultados con la concentración de 10^{-2} M, que se midieron a continuación.

A continuación medimos la respuesta de los sensores con Titanio cuyos resultados se muestran en la imagen a continuación.

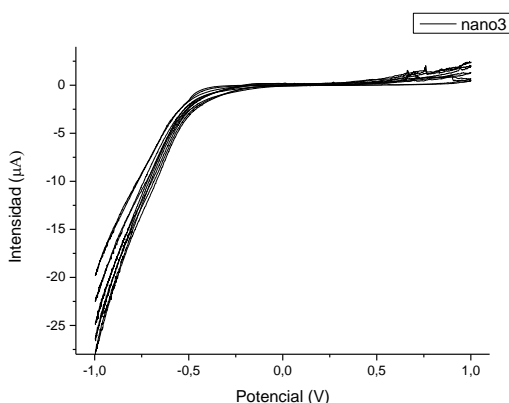


Imagen 116. Respuesta de los CPE's NANO al ácido Máltico $10^{-5} M$

En este resultado de medición podemos ver como la intensidad de corriente ha aumentado respecto a la concentración anterior unas 4 veces aproximadamente, además en la oxidación en $E=1 V$ el pico tiene una intensidad de corriente superior a la que aparecía en la concentración más baja, lo cual puede significar el inicio de la aparición de un pico. Aún con estas evidencias de mejora del ciclo respecto a la concentración del ciclo, la repetitividad no ha mejorado, no tenemos ciclos similares. Así mismo no obtenemos la misma forma que con el dióxido de Titanio, pudiendo significar que no detecta todos los grupos de un ácido.

Por último se ensayan los sensores con TiO_2 en esta concentración obteniendo los resultados que aparecen en la imagen a continuación.

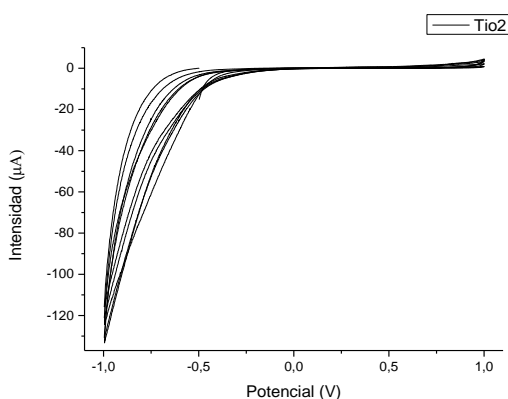


Imagen 117. Respuesta de los CPE's NANOTIO al ácido Máltico $10^{-5} M$

La intensidad de corriente que obtenemos en la reducción es un 20 % mayor que la que obteníamos en una concentración inferior, pese a esto, el ciclo es más

estrecho, aunque puede ser debido a que no se corresponde al mismo electrodo que el ensayo anterior. El ruido que obteníamos en el voltamograma ha disminuido considerablemente, y además en la oxidación podemos observar como la intensidad de corriente mejora ligeramente, pero no llega a detectarse de la misma manera que el ácido Tartárico.

Una vez más, aún se trabajó a una concentración de 10^{-5} M y puede que sea muy pequeña como para que los electrodos detecten el analito por completo.

Se aumentó la concentración de la disolución a 10^{-2} M para comparar la señal de los sensores en ácido Máfico y la de ácido Tartárico.

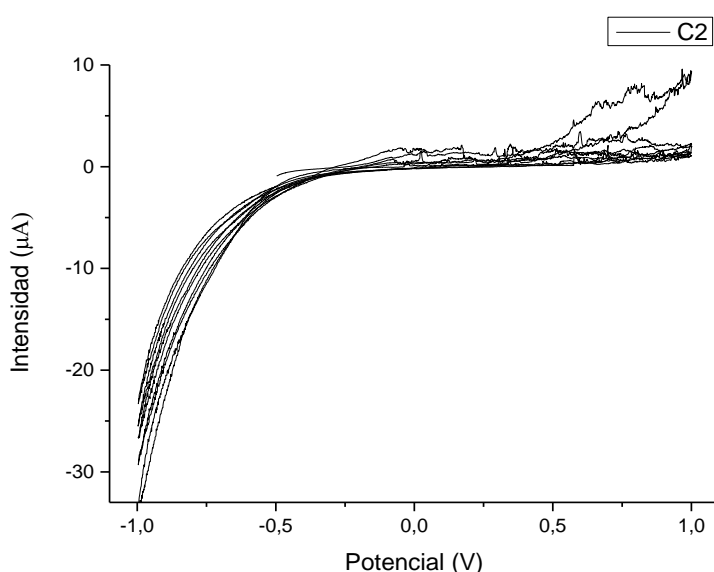


Imagen 118. Respuesta de los CPE's al ácido Máfico 10^{-2} M

Comenzamos con la pasta de carbono, la señal aumenta ligeramente en intensidad, pero seguimos obteniendo una gran cantidad de ruido no solo en los ciclos iniciales, si no en su totalidad, además parece que en la oxidación la intensidad de corriente aumenta como si quisiera empezar a formarse un pico, esta intensidad ha ido aumentando con el aumento de la concentración del analito, y la señal del electrodo si la comparamos con la del buffer fosfato y la del tartárico, se parece más a la del ácido aunque no es igual del todo.

La repetitividad de los ciclos no ha mejorado, tampoco lo cual nos indica que no son unos electrodos del todo fiables en la medición de ácidos.

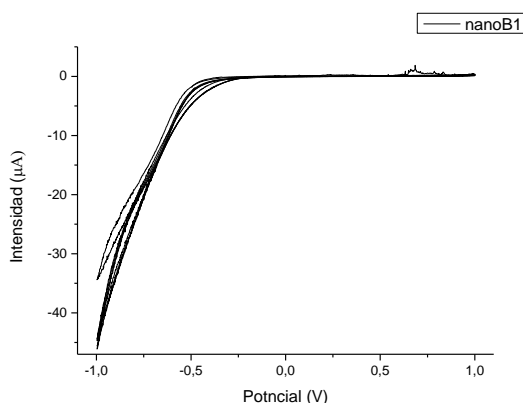


Imagen 119. Respuesta de los CPE's NANOTIO al ácido Málico 10^{-2} M

Lo primero en lo que nos fijamos es que la intensidad de corriente en la reducción ha subido de $-20 \mu\text{A}$ hasta $-40 \mu\text{A}$ pero en la oxidación no se ha conseguido que la intensidad de corriente aumente cuando hemos aumentado la concentración. La señal que obtenemos es distinta que la que obtenemos en el buffer fosfato, por lo que los electrodos si están midiendo en el analito el ácido, pero no aparece ningún pico que lo confirme. Aunque la repetitividad de los ciclos haya mejorado, no podemos asegurar que los electrodos midan correctamente la señal de un ácido.

Por último se evaluó la respuesta de los electrodos de TiO_2 al ácido málico en una concentración de 10^{-2} M. En la *imagen 120* podemos extraer las siguientes conclusiones. La intensidad de corriente en reducción no ha mejorado pero aparece un pico en la oxidación entre $E = -0.5$ V y $E = -0.75$ V igual que el que obteníamos en el ácido tartárico, con la salvedad de que en potenciales positivos no alcanzamos en el potencial extremo de barrido ningún pico. Fijándonos en la repetitividad de los ciclos, estos son prácticamente idénticos salvo por el ruido que obtenemos en los primeros ciclos que podemos observar en la oxidación.

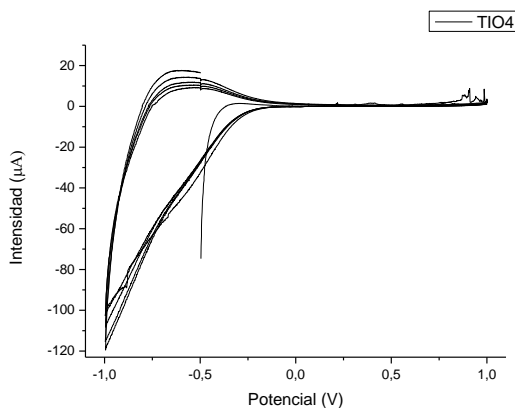


Imagen 120. Respuesta de los CPE's NANOTIO para el ácido Málico 10^{-2} M

El pico en la oxidación si lo comparamos con el que obtenemos en el ácido tartárico es menos intenso pero con la misma forma. En cambio la parte del ciclo en reducción en -0.5 V cambia ligeramente de forma. Esto indica que los sensores de TiO_2 no solo son capaces de medir ácido de una forma fiable (por la repetitividad y aumento de la señal con la concentración) pero que también es capaz de distinguir entre los ácidos en los que se introducen.

Podemos decir por tanto que los electrodos de Carbono modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio mejoran la capacidad de los primeros en la detección de ácidos, haciendo además una tarea de distinción entre ácidos.

4.2.2.3. Comparación señal ácidos para el TiO_2

Tras analizar los resultados para los tres tipos de electrodos podemos decir que los sensores de pasta de Carbono modificados con nanopartículas de TiO_2 son una elección mejor a la hora de detectar ácidos. Así mismo se pueden comparar las señales que nos ofrecen los electrodos de NANOTIO al introducirlos en distintos ácidos a la misma concentración de forma que podamos observar las diferencias que existen en las mediciones, y por tanto si son capaces de discriminar ácidos.

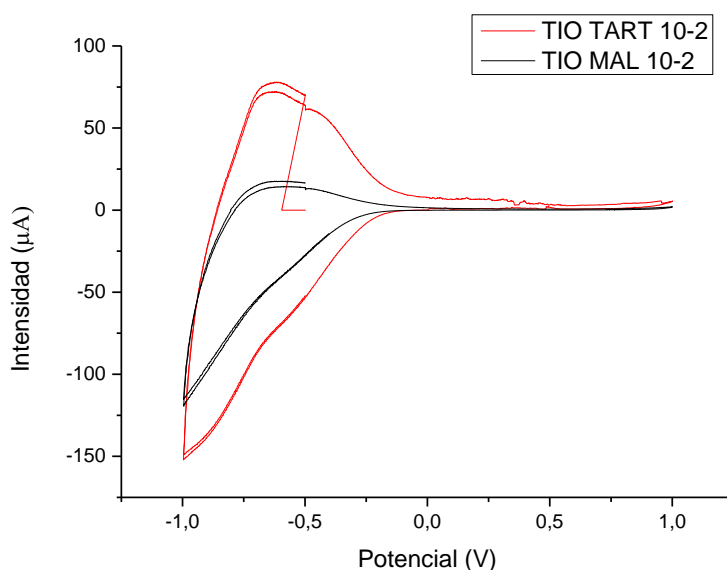


Imagen 121. Respuesta de los CPE's NANOTIO al ácido Tartárico 10^{-2} M (rojo) y ácido Málico 10^{-2} M (negro)

Como podemos observar en la imagen anterior, la intensidad que obtenemos en el ácido Tartárico es mucho mayor que para el ácido málico, en el pico de oxidación que se ve a potenciales negativos, con los electrodos con nanopartículas de dióxido

de Titanio, para una misma concentración, y observando el último ciclo del voltamograma, podemos ver como el pico de oxidación se localiza ligeramente a potenciales menos negativos para el tartárico que para el málico.

Así mismo, ocurre exactamente lo mismo en el pico de reducción a los mismos potenciales, sin embargo, cuando nos fijamos en el barrido que hace la señal desde el potencial nulo a potenciales negativos, se observa como la forma del voltamograma es ligeramente diferente, obteniendo lo que parece un pico en torno a $E = -0.5$ V para el ácido tartárico, que no detecta con el ácido málico. A potenciales positivos, podemos concluir que la intensidad que obtenemos para el ácido tartárico es mayor que para el málico.

Por tanto se puede decir, que nuestros electrodos de Carbono modificados con nanopartículas de TiO_2 , son capaces de detectar ácidos y discriminar entre ellos, ya que para dos ácidos distintos, en una misma concentración, obtenemos voltamogramas que pueden ser diferenciables.

A continuación se analizará el efecto de la modificación con nanopartículas para la detección de antioxidantes. Se analizará el comportamiento frente a compuestos como es el ácido Vanílico que está formado por radicales ácidos y fenólicos, con lo que además de ácido es un antioxidante.

Además se probaron la respuesta ante otros compuestos como Gálico y Vanílico como antioxidantes que poseen radicales ácidos al mismo tiempo, cuyas respuestas seguiré describiendo.

4.2.3. Respuesta ante los antioxidantes

El siguiente paso de la investigación fue determinar la respuesta de los electrodos ante los antioxidantes, para ello se ensayaron varios componentes, Vanílico, Gálico y Catecol, se intentará determinar si la adición de nanopartículas mejora la señal que en la detección de antioxidantes y de antioxidantes ácidos.

4.2.3.1. Respuesta al Ácido Vanílico

Uno de los compuestos que se han utilizado como antioxidante y ácido en la realización de mi proyecto ha sido el Vanílico de esta forma he podido confirmar los resultados obtenidos en la medición de ácidos como el tartárico y el málico, pero también avanzar con la detección de antioxidantes.

Para realizar los ensayos se ha describir primero las condiciones de estos, como se ha hecho en los casos anteriores:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia -0.5 V

- Potenciales extremos [-1,1] V
- Área del electrodo A = 1 cm²
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

La concentración que se preparó en este caso fue 10⁻² y posteriormente se realizaron diluciones de esta concentración y obtuvimos 10⁻³ M, 10⁻⁴ M y 10⁻⁵ M. Como se hizo en casos anteriores se comenzará a medir por la concentración más diluida y a continuación se aumentará la concentración de la disolución para medir con el mismo electrodo.

En este caso se presentarán los resultados de las cuatro concentraciones en un mismo gráfico para cada electrodo para poder comparar los efectos del aumento de la concentración del analito con cada pasta de nanopartículas. Empezaremos con el Carbono.

Del análisis del voltamograma que aparece a continuación en la *imagen 122* podemos obtener que a pesar de que la forma es parecida a la del Buffer fosfato pero con una intensidad de pico mayor en la reducción, en la oxidación observamos una señal plana. Al aumentar la concentración de Vanílico pasamos a 10⁻⁴ M, la señal que obtenemos tiene mucho ruido y comienza en oxidación a mostrar un pico propio de los fenoles. Si seguimos aumentando la concentración a 10⁻³ disminuye el ruido tenemos un pico más intenso que en casos anteriores, detecta más el carácter ácido del Vanílico, en la oxidación el pico se vuelve aún más intenso y más ancho, lo que sigue dándonos a entender que el electrodo de Carbono detecta el componente fenólico del analito. Por último hice una medición a 10⁻² M en color verde en la figura anterior se ve como es la más intensa tanto en la reducción como en la oxidación, además los ciclos se hacen más anchos.

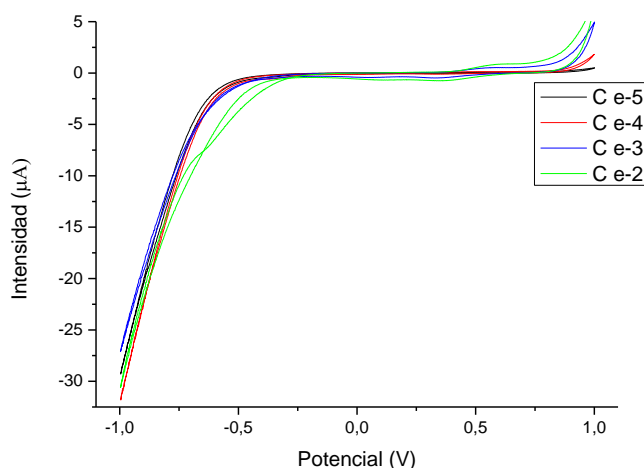


Imagen 122. Respuesta de los CPE's de Carbono al Vanílico en distintas concentraciones 10⁻⁵ M (negro) 10⁻⁴ (rojo) 10⁻³ (azul) y 10⁻² (verde) para el 5° ciclo

Así mismo, el pico en la oxidación, se traslada de potencial $E = 1V$ hacia potenciales menores, es decir hacia el pico de reducción, y al mismo el pico de reducción comienza cada vez a potenciales menos negativos. Es decir, los picos se van acercando al aumentar la concentración, pasamos de un $\Delta V = 2V$ a un $\Delta V = 1.8V$. Este comportamiento lo que nos dice es que el proceso es cada vez más reversible.

El siguiente ensayo que se realizó fue con los electrodos de Carbono modificados con Titanio, los resultados para el quinto ciclo de los voltamogramas son los que se muestran a continuación.

En la *imagen 123* comprobamos la respuesta de los sensores de Carbono modificados con partículas de Titanio ante distintas concentraciones de Vanílico, comenzamos comentando la señal negra que se corresponde a la composición más diluida del analito, esta se corresponde a una señal mucho más intensa que con el Buffer fosfato pero con un voltamograma plano, lo que quiere decir que el sensor no detecta ningún tipo de señal por parte de la disolución.

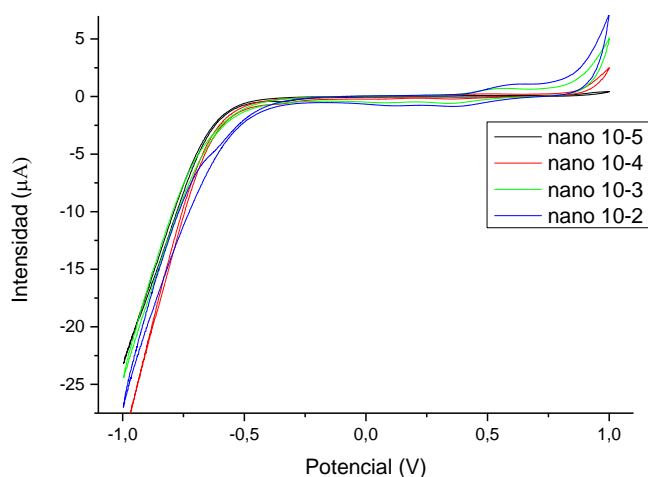


Imagen 123. Respuesta de los CPE's NANO al Vanílico en distintas concentraciones 10^{-5} (negro) 10^{-4} (rojo) 10^{-3} (verde) 10^{-2} (azul) para el 5° ciclo

Al aumentar la concentración a $10^{-4} M$ obtenemos una señal mucho más intensa tanto en reducción como en oxidación, e incluso en $E = 1V$ vemos como empieza a dejarse ver un pico intenso y menos fino que la señal que obtuvo con una concentración menor. Si pasamos a la concentración de $10^{-3} M$ seguimos teniendo una señal más intensa que la concentración más pequeña en la reducción y en la oxidación, en esta última parte del voltamograma obtenemos un pico más definido y mucho más intenso que en condiciones anteriores, además este se da a un potencial menor en $E = 0.8V$. Ya comienza a verse el aumento de la intensidad, así mismo en torno a $0.5V$ comienza a aumentar la intensidad de una forma que no lo hacía antes, lo que puede ser el inicio de un pico si se aumenta la concentración. Por último se aumenta la concentración hasta $10^{-2} M$ y como en los casos

anteriores, la intensidad aumenta en la reducción, y en la oxidación de una forma mucho más intensa que con anterioridad, no solo el pico es mucho más ancho e intenso, pero aparece un indicio de un segundo pico en torno $E=0.6\text{ V}$ en la oxidación y $E=0.45\text{ V}$ en la reducción. Además en los potenciales negativos la señal cambia de forma ligeramente.

Podemos concluir a partir de este ensayo, que efectivamente los electrodos NANO, no detectan de forma clara el componente ácidos, pero en cambio si detectan los componentes fenólicos que aparecen en el ácido Vanílico.

Además detecta estos fenoles de mejor forma que la pasta de Carbono solamente, esto lo podemos observar en que no solo el pico de oxidación en $E=1\text{ V}$ se vuelve cada vez más ancho e intenso, sino porque aparece un segundo pico que hasta ahora no habíamos podido observar en $E=0.6\text{ V}$ en la oxidación y $E=0.45\text{ V}$ en la reducción. Debido a que el primer pico se desplaza a la izquierda según se aumenta la concentración y como el segundo pico que aparece en esta concentración se ha movido hacia la derecha ligeramente respecto a la señal que se veía en la concentración de 10^{-3} M , esto indica que la reacción redox es más reversible con el aumento de la concentración.

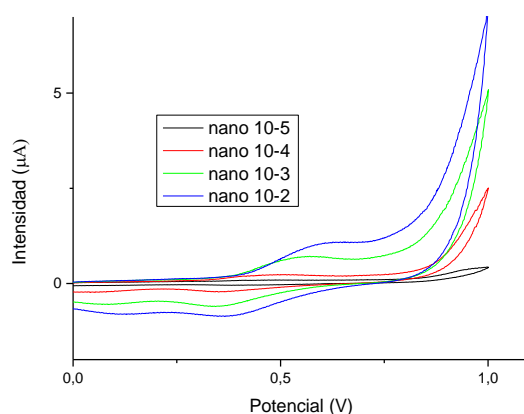


Imagen 124. Detalle de la respuesta de los CPE's NANO al Vanílico en distintas concentraciones 10^{-5} (negro) 10^{-4} (rojo) 10^{-3} (verde) 10^{-2} (azul) para el 5º ciclo

En la *imagen 124* vemos una ampliación de la zona de oxidación para identificar mejor los picos en esos potenciales, no solo eso, pero se observa como en torno a un potencial $E = 0.1\text{ V}$ parece que si aumentaremos la concentración encontraríamos la aparición de un nuevo pico.

Viendo como las nanopartículas de Titanio modifican las reacciones redox, se pasó a utilizar los electrodos de TiO_2 con objeto de ver dicho efecto con más claridad debido a su efecto catalítico. A continuación se muestran los resultados a la experimentación.

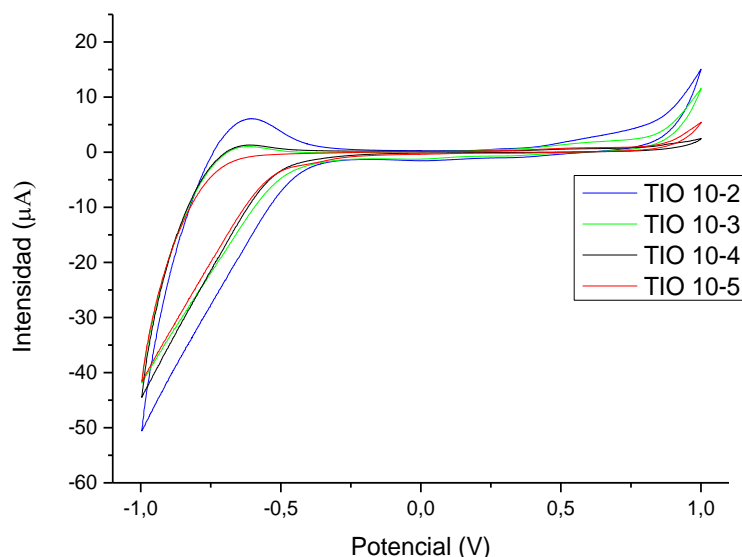


Imagen 125. Respuesta de los CPE's NANOTIO al Vanílico para distintas concentraciones 10^{-5} (rojo) 10^{-4} (negro) 10^{-3} (verde) y 10^{-2} (azul) para el 5° ciclo

Lo primero que podemos ver en este voltamograma es la alta repetitividad que nos ofrece el TiO_2 , no solo en una sola concentración, pero ante distintas concentraciones.

Como vemos el último ciclo de la medida en cada concentración son idénticos en la reducción, lo cual es una característica muy importante en un electrodo. Así mismo observamos como todos los ciclos presentan el pico en la oxidación en torno $E = -0.25 \text{ V}$ de los ácidos, este va creciendo en intensidad a la vez que la concentración de la disolución aumenta.

No obstante, cabe destacar que el pico obtenido característico de los ácidos no es tan intenso como en los casos del ácido Máfico o Tartárico y además aparece a otro potencial con lo cual nos permite decir que es capaz de distinguir entre los distintos ácidos analizados hasta el momento.

Dicha detección la realiza en la oxidación en torno $E = 1 \text{ V}$ tal y como se veía en el caso de las nanopartículas de Titanio, y del mismo modo que estas, el pico cada vez es más intenso y más grueso. Así mismo en $E = 0.6 \text{ V}$ comienza a verse un nuevo pico de oxidación y en $E = 0.45 \text{ V}$ uno en reducción.

Debido a que la intensidad del pico de reducción del TiO_2 (similar al proceso de reducción del agua) es mayor que en el caso de los sensores NANO no se puede apreciar bien la calidad de la detección de los fenoles.

Por ello se ha realizado un aumento en dicha zona que se puede ver en la *imagen 126* la aparición de los nuevos picos en la concentración más intensa en la que es

obvio que la reacción redox es cada vez más reversible, ya que los picos se juntan al aumentar la concentración.

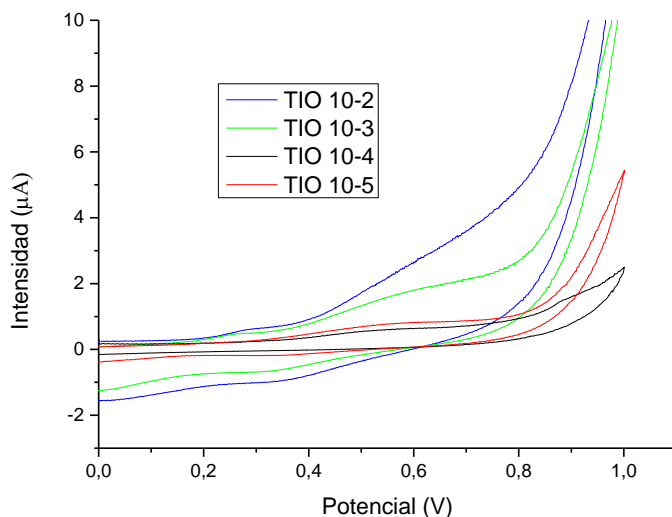


Imagen 126. Detalle de la respuesta de los CPE's NANOTIO al Vanílico en distintas concentraciones 10^{-5} (rojo) 10^{-4} (negro) 10^{-3} (verde) y 10^{-2} (azul) para el 5º ciclo

4.2.3.1.1 Límite de Detección Ácido Vanílico

Podemos calcular el límite de detección del ácido Vanílico para los electrodos modificados con nanopartículas de TiO_2 en este caso calculado para el pico de oxidación.

El procedimiento del límite de detección ha sido introducir el electrodo en la disolución menos concentrada 10^{-5} M e ir añadiendo la proporción de analito necesaria para aumentar la concentración en etapas. En este caso las concentraciones han sido 10^{-5} M \rightarrow 10^{-4} M \rightarrow 10^{-3} M \rightarrow 10^{-2} M. Se fueron guardando las respuestas y a continuación se elige un pico a estudiar en el límite de detección, en este caso he elegido el pico de oxidación a un potencial $E = 0.6$ V.

El límite de detección lo calcularemos como: $LOD (Vanílico NANOTIO) = \frac{3 \cdot SD}{m}$
 dónde:

SD: desviación típica de la intensidad de corriente para los tres últimos ciclos del electrodo en el blanco, para el potencial $E = 0.6$ V.

m: pendiente de la recta de calibración de la intensidad frente a la concentración, para todas las concentraciones elegidas, medidas en su último ciclo para el potencial $E = 0.6$ V

En la *Tabla 4* se presentan los valores utilizados para la determinación del parámetro SD

<u>CICLO</u>	<u>INTENSIDAD (μA)</u>
5	0.591
4	0.597
3	0.599
<u>Media</u>	<u>Desviación típica</u>
0.593	0.003785

Tabla 4. Valores de NANOTIO en la medición de Buffer Fosfato

A continuación se calcula la recta de calibración para el pico E= 0.6 V de las intensidades para cada concentración en el último ciclo de medida.

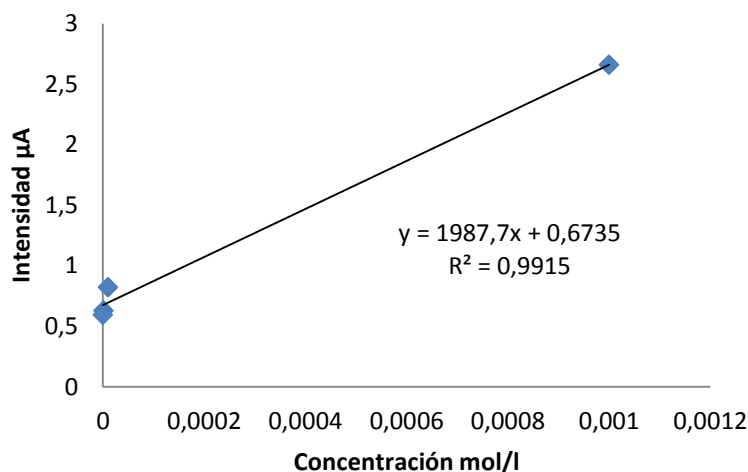


Imagen 127. Recta de calibración del límite de detección para el ácido Vanílico

Las concentraciones utilizadas para calcular el límite de detección no serán todas las que se ensayaron, sino simplemente las que aparecen a continuación

<u>CONCENTRACIÓN</u>	<u>INTENSIDAD (μA)</u>
10 ⁻⁵	0.629
10 ⁻⁴	0.822
10 ⁻²	2.66

Tabla 5. Valores obtenidos con los electrodos NANOTIO durante la medición en Ácido Vanílico

Por tanto, el límite de detección para el dióxido de Titanio en el ácido Vanílico sería igual a:

$$\text{LOD (NANOTIO Ácido Vanílico)} = \frac{3 \cdot \text{SD}}{m} = \frac{3 \cdot 0.003785}{1987.7} = 5.714 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Como se puede observar el límite de detección del ácido Vanílico para el pico de oxidación, los electrodos modificados a base de nanopartículas de dióxido de Titanio tienen un límite de detección de $5.714 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$, muy por debajo de las concentraciones que usualmente tienen de este componente vinos y mostos, y por tanto recomendable para su detección.

4.2.3.2. Respuesta al Ácido Gálico

La respuesta de los electrodos hacia el ácido gálico ha sido ensayada en la misma forma que todos los casos experimentales anteriores, los parámetros de ensayo que aplicaremos para este ensayo serán:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia - 0.5 V
- Potenciales extremos [-1,1] V
- Área del electrodo A = 1 cm²
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

El Ácido Gálico lo disolveremos en Buffer fosfato hasta conseguir una disolución de concentración 10^{-2} , a posteriori disolveremos esta para conseguir 10^{-3} Molar.

La primera fase de la experimentación comienza con 10^{-3} M ya que si midiéramos con la disolución más concentrada, los sensores ya no podrían determinar la concentración más baja sin ser recuperados con anterioridad. Así pues mediremos primero la concentración más diluida.

Comenzamos el análisis con los electrodos de pasta de Carbono los resultados que obtuve fueron los que aparecen a continuación

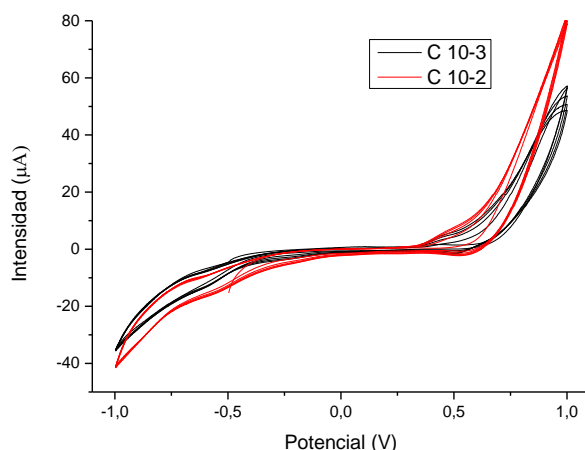


Imagen 127. Respuesta de los CPE's de Carbono al Gálico para una concentración 10^{-3} M (negro) y 10^{-2} (rojo)

Lo que podemos decir de este Voltamograma es la buena repetitividad de los electrodos en el ácido gálico, los ciclos a partir del primero son muy similares. Así mismo, la intensidad de los picos aumenta con la concentración de la disolución. En ambas concentraciones obtenemos un pico en reducción y en oxidación muy intenso y además en $E = -0.25$ V empieza a verse un pico en la reducción que aumenta su definición con el aumento de la concentración.

El siguiente paso fue la utilización de sensores NANO, cuyos resultados se pueden apreciar en la *imagen 128*

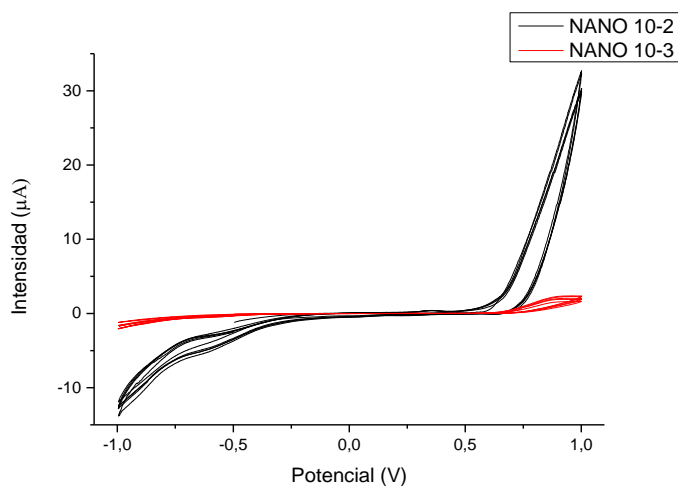


Imagen 128. Respuesta de los CPE's NANO ante el Gálico para dos concentraciones 10^{-3} M (rojo) y 10^{-2} M (negro)

Las conclusiones inmediatas de este ensayo están a la vista, al igual que los electrodos de carbono existe una buena repetitividad de los electrodos en ambas concentraciones, pero es mucho más evidente al cambio de intensidad de señal de una concentración a otra, aunque no de la misma magnitud que los sensores sin modificar.

Así mismo además de la oxidación y reacción en $E = -1V$ y $E = 1V$ respectivamente se obtiene en la reducción dos picos en $E = -0.25$ tal y como se detectaban con los sensores anteriores pero mucho menos intenso. Es por ello que se puede decir que estos electrodos no presentan grandes ventajas frente a los que no han sido modificados.

Por último se comprobó el efecto del Dióxido de Titanio en un antioxidante como el Gálico, los resultados que obtuve en la voltametría cíclica aparece en la *imagen 129*

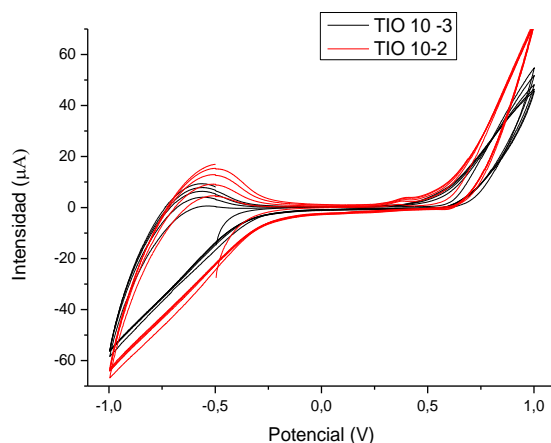


Imagen 129. Respuesta de los CPE's NANOTIO al Gálico para dos concentraciones $10^{-3} M$ (negro) y $10^{-2} M$ (rojo)

En ella se observa como no solo se detecta los compuestos fenólicos sino también los componentes ácidos presentes en la disolución de ácido Gálico, en los ensayos con los electrodos anteriores no se ha detectado este hecho porque como ya se comentó en el apartado de los ácidos, estos no responden igual de bien a como lo hacen los sensores modificados.

La respuesta ácida que se obtiene de este compuesto no es tan intensa como la del ácido Tartárico o Málico y la parte de la oxidación a potencial de $1V$ es mucho más intensa debido a la presencia de fenoles analito. Esta respuesta es el doble de intensa que para el caso de sensores modificados con nanopartículas de Titanio, lo cual quiere decir que esta modificación detecta mejor los antioxidantes.

Aunque no es tan intensa como con el Carbono, esto puede ser debido a la presencia del pico de reducción del ácido en $E = -1V$ que interfiere en la escala del

ensayo. Se puede observar que a medida que aumenta la concentración, tanto el pico característico del TiO_2 en presencia de un ácido como el correspondiente a los componentes fenólicos aumenta de intensidad.

Por último y si realizamos un detalle de la zona $E = 0.45 \text{ V}$, donde en el compuesto Vanílico detectábamos un indicio de un nuevo pico, detectamos el mismo fenómeno con el gálico cuando utilizamos sensores de TiO_2 , tal y como se muestra a continuación igualmente podemos observar un pequeño pico de reducción en torno a 0.6 V que se relaciona con la reducción de los componentes fenólico.

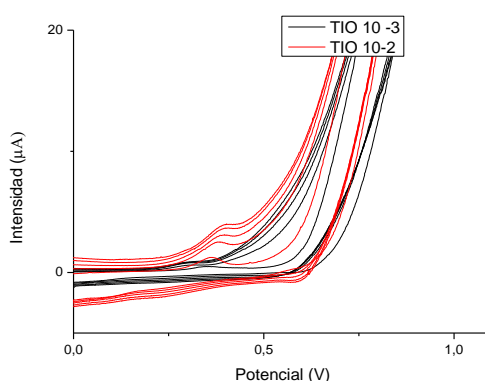


Imagen. 130 Detalle de la respuesta de los NANOTIO al Gálico para las concentraciones de 10^{-3} M (negro) y 10^{-2} M (rojo)

La aparición de este pico solamente con los sensores modificados de Carbono en la zona del voltamograma no afectada por la señal del ácido nos da a entender, que efectivamente, estos sensores son capaces de detectar antioxidantes fácilmente, y que la visualización de un pico de reducción en $E = -0.25 \text{ V}$ es debido efectivamente al carácter ácido del compuesto que por su alta intensidad enmascara la reducción del antioxidante.

Podemos concluir por tanto, que los tres electrodos son capaces de detectar antioxidantes, aunque la modificación con dióxido de Titanio es claramente beneficiosa. Pese a que los electrodos modificados con dióxido de carbono no muestran el pico en $E = -0.25 \text{ V}$ como los otros electrodos, esto es debido a que mide el carácter ácido del compuesto, el gran pico de reducción del ácido enmascara el del antioxidante. Por lo tanto podemos decir, que estos electrodos serán importantes en un uso ante un compuesto con mezclas en el que puedan detectar un ácido, y poder discriminar entre ellos, pero al mismo tiempo debido al efecto catalítico de las nanopartículas hacer reversible la reacción redox y detectar antioxidantes con una intensidad de corriente elevada.

No obstante, para comprobar este efecto catalítico de las nanopartículas utilizadas, objetivo principal de este proyecto, se decidió ensayar los sensores en un antioxidante en el que no existieran características ácidas, como es el Catecol, y se pudiera obtener información de la detección de antioxidantes exclusivamente.

4.2.3.3. Respuesta al Catecol

Debido a que como hemos comprobado en el caso anterior el carácter ácido de un compuesto antioxidante afecta a la hora de comparar los resultados de los electrodos en cuanto a su capacidad de detección antioxidantes al enmascarar posiblemente los picos de reducción-oxidación del antioxidante con los del ácido, se optó por ensayar un compuesto que no tuviera dicha naturaleza ácida, se eligió el Catecol uno de los compuestos fenólicos más importantes de vinos y mostos.

Para realizar los ensayos se ha describir primero las condiciones de estos, como se ha hecho en los casos anteriores:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0 V
- Potenciales extremos [-1,1] V
- Área del electrodo A = 1 cm²
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

La concentración que se preparó en este caso fue 10⁻² y posteriormente se realizaron diluciones de esta concentración y obtuvimos 10⁻³ M, 10⁻⁴ M y 10⁻⁵ M. Como se hizo en casos anteriores se comenzará a medir por la concentración más diluida y a continuación se aumentará la concentración de la disolución para medir con el mismo electrodo. Aunque en este trabajo solo se comentarán los resultados ante ciertas concentraciones

En este caso se presentarán los resultados de la *imagen 131* de las cuatro concentraciones en un mismo gráfico para cada electrodo para poder comparar los efectos del aumento de la concentración del analito con cada pasta de nanopartículas. Empezaremos con el Carbono.

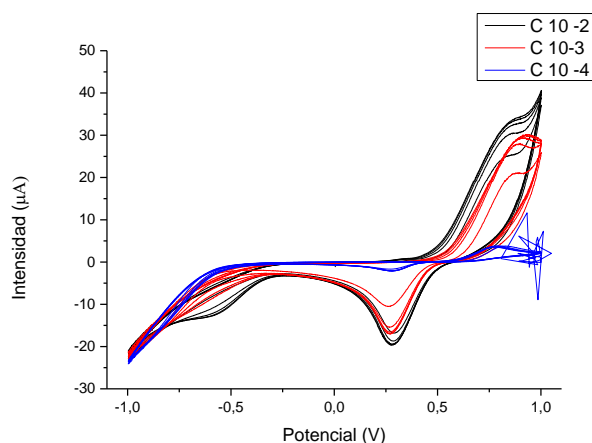


Imagen 131. Respuesta de los CPE's de Carbono ante el Catecol en concentraciones 10⁻⁴ (azul) 10⁻³ (rojo) y 10⁻² (negro)

En el voltamograma podemos apreciar como el aumento de la concentración de Catecol origina la aparición de nuevos picos y así mismo un incremento de la intensidad de estos.

Además el pico de oxidación localizado en $E = 0.75$ V y el de reducción localizado en $E = 0.25$ V se van aproximando con el aumento de la concentración lo que nos demuestra que mejora la reversibilidad de la reacción redox.

El aumento de la concentración además origina la aparición de un nuevo pico en la reducción en $E = -0.5$ V que con anterioridad no se detectaba. La repetitividad de los ciclos con el carbono es muy buena a excepción del primer ciclo, después de este los ciclos son idénticos.

Pasamos a medir la respuesta de los electrodos de Carbono modificados con nanopartículas de Titanio al Catecol, ante distintas concentraciones.

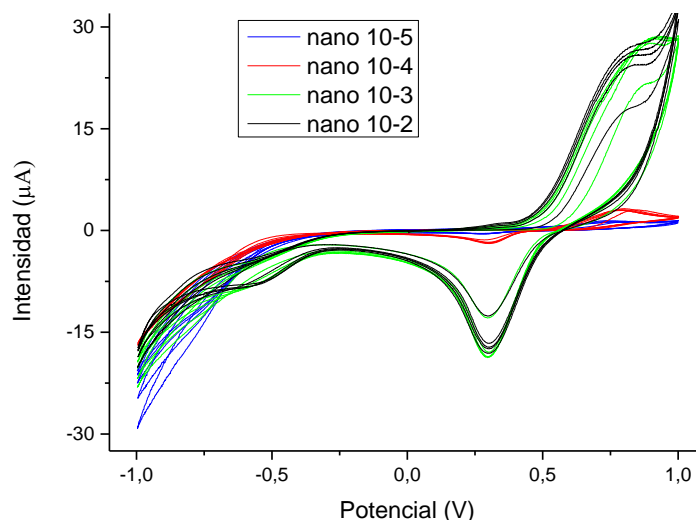


Imagen 132. Respuesta de los electrodos de Carbono modificados con nanopartículas de Titanio ante el Catecol en las concentraciones 10^{-5} M (azul) 10^{-4} (rojo) 10^{-3} (verde) y 10^{-2} (negro)

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron similares a los obtenidos con los electrodos de Carbono, salvo que los electrodos modificados con nanopartículas son capaces de detectar el pico de reducción y oxidación a potenciales positivos a concentraciones más bajas que los electrodos sin modificar.

La intensidad de los picos es de la misma magnitud, y la repetitividad de los ciclos es del mismo nivel. También se observa la mejora en la reacción redox, debido a la aproximación de los picos $E = 0.75$ V y $E = -0.5$ V al de potencial 0.25V.

Por último se utilizaron los sensores de TiO_2 en la detección del Catecol, los resultados que se obtuvieron aparecen en la *imagen 133*

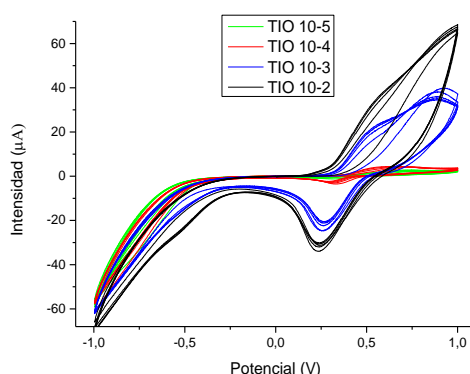


Imagen 133. Respuesta de los electrodos de Carbono modificados con nanopartículas de TiO_2 al Catecol en las concentraciones 10^{-5} M (verde) 10^{-4} M (rojo) 10^{-3} M (azul) y 10^{-2} M (negro)

Es evidente en el diagrama como el aumento de la concentración conlleva las mismas características que en los casos anteriores, picos más intensos y que se desplazan de forma que están cada vez más juntos. La repetitividad de los ciclos es muy buena y tan solo en concentraciones altas existen diferencias entre los primeros y los últimos ciclos. Los picos de reducción que obtenemos están en $E = -0.25$ V y en la concentración más alta, empieza a intuirse otro en $E = -0.5$ V. En cuanto a la oxidación se obtiene uno en $E = 0.5$ V y en la concentración de 10^{-3} parece intuirse un segundo pico en torno a $E = 0.75$ V. La aproximación de los ciclos muestra la mejora en la repetitividad del electrodo.

Podemos mostrar mejor la variación de la intensidad de los picos con la concentración, comparando el último ciclo de las concentraciones mayores. Se observa la pérdida del segundo pico de oxidación en $E = 0.75$ V en el aumento de concentración en el siguiente voltamograma, y la aparición de un ciclo en $E = -0.25$ V en el quinto ciclo de la mayor concentración.

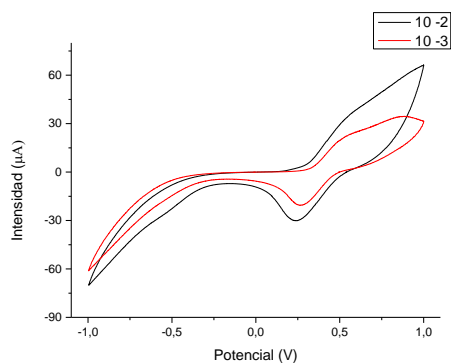


Imagen 134. Respuesta de los electrodos NANOTIO al Catecol para concentración 10^{-2} M (negro) y 10^{-3} M (rojo) para el 5º ciclo

Por último podemos estudiar la modificación de los voltamogramas con los ciclos, a continuación se muestra el 1er ciclo, el 4º y 5º ciclo de la concentración de 10^{-3} M en los sensores modificados con nanopartículas de dióxido de titanio.

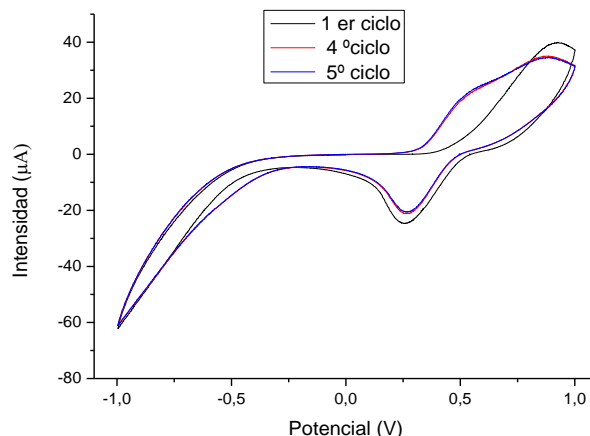


Imagen 135. Respuesta de los electrodos NANOTIO al Catecol en el 1er ciclo (negro) 4º ciclo (rojo) y 5º ciclo (azul) para la concentración 10^{-2} M

Podemos observar como el primer ciclo presenta en $E = 0.9$ V una especie de pico que con el aumento de los ciclos desaparece y cuando llegamos al 4º y 5º ciclo, no solo baja de intensidad, contrariamente a la respuestas de los electrodos, si no que comienza a desaparecer y aparece otro en $E = 0.5$ V. Lo mismo ocurre con el pico de $E = 0.25$ V en reducción que disminuye de intensidad con el paso de los ciclos. Esto puede explicarse teniendo en cuenta el proceso de dimerización del Catecol, especialmente importante para altas concentraciones. En el primer ciclo no hay dimerización y sólo se observa un pico de oxidación pero en los siguientes aparece los picos característicos del dímero a potenciales menos positivos que llegan incluso a tener más intensidad que los del monómero.

Se revisó en profundidad la bibliografía referente a voltametría cíclica en Catecol descubriendo el fenómeno descrito en el párrafo anterior. Las referencias bibliográficas indican [72], que los picos que obteníamos en los ensayos estaban relacionados a la dimerización del Catecol. Los picos que desaparecen o disminuyen en intensidad con el paso de los ciclos son los asociados al monómero, de forma que cuando esto ocurre, los del dímero comienzan a aumentar en intensidad. Según la última información podemos identificar el pico de $E = 0.25$ V en reducción como un pico del monómero junto al pico en $E = 0.9$ V en la oxidación, y así mismo identificar en $E = 0.5$ V en oxidación y $E = -0.5$ V en reducción como picos debidos al dímero.

Este fenómeno se puede apreciar igualmente en una concentración 10^{-4} M, en donde se han representado en primer y cuarto ciclo, se ve como en este último

barrido, ha disminuido la intensidad del pico en reducción y ha aparecido uno nuevo en la oxidación en torno a $E = 0.5$ V. *Imagen 136*.

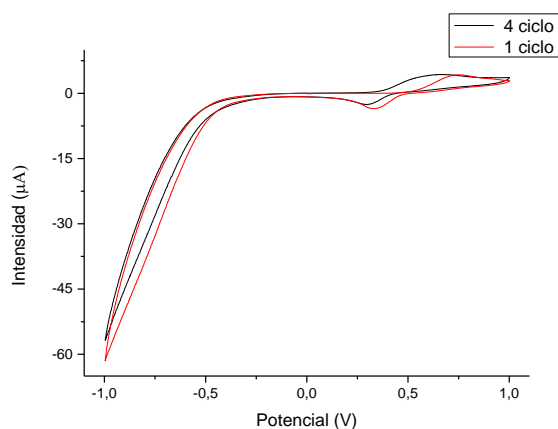


Imagen 136. Respuesta de los NANOTIO en el 4º (negro) y 1er (rojo) ciclo al Catecol para la concentración 10^{-4} M

Realizamos lo mismo para la concentración más baja (*imagen 136*), y los resultados que obtenemos son similares, disminución de la intensidad del pico de la reducción asociado al monómero y aumento de la intensidad del dímero en $E = 0.5$ V. Los sensores modificados con nanopartículas de TiO_2 no sólo son capaces de detectar este fenómeno sino que son capaces de hacerlo a concentraciones tan bajas como 10^{-5} M en las que los electrodos sin modificar eran casi incapaces de detectar una señal de los monómeros con esta intensidad.

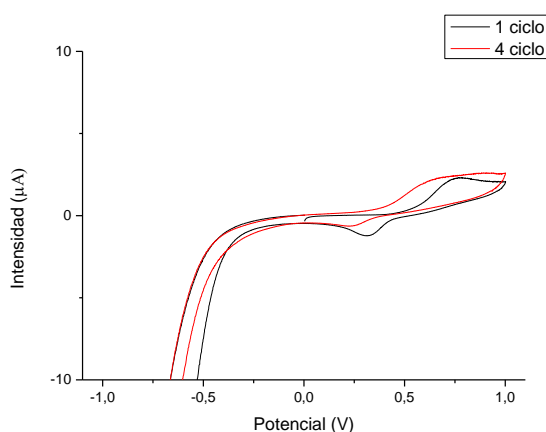


Imagen 137. Respuesta de los electrodos NANOTIO ante el Catecol 10^{-4} M para el 1er (negro) y 4º ciclo (rojo)

Podemos concluir que los electrodos modificados con nanopartículas de TiO_2 , gracias a su efecto catalizador son capaces de detectar las reacciones redox que

sucedan en un medio como el Catecol, compuesto desoxidante, con una mayor intensidad en los picos y una mayor reversibilidad a concentraciones mucho menores que los electrodos sin modificar (electrodos de Carbono) o modificados solo con nanopartículas de Titanio en suspensión de aceite. Así mismo, estos electrodos son capaces de discriminar en el proceso de dimerización del Catecol y mostrarnos, la desaparición del monómero y la aparición del dímero. Por otra parte los resultados han evidenciado que no aparecen los picos de oxidación y reducción a potenciales negativos que se habían atribuido al carácter ácido de los otros antioxidantes.

4.2.3.3.1 Comparativa entre electrodos

Para finalizar con el Catecol se muestra a continuación una comparativa entre los electrodos de Carbono y los electrodos modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio, para la disolución más concentrada, 10^{-2} M, en la figura solamente se muestra el último ciclo de cada ensayo:

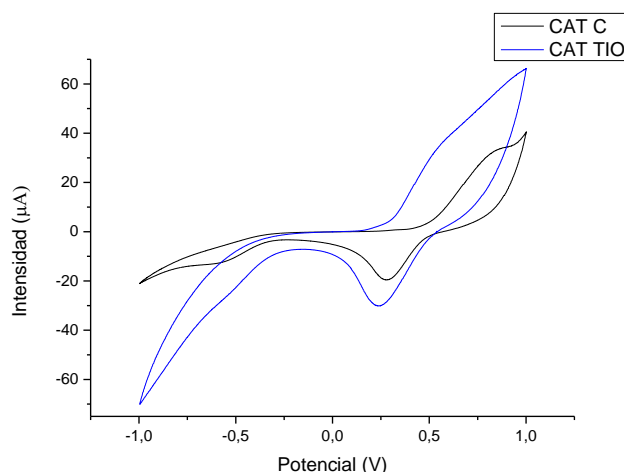


Imagen 138. Comparativa de la respuesta de los CPE'S de Carbono (negro) y los NANOTIO (azul) ante el Catecol en una concentración 10^{-2} M en el 5º ciclo

En el voltamograma de la figura comparativa entre Carbono y TiO_2 podemos observar como la intensidad de la señal es mucho mayor para los electrodos modificados. Así mismo el potencial al que se presenta el pico de oxidación del Catecol en los NANOTIO está desplazado hacia la izquierda considerablemente, acercándose así al pico de reducción, lo cual nos muestra la mejor reversibilidad de la redacción redox en los sensores modificados que para los de pasta de Carbono. La diferencia de potencial entre el pico de oxidación ($E=0.75$ V) y el de reducción en el Carbono ($E=0.3$ V) es de $\Delta V=0.45$ V, mientras que para el dióxido de Titanio esta diferencia es $\Delta V= 0.5 - 0.25 = 0.25$ V.

Si analizamos así mismo la diferencia entre el primer y quinto ciclo para ambos electrodos obtenemos la siguiente comparativa:

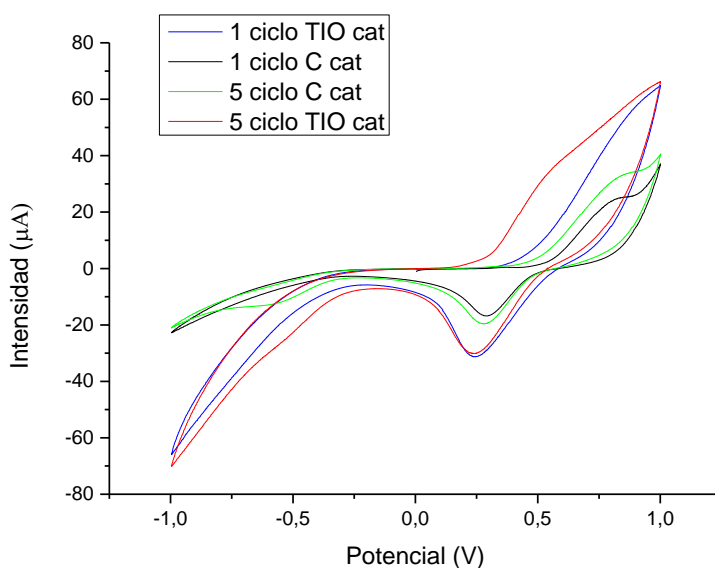


Imagen 139. Comparativa entre los CPE's de Carbono (negro) y NANOTIO (azul) para el 1er ciclo y para el Carbono (verde) y el NANOTIO (rojo) para el 5º ciclo

La conclusión que obtenemos es que para el Carbono, tanto el pico de reducción como el de oxidación aumentan de intensidad con el paso de los ciclos, mientras que para el dióxido de Titanio, en la oxidación aumenta la intensidad del pico, al igual que en el pico característico de la reducción del TiO_2 , mientras que el de reducción se mantiene a la misma intensidad aunque en cualquier caso los electrodos modificados con dióxido de titanio tienen señales más intensas y más reversibles que sin modificar para cualquiera de los ciclos del voltamograma.

4.2.3.3.2 Límite de detección Carbono

Podemos calcular el límite de detección del Catecol para los electrodos de pasta de Carbono. El procedimiento del límite de detección ha sido el mismo que para el Vanílico. Se fueron guardando las respuestas y a continuación se elige un pico a estudiar en el límite de detección, en este caso he elegido el pico de reducción a un potencial $E = 0.25 \text{ V}$.

El límite de detección lo calcularemos como: $LOD (CAT \text{ Carbono}) = \frac{3 \cdot SD}{m}$ dónde:

SD: desviación típica de la intensidad de corriente para los tres últimos ciclos del electrodo en el blanco, para el potencial $E = 0.25 \text{ V}$.

m: pendiente de la recta de calibración de la intensidad frente a la concentración, para todas las concentraciones elegidas, medidas en su último ciclo para el potencial E= 0.25 V

Podemos observar los resultados del ajuste del límite de detección en el *gráfico 1*

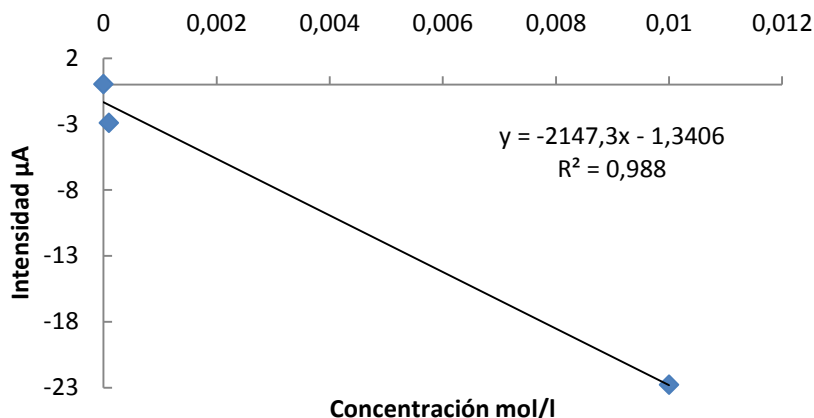


Gráfico 1. Límite de detección para los electrodos de Carbono en Catecol

Por tanto, el límite de detección de los electrodos de pasta de Carbono ante el Catecol:

$$LOD (CARBONO CAT) = \frac{3 \cdot SD}{m} = \frac{3 \cdot 0.00220}{2147.3} = 3.0850 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Como se puede observar el límite de detección del Catecol para el pico de reducción, los electrodos de pasta de Carbono tienen un límite de detección de $3.0850 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$

4.2.3.3.3 Límite de detección TiO₂

Podemos calcular el límite de detección del Catecol para los electrodos de pasta de Carbono modificados con dióxido de Titanio. El procedimiento del límite de detección ha sido el mismo que para el Vanílico. Se fueron guardando las respuestas y a continuación se elige un pico a estudiar en el límite de detección, en este caso he elegido el pico de reducción a un potencial E = 0.25 V.

El límite de detección lo calcularemos como: $LOD (CAT TIO) = \frac{3 \cdot SD}{m}$ dónde:

SD: desviación típica de la intensidad de corriente para los tres últimos ciclos del electrodo en el blanco, para el potencial E= 0.25 V.

m: pendiente de la recta de calibración de la intensidad frente a la concentración, para todas las concentraciones elegidas, medidas en su último ciclo para el potencial E= 0.25 V

Podemos ver en el *gráfico 2* los resultados del límite de detección

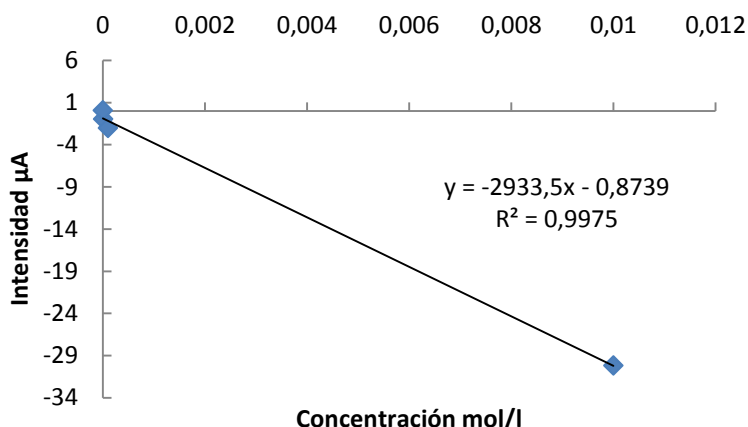


Gráfico 2. Límite de detección de los CPE's NANOTIO en Catecol

Por tanto, el límite de detección de los electrodos de pasta de Carbono modificados con TiO₂ ante el Catecol es:

$$\text{LOD (NANOTIO CAT)} = \frac{3 \cdot \text{SD}}{m} = \frac{3 \cdot 0.001021}{2933.5} = 1.0453 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Como se puede observar el límite de detección del Catecol para el pico de reducción, los electrodos de pasta de Carbono modificados con TiO₂ tienen un límite de detección de 1.0453 10⁻⁶ mol/l.

Como se puede observar el límite de detección mejora con la adicción de nanopartículas de TiO₂ tal y como se ve en el aumento del coeficiente R de regresión lineal que pasa de 0.988 a 0.9975 y disminuye el LOD veces respecto al Carbono.

4.2.3.4. Respuesta al pirogalol

Se decidió por último ensayar un antioxidante como el pirogalol para poder comparar las respuestas de los electrodos ante antioxidantes varios y de distinto origen.

Para realizar los ensayos se ha de describir primero las condiciones de estos, como se ha hecho en los casos anteriores:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0 V
- Potenciales extremos [-0.6,1] V
- Área del electrodo $A = 1 \text{ cm}^2$
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

Para empezar los ensayos se probaron los electrodos de Carbono en las disoluciones de pirogalol para distintas concentraciones, para el quinto ciclo los resultados obtenidos en los ensayos son los siguientes:

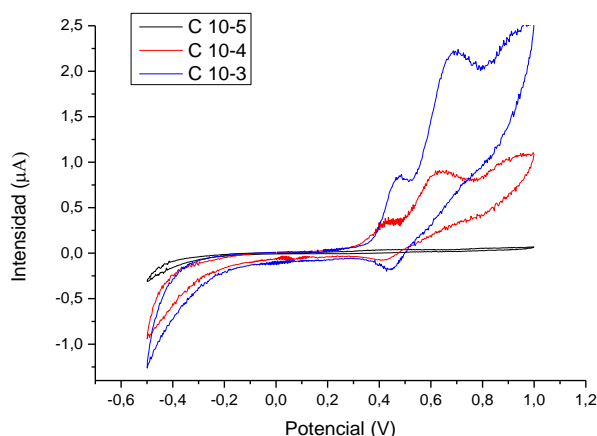


Imagen 140. Comparación de la respuesta para los CPE's de Carbono para distintas concentraciones 10^{-5} (negro) 10^{-4} (rojo) y 10^{-3} (azul) para el 5º ciclo en Pirogalol

En el voltamograma de la *imagen 140* podemos observar el crecimiento de la intensidad de los picos de oxidación y reducción con el aumento de concentración. Los picos de oxidación que obtenemos se sitúan en $E = 0.5 \text{ V}$ y $E = 0.6 \text{ V}$ mientras que en la reducción obtenemos un pico a $E = 0.4 \text{ V}$. Vemos como al aumentar la intensidad el ciclo de potencial $E = 0.5 \text{ V}$ se va desplazando hacia la derecha con el aumento de la concentración y de igual manera sucede, pero en menor medida con el segundo pico de oxidación. La diferencia de potencial es $E = -0.2 \text{ V}$ mientras que para el Catecol el potencial entre picos era $E = 0.25 \text{ V}$, es decir, los picos de oxidación del pirogalol están más próximos que los del Catecol. En la Reducción el pico que tenemos en $E = 0.4 \text{ V}$ se desplaza hacia la derecha con el aumento de la concentración.

Con objeto de observar las variaciones que experimenta la señal con los sucesivos ciclos la figura muestra los tres últimos ciclos registrados en el electrodo de pasta

de carbono. A diferencia de lo expuesto en el caso del Catecol, donde uno de los picos aumentaba de intensidad mientras el otro disminuía, se observa que en este caso ambos picos disminuyen de intensidad ligeramente al ciclar. Esto indica que no se trata de un proceso de dimerización sino que son dos reacciones de oxidación diferentes las detectadas en el voltamograma.

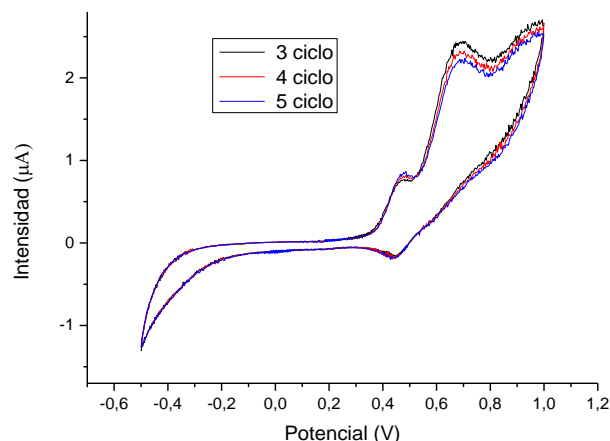


Imagen 141. Comparación de respuesta para los CPE's de Carbono para 10^{-2} M en el 3er ciclo (negro) 4º ciclo (rojo) y 5º ciclo (azul)

Después de obtener la señal con los sensores de Carbono, se ensayaron los modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio, los resultados que se obtuvieron cuando los electrodos se introducen en pirogalol en concentraciones 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , siempre de la más diluida a la más concentrada, son los siguientes para el quinto ciclo:

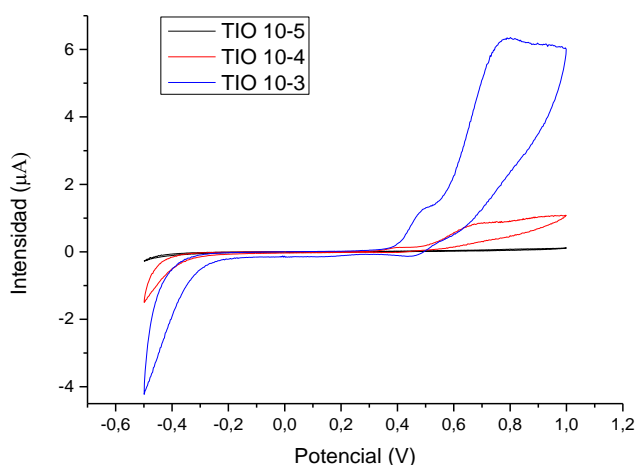


Imagen 142. Comparación de la respuesta de los CPE's NANOTIO para las concentraciones 10^{-5} (negro) 10^{-4} (rojo) y 10^{-3} (azul) para el Pirogalol

Podemos observar en la respuesta de los electrodos, es la aparición de los mismos picos en oxidación y reducción que detectábamos con el Carbono, pero debido al pico de reducción del agua característico de estos electrodos, que hacen que perdamos la escala en las zonas que nos interesan como el pico de reducción en $E = 0.4$ V.

Podemos observar como igualmente que con el Carbono, la intensidad de los picos aumenta con el aumento de las concentraciones y obtenemos la oxidación para potenciales de 0.5 V y 0.7 V. A diferencia del Carbono, con el dióxido de Titanio el aumento de la intensidad de los picos de oxidación conlleva no solo un desplazamiento hacia la derecha pero un aproximamiento de los picos. Para una concentración de 10^{-4} tenemos la oxidación en $E = 0.4$ V y $E = 0.65$ V mientras que para una concentración mayor 10^{-3} los picos aparecen en $E = 0.5$ V y $E = 0.7$ V es decir los picos se han acercado una diferencia de potencial de 0.05 V. Como conclusión final a este resultado podemos ver como la intensidad de la señal que se obtiene en el segundo pico a intensidades positivas es tres veces más intenso que con los electrodos de pasta de Carbono. Por último se observa como en torno a $E = 0.7$ V en la reducción comienza a verse lo que parece un tercer pico para la disolución más concentrada y otro a $E = 0.5$.

Al igual que con los sensores sin modificar, a continuación se muestra un gráfico comparativo con la respuesta de los sensores en este caso entre el primer y quinto ciclo:

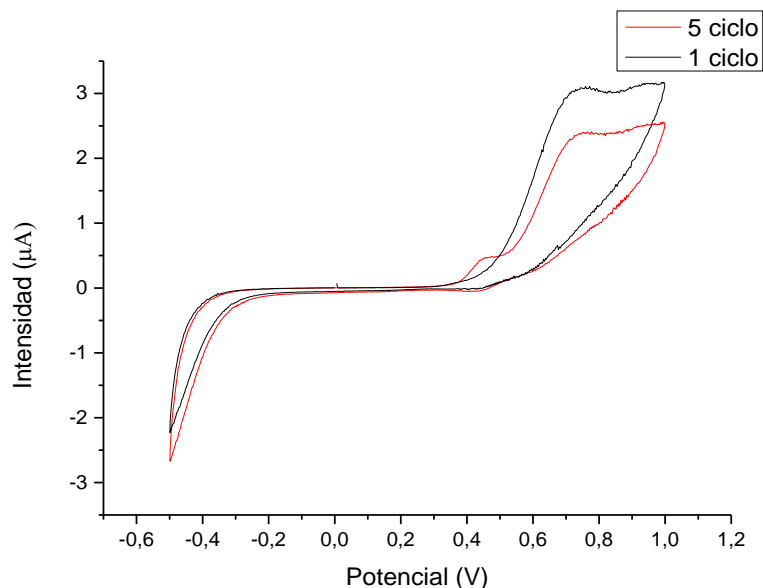


Imagen 143. Respuesta al Pirogalol de los CPE'S en una concentración 10^{-2} M para el 1er ciclo (negro) y ara el 5º ciclo (rojo)

A la luz de los resultados obtenidos podemos observar como la intensidad de los picos disminuye con el paso de los ciclos en la oxidación, pero en este caso si que

se observa que hay fenómenos de la dimerización; el segundo pico de oxidación a potenciales más bajos se observa sólo en el quinto ciclo y a la vez se observa una disminución de intensidad del pico a potenciales más altos. Esto indica que en el primer ciclo el Pirogalol pasa a la forma quinoide y en ciclos sucesivos es esta forma quinoide la que se oxida y reduce además del monómero.

Podemos concluir por tanto, que los electrodos modificados con dióxido de Titanio son capaces de detectar claramente y con una señal voltamétrica característica la presencia de Pirogalol siendo capaz de detectar los procesos de oxidación y reducción del monómero y del dímero cosa que no se observa con el electrodo de pasta de carbono. La intensidad de los picos disminuye con el avance de los ciclos para ambos electrodos. Si nos fijamos en los picos de oxidación y reducción, para los electrodos TIO podemos observar como la distancia entre los picos disminuye con el paso de los ciclos, no obstante se observa como en los resultados obtenidos con los sensores modificados aparece lo que se intuye como un tercer pico en la reducción a un potencial $E=0.7$ V que con los sensores de Carbono no aparecía.

4.3.4.1. Comparativa entre electrodos

A continuación se muestra una comparativa entre las señales obtenidas en la medición de Pirogalol en una concentración de 10^{-3} M para los electrodos de pasta de Carbono y los electrodos modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio.

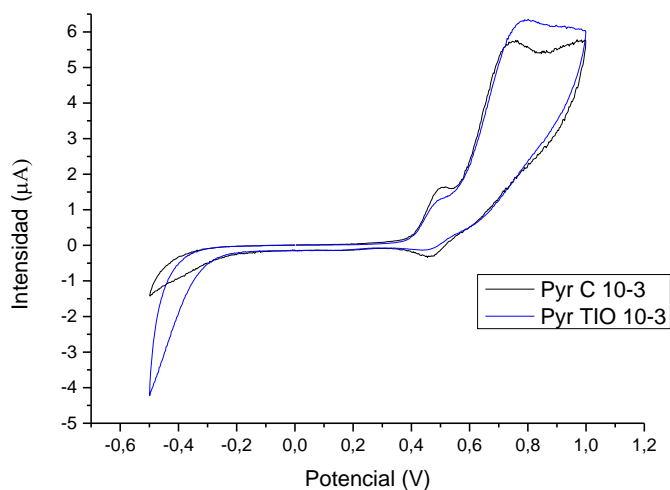


Imagen 144. Comparación entre la respuesta obtenida con los electrodos de Carbono (negro) para una concentración 10^{-3} M y NANOTIO (azul) para el Pirogalol

En la *imagen 144* se observa como las intensidades de nuevo son mucho mayores cuando se utilizan electrodos modificados lo que nos indica que es las

nanopartículas de dióxido de titanio ejercen el efecto electrocatalítico deseado también en el Pirogalol. Con ambos electrodos obtenemos los mismos picos de señal potenciales muy similares, lo que nos da a entender que no existen diferencias en la detección de las reacciones redox que suceden en el ensayo.

4.2.3.5. Comparativa señal antioxidantes para el TiO_2

Al igual que para los ácidos se puede realizar una comparativa de señales obtenidas con el dióxido de Titanio para cada antioxidante, con el objetivo de determinar si los electrodos son selectivos a la hora de medir antioxidantes, para ello a continuación se presenta en la *imagen 145* la comparación para el último ciclo de cada antioxidante para los electrodos NANOTIO para una concentración de 10^{-3} M

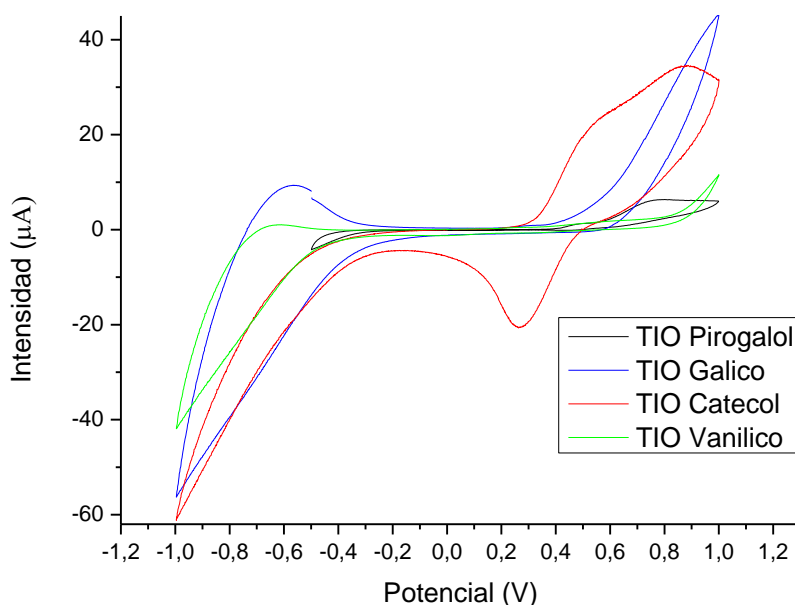


Imagen 145. Comparativa de los NANOTIO para cada antioxidante, Pirogalol (negro) Gálico (azul), Catecol (rojo) y Vanílico (verde)

En la imagen anterior podemos ver como existen diferencias entre cada antioxidante medido con los electrodos modificados con nanopartículas de TiO_2 . Considerando la diferente morfología de las curvas se observa que la señal voltamétrica es característica de cada electrodo. Así mismo vemos como en oxidación, cada antioxidante presenta una forma distinta para un mismo electrodo, para el Gálico obtenemos un pico de gran intensidad y más estrecho, mientras que para el Vanílico es mucho menos intenso y estrecho, por último para el Catecol y

Pirogalol son picos más intensos y anchos. El pico de los ácidos característico en oxidación es sólo visible para el ácido gálico.

Si nos fijamos en los potenciales positivos en el barrido de reducción, podemos observar como la forma de la reducción de cada analito es distinta para la misma concentración y el mismo electrodo, incluso en algunos antioxidantes obtenemos un mayor número de que para otros. El antioxidante más diferente de los ensayados es el Catecol, el cual presenta un pico en $E = 0.3 \text{ V}$ característico en reducción para este analito analizado con NANOTIO, mientras que el resto de antioxidantes no presentan dicho pico de reducción porque no son tan intensos y quedan enmascarados en esta escala.

En cuanto a la oxidación, se observa como la forma de los picos y las intensidades son distintas, el pico más intenso se obtiene para el Gálico con un intensidad mayor de $40 \mu\text{A}$, y el siguiente es el Catecol con una intensidad de entorno $30 \mu\text{A}$, mientras que tanto el ácido Vanílico como el Pirogalol presentan una intensidad mucho menor en torno a $10 \mu\text{A}$ ambos.

Tanto para el Ácido Gálico como para el ácido Vanílico el pico más intenso que se obtiene en la oxidación se localiza a un potencial de $E = 1 \text{ V}$, mientras que para el Pirogalol como para el Catecol, se obtienen picos más intensos en torno a $E = 0.8 \text{ V}$, esto puede ser explicado debido a que nuestros electrodos son capaces de detectar no solo la señal antioxidante del Gálico y el Vanílico si no que detectan también su carácter ácido, teniendo así un voltamograma que nos muestra ambas características del compuesto de forma que, su señal es muy diferente a la de los antioxidantes como Catecol o Pirogalol.

No obstante, podemos ver como el Catecol posee unos picos más anchos que con el pirogalol, además de presentar un segundo pico de oxidación en $E = 0.3 \text{ V}$ de gran intensidad, de forma que, podemos distinguir ambos compuestos en una medición.

Por tanto podemos decir que los electrodos de pasta de Carbono modificados con nanopartículas de Dióxido de Titanio, son capaces de diferenciar entre antioxidantes, e incluso cuando se miden compuestos con características ácidas y antioxidantes al mismo tiempo. Se puede discriminar en la detección de compuestos, mediante la localización de los picos de oxidación y reducción que se obtienen en las voltametrías cíclicas, e incluso mediante la forma de dichos picos.

Cabe preguntarse, si los sensores modificados con material biológico como las enzimas mejorarán los resultados obtenidos hasta el momento con estos electrodos. Es por ello que se realizaron ensayos al respecto para poder determinar si se podrían obtener mejores medidas modificando los electrodos con enzimas y nanopartículas para obtener Biosensores cuyo comportamiento se analiza en el siguiente apartado.

4.3. Respuesta electroquímica de los biosensores

Una vez que se ha comprobado que los electrodos modificados mejoraban las señales en la medición de analitos frente a electrodos no modificados, se decidió estudiar el efecto de la modificación de sensores con enzimas y estudiar la variación en los resultados. Se esperaba una mejora de los resultados en medición de azúcares y antioxidantes, compuestos que habitualmente habían sido detectados más eficazmente con biosensores dentro de los trabajos realizados por el grupo de investigación en el que he realizado mi proyecto.

4.3.1. Respuesta a la Glucosa

Como paso previo a la fabricación de sensores se realizaron ensayos de nuestros electrodos modificados y sin modificar pero todos ellos sin enzimas para detectar glucosa. La glucosa es uno de los componentes principales del mosto y forma parte de los componentes tipo azúcar del mismo. Es un compuesto difícil de medir, por su naturaleza, con electrodos que no hayan sido modificados según experimentaciones anteriores en UvaSens.

Debido a los buenos resultados obtenidos del TiO_2 ante los compuestos anteriores en comparación a los electrodos de Carbono, se da un paso adelante en los azúcares y se ensayan los electrodos modificados con dióxido de Titanio en Glucosa, sin la adición de ningún componente biológico, se trata de ver si el efecto catalítico de las nanopartículas es suficiente para detectar azúcares.

Para realizar los ensayos se ha de describir primero las condiciones de estos, como se ha hecho en los casos anteriores:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0 V
- Potenciales extremos [-0.6,0.1] V
- Área del electrodo A = 1 cm²
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

La concentración en la que se medirá la glucosa es 20 mM siendo esta una concentración usual en el grupo de sensores en el que he trabajado y por consiguiente era una referencia a la hora de comparar resultados con experimentos anteriores.

Los resultados obtenidos se muestran en el voltamograma de la *imagen 146* se ensayaron así mismo los electrodos sin modificar y los sensores NANO con objeto de comparar la señal de cada electrodo.

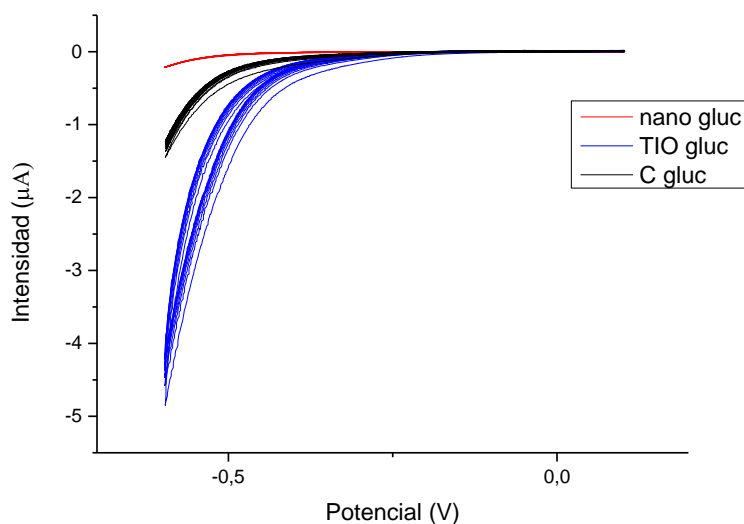


Imagen 146. Comparación de la respuesta ante la glucosa de los CPE's de Carbono (negro) NANO (rojo) y NANOTIO (azul) para una concentración 20 mM

En los resultados anteriores observamos como la señal más intensa que obtenemos es la de los sensores NANOTIO. Otra conclusión que podemos extraer de este ensayo es que las nanopartículas de Titanio por sí solas nos dan una intensidad muy pequeña, mucho menor incluso que cuando se ciclaron en blanco, esto nos da a entender que no son capaces de medir glucosa. Aunque teniendo en cuenta el voltamograma anterior ninguno de los tres electrodos nos detecta picos exclusivos para la glucosa en los ensayos.

Ante estos resultados se decidió pasar directamente a la utilización de biosensores en la detección de la glucosa, y realizar ensayos de cinéticas químicas y límites de detección solamente con electrodos de Carbono y modificados con TiO_2

El objetivo principal que se marcó fue mejorar la detección de la glucosa, con la que no se habían obtenido resultados satisfactorios, lo cual es lógico ya que los enzimas son necesarios en cualquier tipo de electrodo para detectar glucosa. Para ello se eligió la Glucosa Oxidasa como enzima para la creación de sensores, en una concentración 5 mg/ml y con un proceso de cross-linking en para la inmovilización de esta al sensor.

El procedimiento de fabricación de los viales con enzimas necesarios para la modificación de los sensores, como la creación de los biosensores ha sido descrita durante el capítulo experimental de este proyecto y por tanto en este apartado me limitaré a presentar los resultados obtenidos.

4.3.2. Respuesta ante la glucosa con GOX

Los sensores tanto de Carbono como de TiO_2 fueron preparados mediante cross-linking con enzima glucosa oxidasa de la misma forma, y se midió glucosa en varias concentraciones.

Para realizar los ensayos se ha descrito primero las condiciones de estos, como se ha hecho en los casos anteriores:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0 V
- Potenciales extremos [-0.6,0.1] V
- Área del electrodo $A = 1 \text{ cm}^2$
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el Carbono en dos concentraciones 20 mM y $20 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

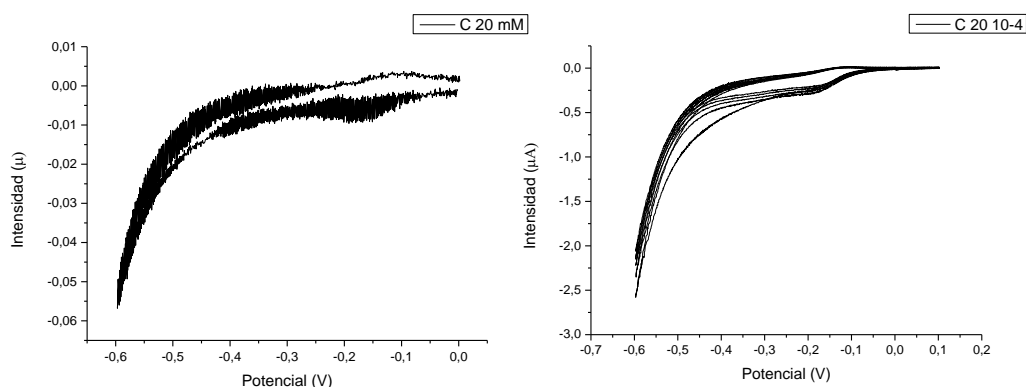


Imagen 147. Comparación de los resultados para el Carbono para concentraciones 20 mM (izquierda) y $20 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (derecha) en la detección de Glucosa con GOX

Lo primero que llama la atención de la respuesta ante la disolución más concentrada es el ruido que presenta el 5º ciclo del voltamograma. Cuando se ensayó el electrodo en glucosa sin utilización de enzimas, la respuesta que se obtuvo no tenía prácticamente ruido en la señal, así mismo aparecen dos picos en la respuesta uno en oxidación ($E = -0.1 \text{ V}$) y otro en reducción ($E = -0.2 \text{ V}$) que no se obtuvieron con los sensores sin enzima y que son los que corresponden a la presencia oxidación-reducción del oxígeno en competencia con la oxidación-reducción de la enzima de acuerdo con el mecanismo ya comentado y que se explicará más adelante

Lo segundo que nos llama la atención es la falta de ruido en el voltamograma a una concentración menor en la disolución, los sensores siguen siendo capaces de

detectar el pico de reducción y oxidación a una concentración menor y lo hacen con una intensidad mayor. La repetitividad de los ciclos en la detección de glucosa es muy buena comparada con la respuesta que suelen obtener los electrodos de pasta de carbono sin enzima. Al disminuir la concentración de glucosa hay más oxígeno en disolución y por tanto es más fácil observar los picos de oxidación y reducción del oxígeno de acuerdo con el mecanismo propuesto más adelante.

La conclusión es que obtenemos de los biosensores de carbono son capaces de detectar glucosa en bajas concentraciones gracias a la presencia de enzimas.

El siguiente ensayo que realizamos fue con el electrodo modificado con TiO_2 , los biosensores fueron creados de igual forma que con el Carbono y se utilizaron para medir la misma concentración que con los biosensores anteriores. Los resultados se muestran en la *imagen 148*.

La primera conclusión que podemos obtener es la presencia de un pico en reducción en $E = -0.2 \text{ V}$ de mayor intensidad que en el caso del carbono (unas 10 veces mayor) en la concentración menor. Cuando aumentamos la concentración a 2 mM la señal que se obtenía en el voltamograma desaparece y obtenemos una señal plana en el voltamograma, por tanto es posible observar como en el caso de los electrodos no modificados picos claros de oxidación y reducción definidos para bajas concentraciones de glucosa.

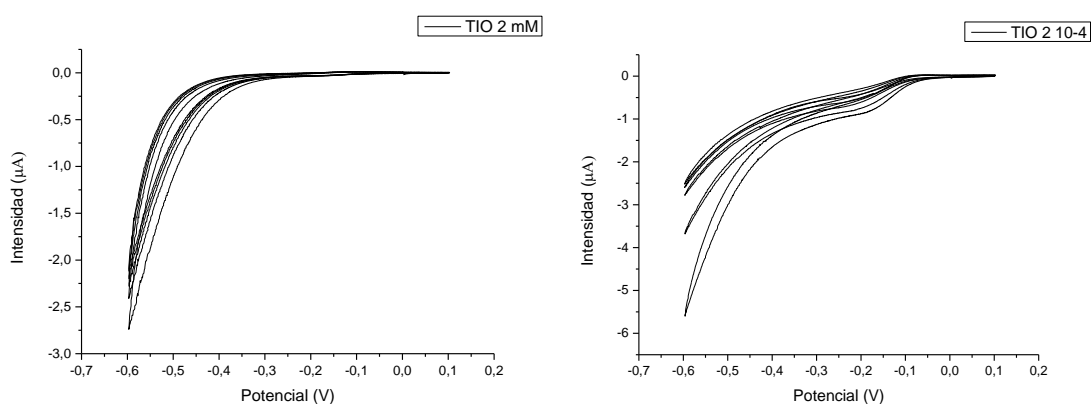


Imagen 148. Respuesta de los NANOTIO ante la Glucosa con GOX para las concentraciones 20 mM (izquierda) y 20 10^{-4} M (derecha)

En un principio estos resultados podrían resultar contradictorios ya que al aumentar la concentración del analito no hay un incremento de la intensidad de la señal como por otra parte también se había observado en el caso de los electrodos de carbono.

Para comprender el comportamiento de estos biosensores debemos tener en cuenta el esquema de la reacción enzimática y la detección electroquímica mostrados en la *imagen 149*

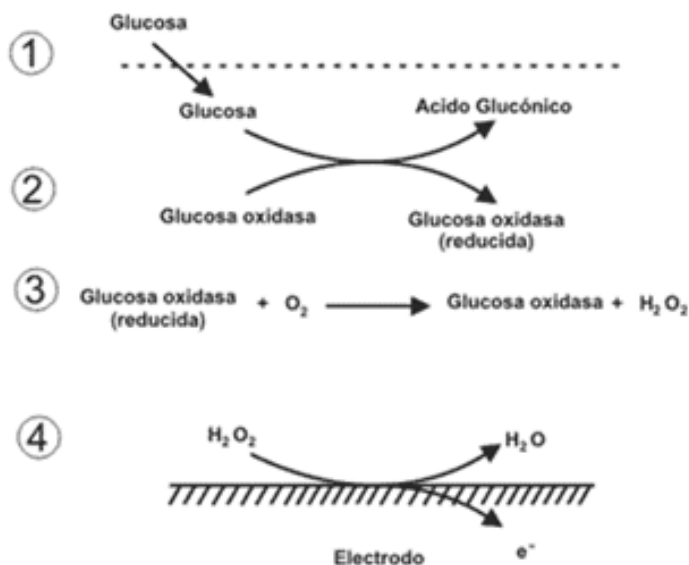


Imagen 149. Esquema de reacción enzimática y detección electroquímica de la Glucosa oxidasa.

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

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

Para tratar de explicar estos resultados, en principio contradictorios, se realizaron unos biosensores nuevos en los que cada pasta de nanopartículas se sumergía en su propia disolución de Buffer fosfato durante su fabricación para evitar contaminar los electrodos, y se ensayó sin recuperar los biosensores en varias concentraciones de la más diluida a la más concentrada empezando con disoluciones muy diluidas.

En la imagen 150 podemos ver los resultados que se obtuvieron con los biosensores de Carbono ensayados en disoluciones de glucosa muy diluidas, los picos que obtuvimos fueron 10 veces más intensos que las veces anteriores para una concentración de 10^{-5} M de glucosa, y localizados en reducción para $E = -0.25$ V y en oxidación para potenciales $E = -0.2$ V. Así pues se ensayó una concentración mayor esperando ver una disminución de intensidad en el pico de reducción del

oxígeno y efectivamente la señal del biosensor se había reducido muy cuantiosamente aunque era capaz de distinguir los picos de oxidación y reducción del oxígeno.

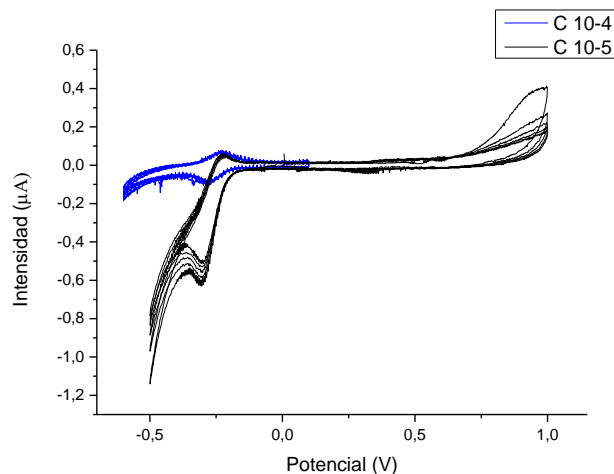


Imagen 150. Respuesta de los CPE's de Carbono y GOX para la Glucosa para las concentraciones 10^{-4} M (azul) y 10^{-5} M (negro)

Se trabajó con un electrodo de grafito y se realizaron ensayos de voltametría cíclica en soluciones de buffer fosfato aireadas a las que progresivamente se incrementa la concentración de glucosa desde $20 \cdot 10^{-5}$ M como concentración más baja hasta 10^{-3} M como máximo. En la *imagen 151* se muestran los voltamogramas obtenidos en los ensayos.

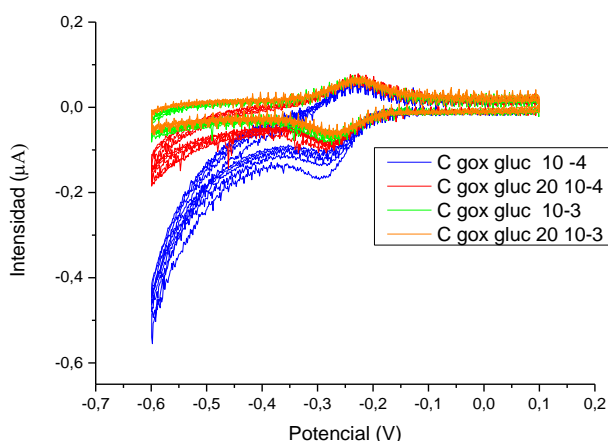


Imagen 151. Respuesta ante la Glucosa con CPE's modificados con Gox para el Carbono para concentraciones 10^{-4} M (azul) $20 \cdot 10^{-4}$ M (rojo) 10^{-3} M (verde) y $20 \cdot 10^{-3}$ M (naranja)

Se aprecia notablemente que en el voltamograma correspondiente a la concentración menor, $20 \cdot 10^{-5}$ M, se observa un pico de reducción muy intenso a un

potencial de $-0,3$ V que corresponde a la reducción del oxígeno; el correspondiente pico de oxidación se encuentra a $-0,22$ V. Cuando aumentamos la concentración de glucosa hasta 10^{-4} M se observa claramente que el pico de reducción se desplaza ligeramente a potenciales más positivos y, sobre todo, que disminuye su intensidad de corriente.

Ulteriores incrementos de la concentración de glucosa originan el mismo efecto, el pico de reducción se desplaza y disminuye de intensidad, mientras el pico de oxidación apenas se desplaza ligeramente hacia valores más positivos al aumentar la concentración de glucosa y su intensidad de corriente, en lugar de disminuir como en el pico catódico aumenta ligeramente.

Se probó entonces con electrodos modificados con TiO_2 , para ver si sucedía lo mismo que con los biosensores de Carbono en lo relativo al efecto de la concentración de glucosa en la respuesta voltamétrica del sensor.

A continuación se muestran los voltamogramas obtenidos en el electrodo de grafito modificado con nanopartículas de óxido de titanio cuando se aumenta la concentración de glucosa. En la Figura se muestran los resultados obtenidos.

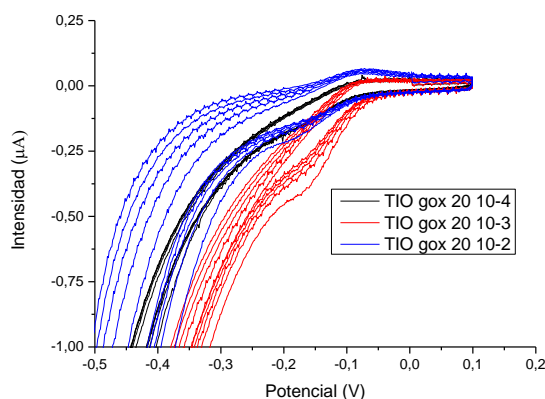


Imagen 152. Respuesta detalle ante la Glucosa de los CPE's NANOTIO modificados con GOX para concentraciones $20 \cdot 10^{-4}$ (negro) $20 \cdot 10^{-3}$ (rojo) $20 \cdot 10^{-2}$ M (azul)

La figura muestra que el electrodo modificado tiene un comportamiento similar al observado para el electrodo de grafito, ya que se comprueba cómo éste es sensible a las variaciones de glucosa en el medio e incluso los cambios son más acusados, lo que indica que las nanopartículas de dióxido de titanio parecen tener también un efecto en este caso. Así, se observa que para la concentración de glucosa menor, $20 \cdot 10^{-4}$ M, en el voltamograma se observa un pico de reducción claro a un potencial de $-0,18$ V, desplazado hacia valores más positivos en comparación con el electrodo sin modificar; el pico de oxidación se encuentra en $-0,10$ V, con lo que hay una mejora en la reversibilidad con la adición de nanopartículas. Cuando se incrementa la concentración de glucosa a $20 \cdot 10^{-3}$ M se observa claramente el desplazamiento del potencial del pico de reducción a valores más positivos negativos a la vez que

disminuye su intensidad de corriente. El efecto de adiciones sucesivas de glucosa sobre el electrodo con nanopartículas es más evidente incluso que el observado en el electrodo no modificado.

También se observó que con el electrodo modificado teníamos señales más definidas para los picos de oxidación y reducción que con los electrodos no modificados tal y como se aprecia en la *imagen 153* correspondiente a otro electrodo distinto también modificado con nanopartículas de dióxido de Titanio.

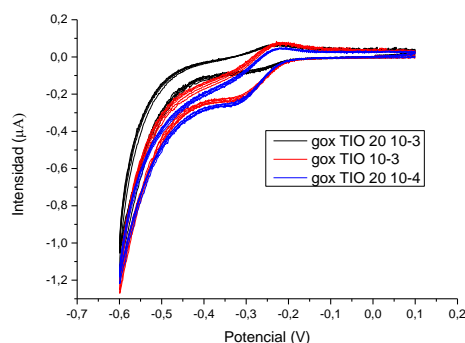


Imagen 153. Respuesta a la glucosa de CPE's NANOTIO con gox para distintas concentraciones $20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (negro) 10^{-3} M (rojo) y $20 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (azul)

Con objeto de comparar los sensores en la *Imagen 154* se muestra el comportamiento de los dos electrodos con y sin modificación de nanopartículas para dos concentraciones de glucosa. En el caso de la concentración de glucosa elevada $20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ se observa que la intensidad del pico de oxidación y reducción es similar en ambos electrodos y aparece el pico característico de los electrodos modificados a potenciales muy negativos.

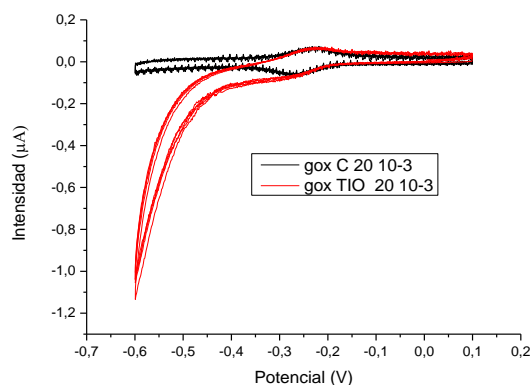


Imagen 154. Respuesta a la glucosa de CPE's C (negro) y NANOTIO (rojo) para electrodos modificados con gox para una concentración $20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Cuando la concentración de glucosa en la disolución disminuye hasta $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, *Imagen 155* se observa están mucho mejor definidos y los picos de oxidación y

reducción se desplazan a potenciales positivos. El comportamiento es similar en todos los ciclos. Por tanto podemos concluir que, los electrodos modificados son capaces de observar mayores diferencias entre las disoluciones con concentraciones de glucosa diferentes. Por tanto una vez más, las diferencias entre los electrodos modificados y sin modificar son mayores cuando se reduce la concentración de analito en la disolución. Esto podría implicar que las nanopartículas tienen un efecto electrocatalítico especialmente visible para concentraciones bajas de analito.

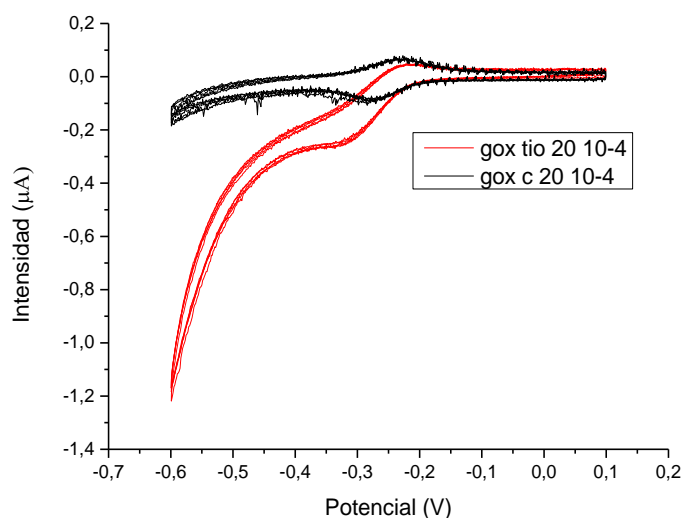


Imagen 155. Comparación de la señal CPE's de Carbono y NANOTIO con GOX en la detección de glucosa para una concentración $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ó $20 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Teniendo en cuenta que el proyecto se basaba en observar el efecto que generaban las nanopartículas de TiO_2 adicionadas a los sensores de Carbono, se puede decir que estas tienen un efecto de mediador electrónico en la fabricación de biosensores, siendo capaces de detectar azúcares.

4.3.2.1. Límite de detección de la Glucosa con biosensores de Carbono

Podemos calcular el límite de detección de la glucosa para los electrodos de pasta de Carbono para el pico de reducción que obtenemos. El procedimiento del límite de detección ha sido introducir el electrodo en la disolución menos concentrada 10^{-5} M e ir añadiendo la proporción de analito necesaria para aumentar la concentración en etapas. En este caso las concentraciones han sido $20 \cdot 10^{-5} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 10^{-4} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Se fueron guardando las respuestas y a continuación se elige un pico a estudiar en el límite de detección, en este caso he elegido el pico de reducción a un potencial $E = -0,3 \text{ V}$.

El límite de detección lo calcularemos como: $LOD (gox C) = \frac{3 \cdot SD}{m}$ dónde:

SD: desviación típica de la intensidad de corriente para los tres últimos ciclos del electrodo en el blanco, para el potencial E= - 0.3 V.

m: pendiente de la recta de calibración de la intensidad frente a la concentración, para todas las concentraciones elegidas, medidas en su último ciclo para el potencial E= - 0.3 V

En la Tabla 6 se presentan los valores utilizados para la determinación del parámetro SD

<u>CICLO</u>	<u>INTENSIDAD (µA)</u>
5	-0.01586
4	-0.01453
3	-0.01423
<u>Media</u>	<u>Desviación típica</u>
- 0.014856	0.0011758

Tabla 6. Valores de respuesta del electrodo de pasta de Carbono ante el blanco

A continuación se calcula la recta de calibración para el pico E= -0.3 V de las intensidades para cada concentración en el último ciclo de medida.

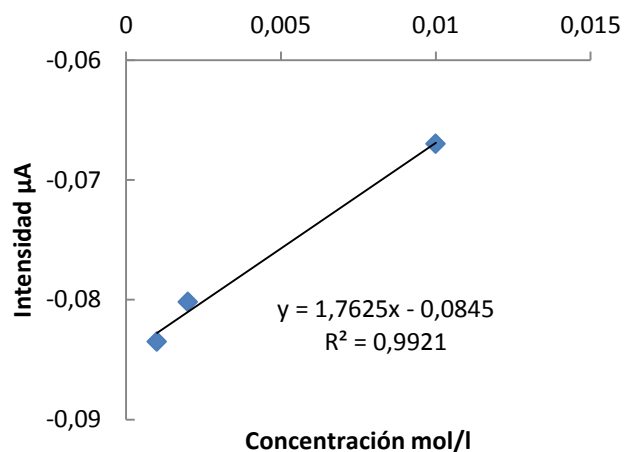


Imagen 156. Recta de calibración del límite de detección de electrodos de pasta de Carbono para la detección de Glucosa con GOX

Para el cálculo del límite de detección de la glucosa no se van a emplear todas las concentraciones que se ensayaron, se han escogido las siguientes:

CONCENTRACIÓN	INTENSIDAD (μA)
$0.5 \cdot 20 \cdot 10^{-3}$	-0.0670
$0.5 \cdot 20 \cdot 10^{-4}$	-0.0835
$20 \cdot 10^{-4}$	-0.0802

Tabla 7. Valores obtenidos con los electrodos de Carbono durante la medición de Glucosa con la enzima GOX

Por tanto, el límite de detección de los electrodos de pasta de Carbono ante la glucosa utilizando la enzima GOX para modificar los sensores es:

$$\text{LOD (GOX c)} = \frac{3 \cdot \text{SD}}{m} = \frac{3 \cdot 0.0011758}{1.7625} = 1.4766 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Como se puede observar el límite de detección de la Glucosa Oxidasa para el pico de reducción, los electrodos de pasta de Carbono tienen un límite de detección de $1.4766 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$

4.3.2.2. Límite de detección de la Glucosa con biosensores de TiO₂

Podemos calcular el límite de detección de la glucosa para los electrodos de pasta de Carbono modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio para el pico de reducción que obtenemos. El procedimiento del límite de detección ha sido introducir el electrodo en la disolución menos concentrada 10^{-5} M e ir añadiendo la proporción de analito necesaria para aumentar la concentración en etapas. En este caso las concentraciones han sido $20 \cdot 10^{-5} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 0.5 \cdot 10^{-4} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 10^{-4} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 0.5 \cdot 10^{-3} \text{ M} \rightarrow 20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Se fueron guardando las respuestas y a continuación se elige un pico a estudiar en el límite de detección, en este caso he elegido el pico de reducción a un potencial $E = -0.3 \text{ V}$.

El límite de detección lo calcularemos como: $\text{LOD (gox TIO)} = \frac{3 \cdot \text{SD}}{m}$ dónde:

SD: desviación típica de la intensidad de corriente para los tres últimos ciclos del electrodo en el blanco, para el potencial $E = -0.3 \text{ V}$.

m: pendiente de la recta de calibración de la intensidad frente a la concentración, para todas las concentraciones elegidas, medidas en su último ciclo para el potencial E= -0.3 V

En la Tabla 8 se presentan los valores utilizados para la determinación del parámetro SD

<u>CICLO</u>	<u>INTENSIDAD (μA)</u>
5	-0.04396
4	-0.04283
3	-0.04286
<u>Media</u>	<u>Desviación típica</u>
-0.04321	0.00064392

Tabla 8. Valores de respuesta del electrodo NANOTIO ante el blanco

A continuación se calcula la recta de calibración para el pico E= -0.3 V de las intensidades para cada concentración en el último ciclo de medida.

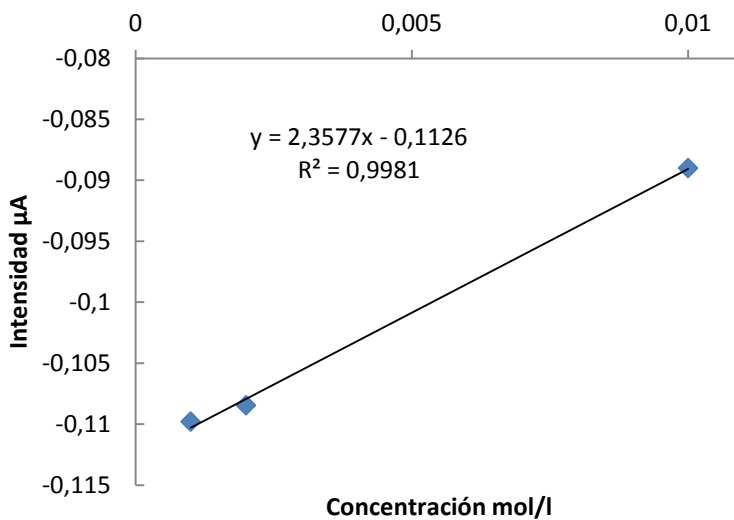


Imagen 157. Recta de calibración del límite de detección de electrodos NANOTIO para la detección de Glucosa con GOX

<u>CONCENTRACIÓN</u>	<u>INTENSIDAD (μA)</u>
0.5 · 20 · 10 ⁻³	-0.089
0.5 · 20 · 10 ⁻⁴	-0.10846
20 10 ⁻⁴	-0. 1098

Tabla 9. Valores obtenidos con los electrodos NANOTIO durante la medición de Glucosa con la enzima GOX

Por tanto, el límite de detección de los electrodos de pasta de Carbono ante la glucosa utilizando la enzima GOX para modificar los sensores es:

$$\text{LOD (NANOTIO GOX)} = \frac{3 \cdot \text{SD}}{m} = \frac{3 \cdot 0.0006439}{2.3577} = 8.1934 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Como se puede observar el límite de detección de la Glucosa Oxidasa para el pico de reducción, los electrodos de pasta de Carbono tienen un límite de detección de $8.1934 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$

Es decir el pico de reducción se detecta para una concentración menor de glucosa que para el Carbono.

4.3.2.4. Cinética para el TiO₂

Se estudian ahora los resultados para el sensor CPE-NANOTIO. La imagen muestra los 6 voltamogramas diferentes correspondientes a las diferentes velocidades de barrido en sus últimos ciclos

Podemos ver como con el aumento de la velocidad de barrido, los voltamogramas aumentan en intensidad si nos fijamos en los picos de oxidación y reducción, así mismo obtenemos menos reproducibilidad, es decir, los ciclos comienzan a dejar de ser iguales con el paso de los ciclos.

Por último podemos ver como los picos de oxidación y reducción de la glucosa se alejan entre ellos, por tanto el proceso es cada vez menos reversible.

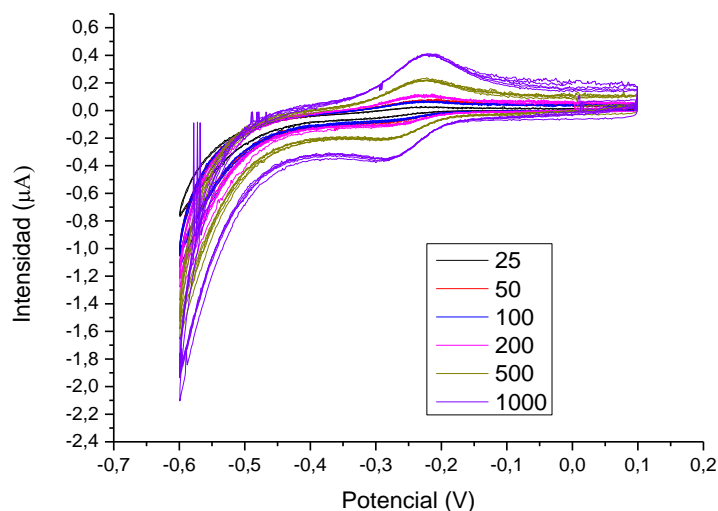


Imagen 158. Respuesta de los CPE's NANOTIO ante la modificación de la velocidad de barrido 25 mV/s (negro), 50 mV/s (rojo), 100 mV/s (azul), 200 mV/s (rosa), 500 mV/s (verde) y 1000 mV/s (violeta)

Para caracterizar el estudio cinético realizado se ha utilizado la velocidad de barrido del ensayo en mV/s y su raíz cuadrada para la intensidad del pico de reducción más intenso, los datos obtenidos de cada ensayo para determinar el mejor ajuste lineal han sido los siguientes:

Velocidad ^{1/2}	Velocidad (mV/s)	Intensidad (µA)
5.00	25	-0.75818
7.07	50	-1.00378
10.00	100	-1.00519
14.14	200	-1.20306
22.36	500	-1.47357
31.62	1000	-1.88391

Tabla 10. Resumen de las velocidades de barrido e intensidades para los CPE's NANOTIO

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

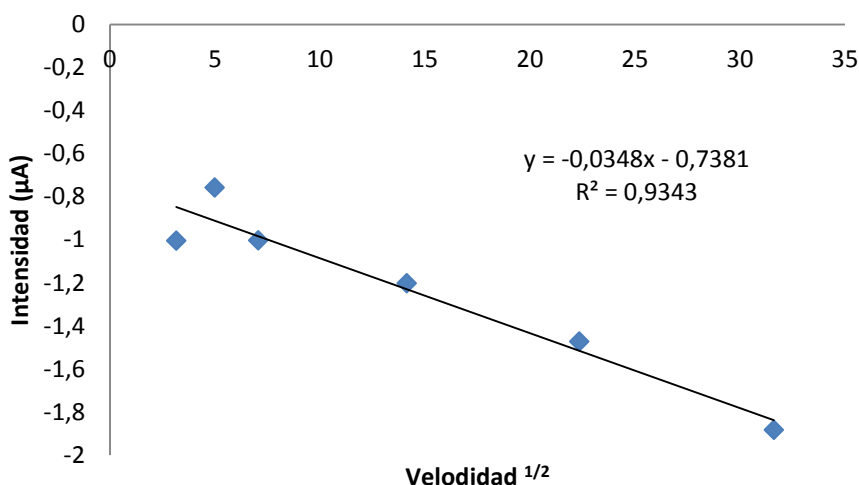


Imagen 159. Representación de la raíz cuadrada de la velocidad frente a la intensidad para los CPE's NANOTIO

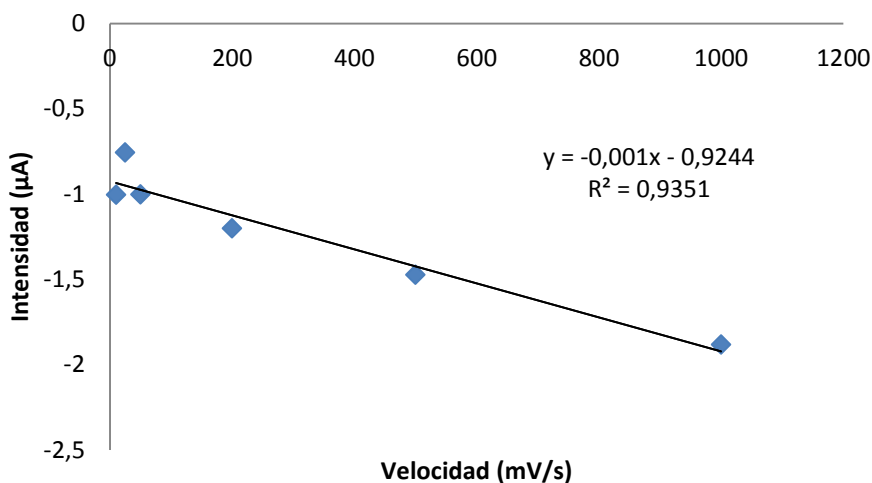


Imagen 160. Representación de la velocidad frente a la intensidad para los CPE's de NANOTIO

Se puede comprobar como ambas poseen una aproximación lineal muy similar, siendo el Coeficiente de Regresión Lineal $R= 0.9343$ para la regresión utilizada con la raíz cuadrada de la velocidad y $R= 0.9351$ para la regresión utilizada con la velocidad de barrido tal y como nos la ofrece el experimento.

Los resultados obtenidos nos indican como nos encontramos en un proceso por transferencia de carga, aunque el proceso de difusión no puede ser obviado, ya que los coeficientes obtenidos para el ajuste a una línea recta son muy similares para ambos casos. Por tanto en este caso parece que ambos procesos están involucrados y deben ser considerados.

4.3.3. Respuesta ante el Catecol con TYR

Considerando la buena respuesta de los biosensores ante los azúcares presentada en el apartado anterior, obteniendo señales de respuesta claras gracias a la inmovilización de enzimas, se dio un paso más en el desarrollo del proyecto y se decidió modificar los sensores de Carbono y TiO_2 con enzimas como la Tirosinasa para intentar mejorar la detección de antioxidantes como el Catecol respecto al comportamiento observado en Catecol con los sensores sin enzima.

El proceso de fabricación de la Tirosinasa y de los biosensores que utilizan esta enzima fue similar al usado en la detección de glucosa, la concentración en la que se usa esta enzima será 5 mg/ml.

Para realizar los ensayos se ha de describir primero las condiciones de estos, como se ha hecho en los casos anteriores:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0 V
- Potenciales extremos [-0.5,0.1] V
- Área del electrodo $A = 1 \text{ cm}^2$
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- Nº de ciclos =5

Los resultados que se obtuvieron ante las concentraciones de 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M de Catecol en buffer fosfato, midiendo siempre de la solución más diluido a lo más concentrada, fueron las siguientes para los biosensores de pasta de Carbono con Tirosinasa.

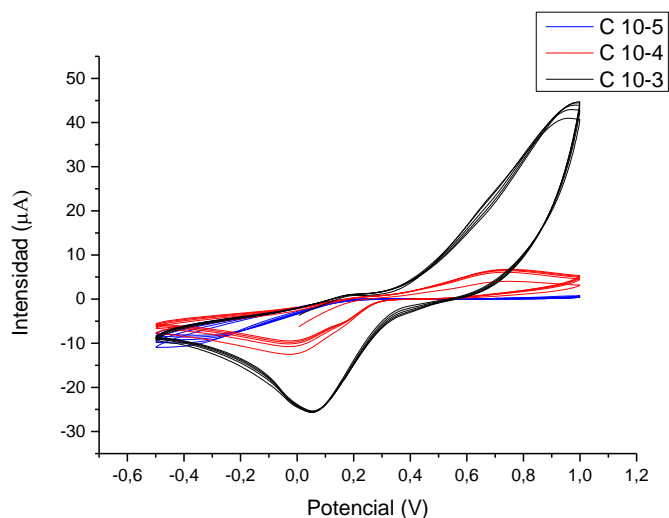


Imagen 161. Respuesta de los CPE's de Carbono con Tirosinasa ante el Catecol en tres concentraciones 10^{-5} M (azul) 10^{-4} M (rojo) y 10^{-3} M (negro)

Las conclusiones que obtenemos son parecidas a las obtenidas con los sensores sin inmovilización de enzimas, esto es se observa un claro aumento de la intensidad del pico de oxidación y de reducción del Catecol con el aumento de la concentración del analito.

Pero en este caso cambia radicalmente la morfología del voltamograma y además intensidades de los picos de oxidación / reducción son mucho mayores al añadir la Tirosinasa para una misma concentración de Catecol.

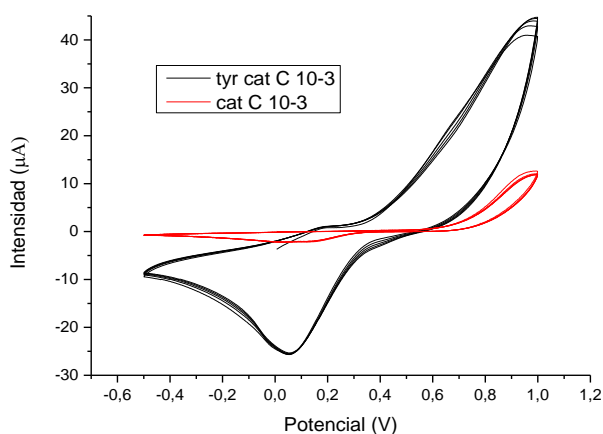


Imagen 162. Comparación de la respuesta obtenida con la adición de enzima Tyrosinasa a los CPE de C para medir Catecol (negro) y la medición de Catecol sin la modificación de los sensores (rojo) para una concentración de 10^{-3} M

En la *imagen 162* se observan los voltamogramas con y sin enzima donde se pone de manifiesto las diferencias observadas.

Con el uso de enzimas llegamos en la oxidación a una intensidad de corriente de 45 μA mientras que sin enzima difícilmente superábamos los 30 μA , lo que demuestra un primer efecto beneficioso del enzima.

En cuanto a la posición de los picos de oxidación y reducción se observa que los picos que obtenemos con los biosensores se sitúan en reducción a $E = 0.10\text{ V}$ y en oxidación en $E = 0.7\text{ V}$. Los picos que se obtenían con los sensores sin enzimas estaban a un potencial similar para la oxidación pero aparecía un pico de reducción a -0.4 V , pero esto es lógico ya que en estos ensayos se ha reducido la escala.

Se observa por tanto que con la aplicación del enzima mejora la reversibilidad de proceso. Así mismo también se observa como la reversibilidad del proceso redox mejora con el aumento de la concentración como ya ocurría en los electrodos sin enzima.

Para los electrodos NANOTIO los resultados obtenidos se pueden observar en la *imagen 163*. Para concentraciones bajas como 10^{-5} M los biosensores ofrecen una señal plana sin picos. Cuando aumentamos la concentración empieza a aparecer el pico en torno $E = -0.25\text{ V}$ en la reducción y al aumentar la concentración a 10^{-3} aparece no sólo el pico de reducción que ya teníamos y que ha aumentado de intensidad de gran manera, sino que también son claramente observables dos picos en la oxidación uno en $E = 0.25\text{ V}$ y otro en $E = 0.75\text{ V}$ que corresponden a la oxidación del dímero y del monómero respectivamente.

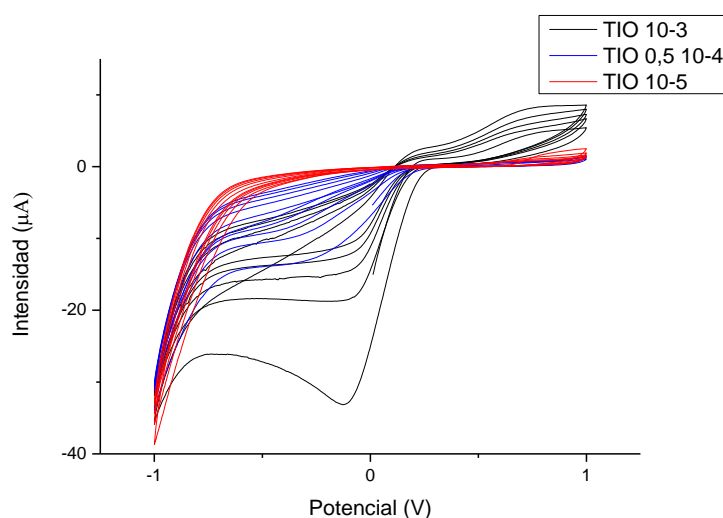


Imagen 163. Comparativa para los CPE's NANOTIO de la respuesta al Catecol con enzima Tyrosinasa para concentraciones 10^{-3} M (negro) $0.5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ (azul) y 10^{-5} M (rojo)

Respecto a los biosensores de Carbono, obtenemos un pico en oxidación a mayores correspondiente al dímero que no se observaba con los electrodos de grafito y sobretodo aumentamos en gran medida la intensidad del pico de reducción del Catecol.

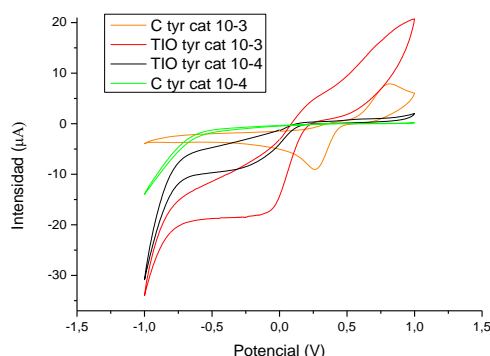


Imagen 164. Comparativa entre los electrodos de Carbono con Tirosinasa en la medición de Catecol para una concentración 10^{-3} M (naranja) y 10^{-4} M (verde) y para los NANOTIO para la concentración 10^{-3} M (rojo) y 10^{-4} M (negro) en el 5° ciclo de medida

Esta imagen es del 5 ciclo correspondiente a electrodos con y sin modificar para dos concentraciones diferentes. Podemos observar las diferencias sustanciales que inducen las nanopartículas de dióxido de titanio como mediadores en la transferencia de electrones en la actividad enzimática de la Tirosinasa.

Cuando comparamos el comportamiento de sensores y biosensores con la adición de Tirosinasa en el caso de electrodos modificados con partículas de dióxido de titanio observamos como el pico en la reducción se ha trasladado hacia la izquierda a potenciales mucho más negativos cuando añadimos las enzimas. El pico en Oxidación que sin enzimas se localizaba en $E = 0.5\text{V}$ ahora se ha desplazado hacia la izquierda y el segundo pico de oxidación se mantiene en su posición al añadir las enzimas. En cuanto a las intensidades se observa que en oxidación los picos son más intensos en los voltamogramas obtenidos con sensores sin embargo el pico de reducción es mucho más intenso cuando se utilizan biosensores.

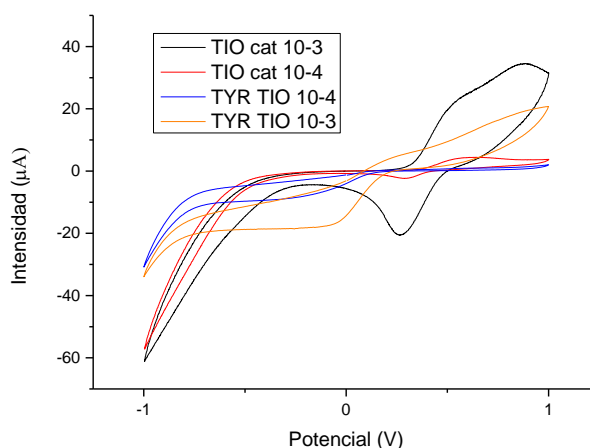


Imagen 165. Comparativa para la señal sin añadir Tirosinasa para los electrodos NANOTIO 10^{-3} M (negro) 10^{-4} M (rojo) y con Tirosinasa 10^{-3} M (azul) y 10^{-4} M (naranja)

Como conclusión de lo anterior podemos decir que la adición de enzimas es muy recomendable para los electrodos de grafito especialmente para bajas concentraciones. En el caso de los sensores modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio como estos ya tienen un buen comportamiento en la detección de Catecol sin necesidad de utilizar enzimas el efecto beneficioso del enzima es menos evidente. No obstante el uso de Tirosinasa en ambos electrodos induce importantes cambios en la morfología de los voltamogramas lo que indica que son electrodos diferentes y por tanto pueden ser combinados en una red de sensores para mejorar la selectividad cruzada.

4.3.4. Respuesta ante el pirogalol con LAC

El siguiente antioxidante que se probó a detectar con ayuda de biosensores fue el Pirogalol, para el cuál utilizamos Lacasa como enzima. La Tirosinasa oxida monofenoles y orto-difenoles a la correspondiente quinona, mientras que la lacasa cataliza la oxidación de una mayor variedad de compuestos arómicas tales como monofenoles sustituidos y polifenoles. Se siguió el mismo procedimiento que en casos anteriores para la fabricación de los sensores y para realizar los ensayos las condiciones que se propusieron fueron las siguientes.

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0 V
- Potenciales extremos [-0.6, 1] V
- Área del electrodo A = 1 cm²
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =5

Los resultados que se obtuvieron para el Carbono se pueden observar en la siguiente figura donde se muestran los voltamogramas correspondientes a las diferentes concentraciones de analito.

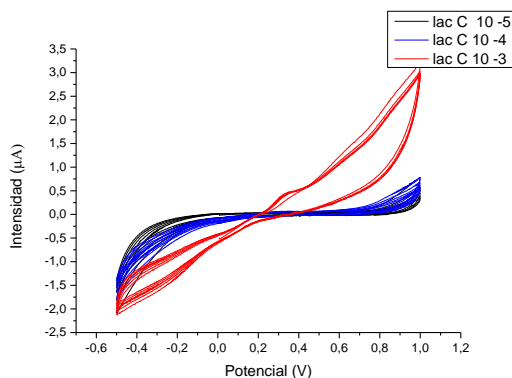


Imagen 166. Respuesta para electrodos de Carbono modificados con Lacasa para las concentraciones 10⁻⁵ M (negro) 10⁻⁴ M (azul) y 10⁻³ M (rojo)

La señal que obtenemos con la Lacasa en la detección de Pirogalol con la utilización de sensores de Carbono no mejora demasiado los resultados respecto a los sensores de grafito sin enzima para bajas concentraciones.

Comparando con los sensores de carbono sin enzima en este caso seguimos obteniendo un pico en oxidación en $E = 0.4 \text{ V}$ (se ha desplazado hacia la izquierda respecto a la medición sin enzimas) pero no se observa la señal del pico de oxidación en torno a 0.7 V observado en los sensores sin enzima.

Con respecto a la reducción, a potenciales negativos el voltamograma que obtenemos parece que comienza a detectar alguna señal de reducción/oxidación, pero que a concentración 10^{-3} aún no ha terminado de suceder mientras que en los electrodos sin enzima sí que era claramente observado.

Por tanto el uso de la Lacasa no tiene un efecto positivo en la detección de Pirogalol para el electrodo de carbono como se verá en el estudio comparativo que realizamos a continuación.

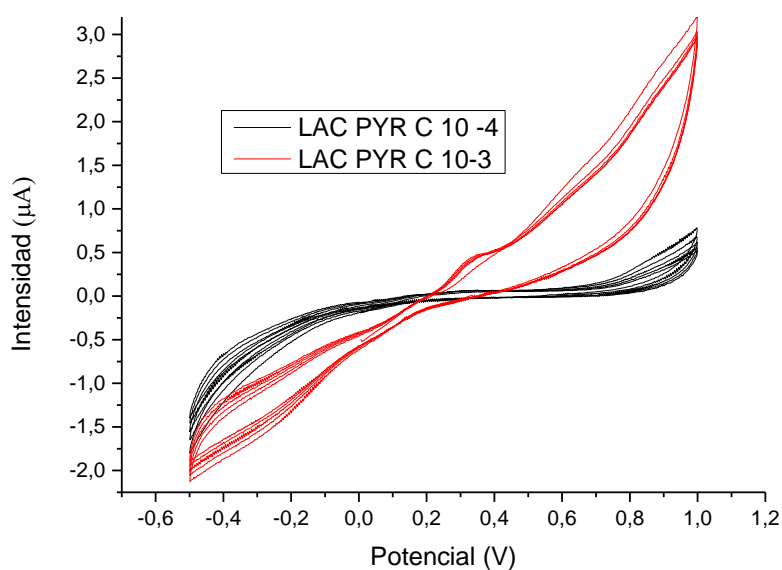


Imagen 167. Comparación entre la concentración 10^{-4} M (negro) y 10^{-3} M (rojo) para los electrodos de pasta de Carbono modificados con Lacasa para la detección de Pirogalol

Si comparamos la señal de los sensores y biosensores para los electrodos de pasta de Carbono los resultados que obtenemos son los siguientes:

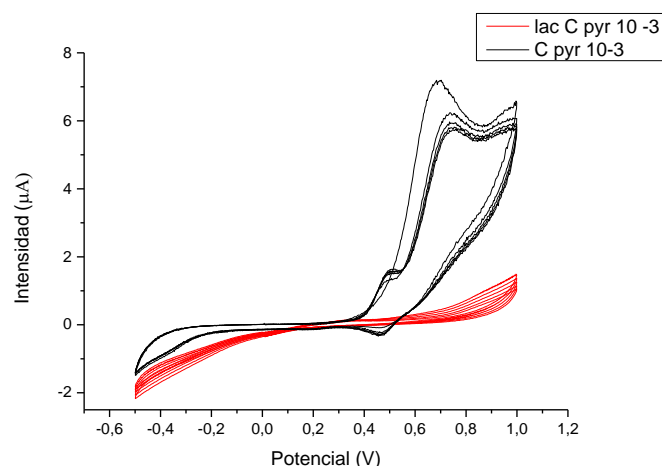


Imagen 168. Comparativa de la respuesta de los electrodos en la medición de Pirogalol cuando se modifican los CPE's de Carbono con Lacasa (rojo) y cuando no se modifican los sensores (negro) para una concentración de 10^{-3} M

Como se muestra en la imagen, la adición de Lacasa a los sensores no mejora la detección del Pirogalol, de hecho vemos como la intensidad de la señal disminuye y no conseguimos detectar los picos de oxidación - reducción que veíamos sin la adición de Lacasa para los electrodos de pasta de Carbono.

Se hicieron ensayos con los biosensores modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio para comprobar la señal que con estos se obtenían al haberse inmovilizado la enzima Lacasa.

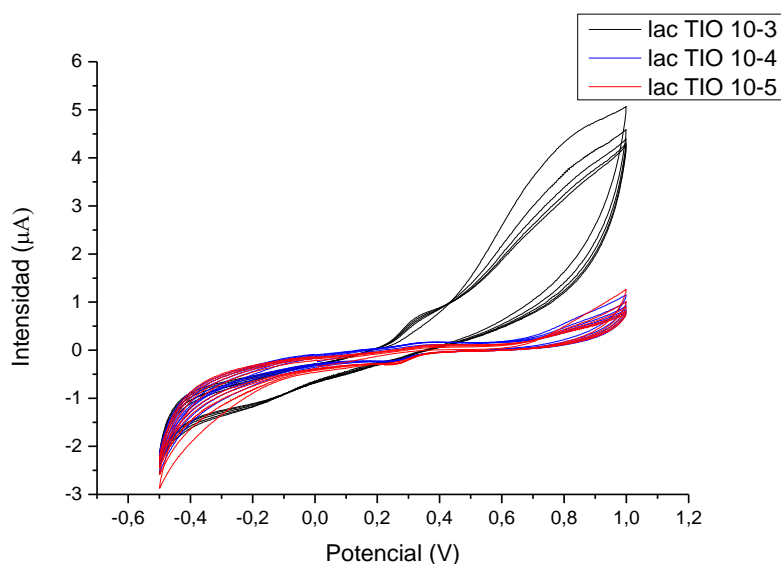


Imagen 169. Comparativa de la respuesta de los CPE's NANOTIO modificados con Lacasa ante la variación de la concentración de Pirogalol para las concentraciones 10^{-5} M (rojo) 10^{-4} M (azul) y 10^{-3} M (negro)

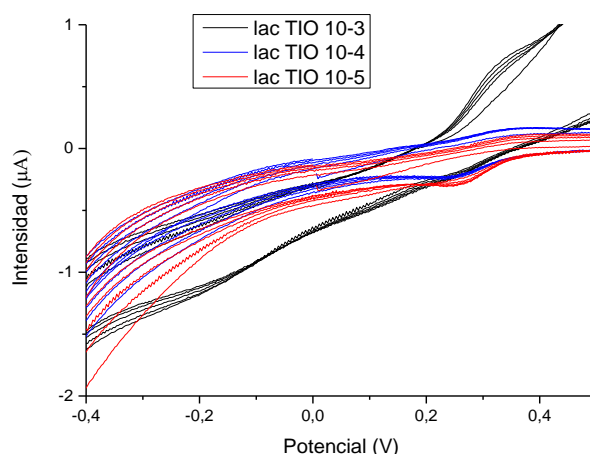


Imagen 170. Detalle de la respuesta de los electrodos NANOTIO modificados con Lacasa en la detección de Pirogalol para distintas concentraciones 10^{-5} M (rojo) 10^{-4} M (azul) y 10^{-3} M (negro)

En los resultados obtenidos se pueden ver en las imágenes 169 y 170 y en primer lugar se observa como la intensidad de la señal no ha aumentado respecto a los sensores sin enzima.

Además el pico que obteníamos en $E = 0.7$ V ha disminuido en intensidad respecto a los potenciales próximos a él, además el otro pico de oxidación que obteníamos a potenciales menores, se ha desplazado hacia la izquierda 0.2 V, se sigue obteniendo el pico de reducción en $E = 0.3$ V aunque desplazado hacia a la izquierda, y parece que el pico en reducción a potencial negativo se detecta algo mejor.

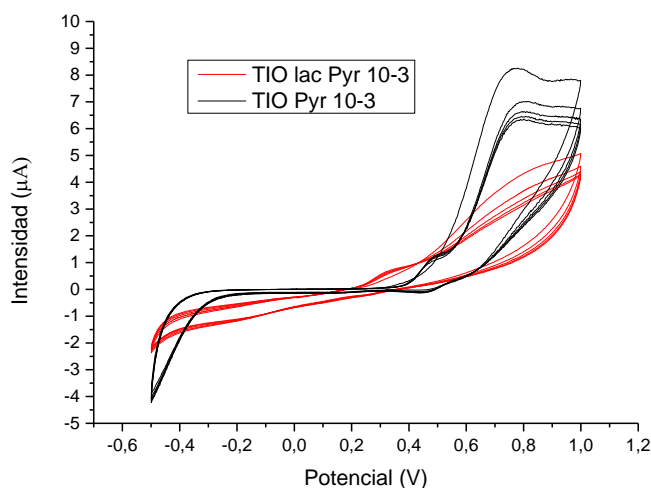


Imagen 171. Respuestas de los NANOTIO para una concentración de Pirogalol de 10^{-3} M cuando los sensores no se han modificado con Lacasa (rojo) y cuando si se han creado los biosensores (negro)

Podemos decir por tanto que la utilización de Lacasa para la detección de antioxidantes como el pirogalol, con biosensores de pasta de Carbono no parece originar ninguna ventaja frente a la medición sin enzimas. Sin embargo en el caso del dióxido de Titanio se observa que las intensidades son menores en el barrido de oxidación pero probablemente porque con la enzima el pico se ha desplazado a potenciales mucho más positivos y no los observamos, esto explicaría también que el pico observado en torno a 0.3 pueda ser la señal del dímero.

En la reducción la intensidad del pico de reducción del dímero es incluso mayor que sin enzima aunque el del monómero está muy desplazado a potenciales muy negativos y poco intenso ya que la oxidación cae fuera de escala. Por tanto podemos concluir que en el caso de los electrodos modificados con dióxido de Titanio se obtiene mediante la utilización de la enzima Lacasa una respuesta característica y diferente ante el pirogalol a la detectada sin enzima.

Esto mejoraría la selectividad cruzada en una hipotética red de sensores. Este efecto se observa sin embargo en los electrodos de grafito, luego las nanopartículas de dióxido de titanio facilitan la transferencia electrónica y mejoran la actividad enzimática.

4.3.5. Respuesta al mosto

Finalmente y como conclusión del trabajo se realizaron unos estudios preliminares sobre la aplicación de nuestros sensores modificados ante un mosto de uva. El mosto es un compuesto que contiene todos los elementos ensayados hasta ahora, ácidos, antioxidantes y azúcares.

Para ensayar los electrodos se diluyó el mosto en agua a un 50% y se determinaron las constantes de ensayo para la función de barrido que se introduce en el potencióstato, estos fueron:

- Velocidad de barrido 100 mV/s
- Potencial de referencia 0 V
- Potenciales extremos [-1,1] V
- Área del electrodo A = 1 cm²
- Tiempo de circuito abierto 5 s
- N° de ciclos =10
-

Los resultados obtenidos fueron los siguientes para los electrodos de Carbono,

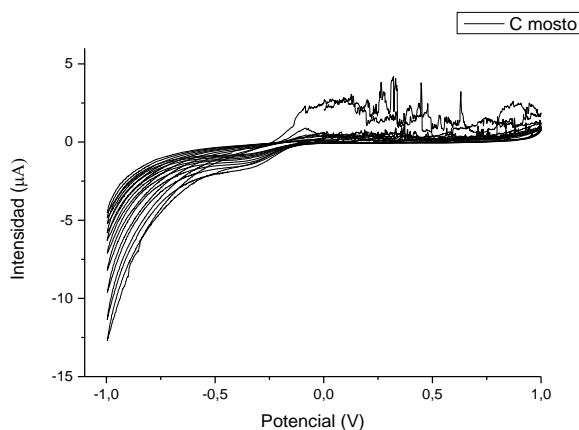


Imagen 172. Respuesta de los CPE's de Carbono a un ensayo en un mosto diluido al 50% en agua

Como vemos la repetitividad de los ciclos en la reducción no es muy buena, y en la oxidación tenemos una señal con mucho ruido que dificulta la visualización de los resultados. En general la intensidad del sensor es mayor que la que obteníamos en la medición en un blanco. Además en $E = -0.5V$ vemos como aparece un pico en la reducción del voltamograma, que si lo comparamos a la señal que obteníamos con estos electrodos en Catecol tiene similitud, es decir, los electrodos de carbono pueden estar midiéndonos los antioxidantes dentro del mosto.

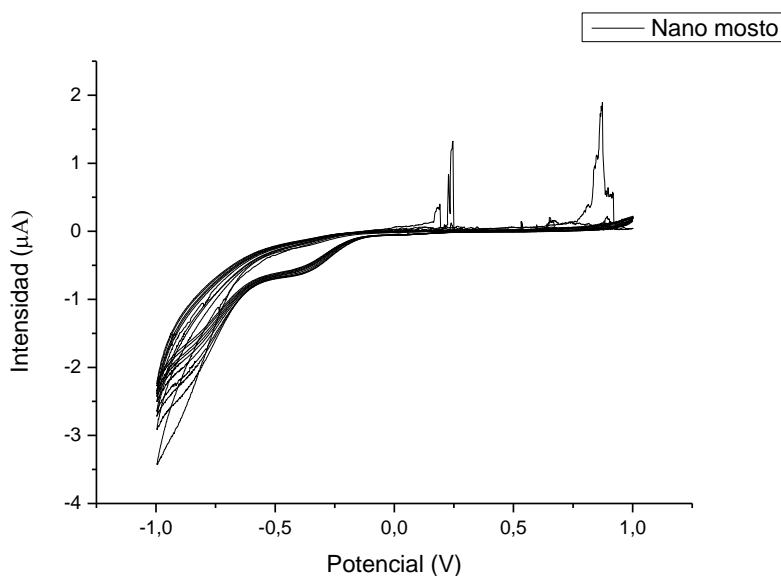


Imagen 173. Respuesta de los CPE's NANO ante un mosto diluido en agua al 50%

En los sensores modificados con nanopartículas de Titanio vemos como aparece el mismo pico que con el Carbono en $E = -0.5$ V, que se puede corresponder a los antioxidantes presentes en el mosto. También podemos apreciar que el electrodo en la oxidación en $E = 0.1$ V como existe un aumento de intensidad que se puede comparar al pico que obteníamos en oxidación con estos mismos sensores ante los ácidos, es decir, los sensores modificados, parece que son capaces de medirnos antioxidantes y componentes ácidos del mosto.

Si nos fijamos en el pico identificable con los antioxidantes en reducción es más intenso que cuando medíamos un antioxidante fuera de una mezcla, pero no obtenemos el pico del antioxidante en la oxidación en el potencial $E = -0.25$ V que obteníamos por ejemplo en la medición del Gálico.

El siguiente electrodo que se testeó en mosto fueron los modificados con Tio, obteniendo la respuesta que aparece a continuación.

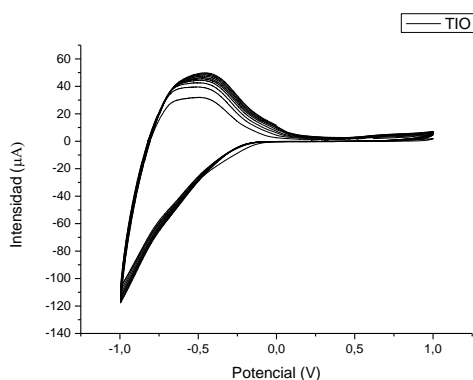


Imagen 174. Respuesta de los sensores NANOTIO al mosto diluido 50% en agua

La señal que obtenemos con estos sensores es muy parecida a la que obteníamos con estos sensores analizando ácidos. Obtenemos el pico de oxidación en $E = -0.5$ V típico de estos sensores ante la presencia de compuestos de naturaleza ácida y un pico en reducción muy intenso en $E = -1$ V tal y como sucedía con el ácido tartárico y málico. A potenciales positivos la señal comienza a dejar de ser plana, pero debido a la intensidad de señal debida a compuestos ácidos, resulta muy difícil identificar la señal de un antioxidante en el voltamograma.

Si profundizamos en la señal que obtenemos de los ácidos, y comparándola con las señales que obteníamos en los analitos por separado, podemos llegar a identificar los dos tipos de compuestos que forman parte de mosto, el tartárico y el málico. Tal y como se comprueba en la *imagen 175* en la siguiente página.

Podemos ver como la reducción a potenciales negativos coincide para el málico y el mosto casi a la perfección, lo que nos indica que los electrodos son capaces de detectar ácido málico en una mezcla de analitos.

Así mismo el pico que obtenemos en la oxidación típico del TiO_2 en presencia de ácidos en $E = -0.5 \text{ V}$ tiene una intensidad mucho mayor para el mosto que para el Máfico, es más, si comparamos la señal con la del ácido tartárico vemos como se parece mucho más el voltamograma, es decir, son capaces de detectar este ácido en una mezcla.

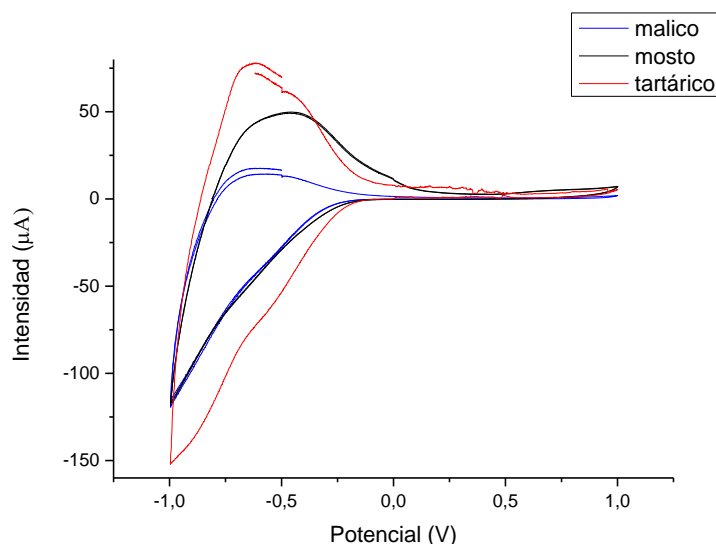


Imagen 175. Respuesta de los sensores NANOTIO ante el ácido Máfico (azul) el ácido Tartárico (rojo) y el mosto (negro)

El efecto catalítico del TiO_2 fue la razón de elegir estas nanopartículas para modificar los sensores, esperábamos obtener en la investigación unos electrodos capaces de medir antioxidantes mejor que los sensores sin modificar, pero con la experimentación hemos visto cómo, no solo mejoraban la detección de antioxidantes, sino también la de ácidos, incluso en mezclas de compuestos de diferente naturaleza como ocurre en un mosto.

El hecho de no detectar los picos de los antioxidantes en el mosto, no reside en la incapacidad de los sensores, que como y se vio en el capítulo anterior, mejoran las reacciones redox del proceso ofreciéndonos procesos más reversibles, si no en la fuerte intensidad que se obtienen con los ácidos.

Si hacemos un aumento en la zona en la que se encuentran los picos de oxidación de los antioxidantes a potenciales positivos podemos observar cómo, efectivamente, se siguen detectando los antioxidantes con estos electrodos en una mezcla como en el mosto, obteniendo un pico en $E = 0.75 \text{ V}$ en la oxidación tal y como sucedía con el Catecol, además de un voltamograma con intensidades elevadas en $E = 1 \text{ V}$.

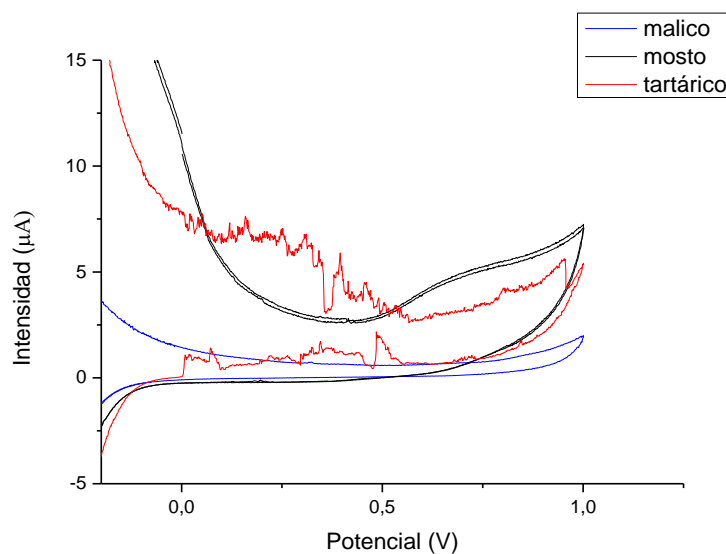


Imagen 176. Detalle de la respuesta de los NANOTIO al ácido Máfico (azul) al ácido Tartárico (rojo) y al mosto (negro)

Podemos concluir por tanto, que los electrodos modificados con nanopartículas de TiO_2 mejoran la detección de compuestos de diferente naturaleza en mezclas, como el mosto. No solo son capaces de determinar la existencia o inexistencia de un ácido o un antioxidante, pero también son capaces de distinguir entre ellos, como sucede en el caso de los ácidos. Por tanto son un buen candidato con y sin enzimas para fabricar una red de sensores que controle la calidad de mostos y vinos.

CAPÍTULO V. Conclusiones

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

- ❖ Los electrodos fabricados a partir de pasta de carbono han demostrado tener un buen comportamiento en cuanto a la detección de ácidos, antioxidantes y azúcares, por lo que se comprueba que como ya se conocía son una buena herramienta de análisis de mostos y vinos.
- ❖ El uso de nanopartículas de dióxido de Titanio en los electrodos de pasta de carbono genera una señal electroquímica característica con una fuerte intensidad asociada al pico de disociación del agua. La repetitividad, la reproducibilidad y la estabilidad de los sensores mejora respecto a los sensores de carbono. De esta forma se comprueba que el efecto catalítico del TiO_2 influye beneficiosamente en las mediciones de analitos por electroquímica.
- ❖ La modificación con nanopartículas de dióxido de Titanio tiene un efecto beneficioso en la detección de ácidos presentes en el vino, siendo capaz de discriminar entre diferentes ácidos analizados: Tartárico, Málico, Vanílico y Gálico.
- ❖ Se comprueba que para los electrodos modificados con dióxido de Titanio existe un comportamiento mejorado en la detección de antioxidantes. Existe un claro aumento de la intensidad de los picos y de la reversibilidad de los mismos. Además en los límites de detección en el Catecol el dióxido de Titanio muestra un mejor comportamiento que los electrodos de Carbono
- ❖ La diferente respuesta voltamétrica de los sensores modificados con nanopartículas nos permiten discriminar entre los diferentes antioxidantes ensayados: Vanílico, Gálico, Catecol, y Pirogalol. El efecto de dimerización se observa especialmente para alta concentración de antioxidante. Este fenómeno de dimerización no se observa cuando se trabaja con biosensores, por lo que únicamente se advierte un pico de oxidación y otro de reducción.
- ❖ Los biosensores de glucosa oxidasa modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio son adecuados para la detección de glucosa siendo especialmente recomendables para bajas concentraciones. El mecanismo asociado a la glucosa es mixto aunque es ligeramente más fuerte el proceso de transferencia de carga que el de difusión cuando se varía la velocidad de barrido de medición.

- ❖ En general el efecto beneficioso de las nanopartículas de dióxido de Titanio en sensores y biosensores es más visible a escala más reducida, esto es en la detección de bajas concentraciones de analito, lo que es lógico teniendo en cuenta su carácter nanométrico.
- ❖ La respuesta de los sensores y biosensores modificados con nanopartículas de dióxido de Titanio ante antioxidantes es claramente diferente por lo que pueden ser utilizados en una red de sensores con objeto de conseguir una mejora en la selectividad cruzada.
- ❖ La respuesta de los sensores modificados con nanopartículas de dióxido de Titano ante los mostos es característica y diferente de la de los sensores de pasta de carbono. Se observan de forma diferenciada los picos de oxidación y reducción correspondientes a los ácidos y a los antioxidantes presentes en la mezcla.

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

- ❖ Aplicar estos sensores fabricados a partir de pasta de carbono modificados a la medición directa de mostos y vinos, creando de esta forma una lengua (bio)electrónica que sea capaz de discriminar diferentes variedades de mostos acorde a su contenido en polifenoles y azúcares y su carácter ácido.
- ❖ Siguiendo esta misma línea de investigación, utilizar nanopartículas de otros óxidos metálicos diferentes, como pueden ser de hierro, níquel o cerio para realizar detecciones de los mismos componentes y así obtener una red de sensores que sean capaces de discriminar polifenoles y azúcares en mostos o en otros productos alimenticios.
- ❖ Utilización de otras enzimas en electrodos de grafito y modificados con nanopartículas para poderlos utilizar en una red mixta de sensores y biosensores de grafito y de grafito modificados con dióxido de titanio.



Anexo I – Diseñe un accesorio de mejora del proceso de entrecruzamiento de la enzima

Durante la realización del proyecto se presentó la oportunidad de mejorar uno de los materiales utilizados en la experimentación del proyecto, el accesorio que mantiene los electrodos en una atmósfera de gases del glutaraldehído durante el proceso de entrecruzamiento de la enzima, mediante el estudio de diseño de un nuevo accesorio y su impresión 3D con una de las asignaturas optativas del grado en ingeniería mecánica *Procesos Avanzados de Fabricación*.

Así pues se realizó un estudio de distintos mecanismos y accesorios que mejoraran esta fase de la modificación de los sensores, finalmente se optó por un accesorio impreso en 3D con ABS que funcione junto a una junta tórica para crear el aislamiento de los gases de glutaraldehído en el vaso de precipitados evitando que se escapen, y de esta forma, los electrodos se encuentren en una atmósfera hermética. A continuación se muestra un resumen del proceso de fabricación de dicho accesorio.

El primer paso fue la elección del diseño más adecuado, barajando varias opciones como la posibilidad de realizar dos piezas unidas por machihembrado, una pieza única con junta tórica en el exterior o una pieza única pieza con junta tórica interior, siendo esta última la opción elegida por su sencillez y funcionalidad. El segundo paso fue la toma de medidas del vaso de precipitados y los biosensores (jeringuillas) con ayuda de un pie de rey.

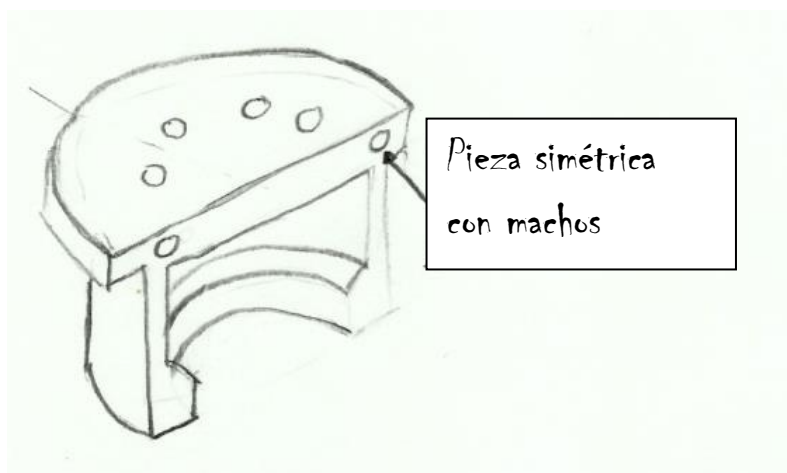


Imagen 177. Primer boceto ideado en el diseño de la tapa auxiliar

A la hora de establecer las dimensiones, el principal objetivo era conseguir la hermeticidad a pesar de la existencia del pico por lo que se decidió aumentar la dimensión de profundidad de la pieza para salvar la diferencia geométrica con el vaso. Además se diseñó una cavidad lateral para la posterior colocación de una

junta tórica que asegure la hermeticidad. Se consideró oportuno realizar unos orificios de menor diámetro que los sensores para limarlos tras la impresión y asegurar un buen ajuste.

Para modelar la pieza se utilizó el programa de licencia libre GNU “FreeCad” cuyo modelo posteriormente se exportó en formato .STL ajustando la precisión a 0,5 mm para evitar un facetado excesivo.

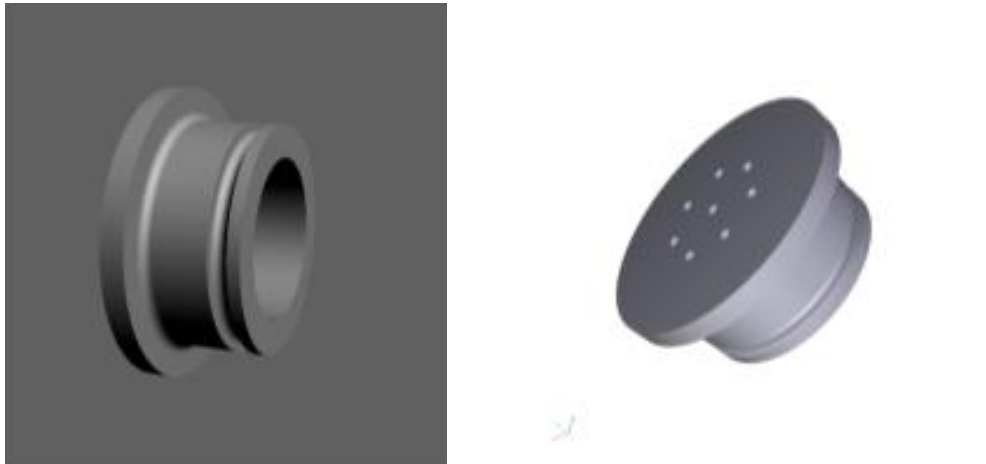


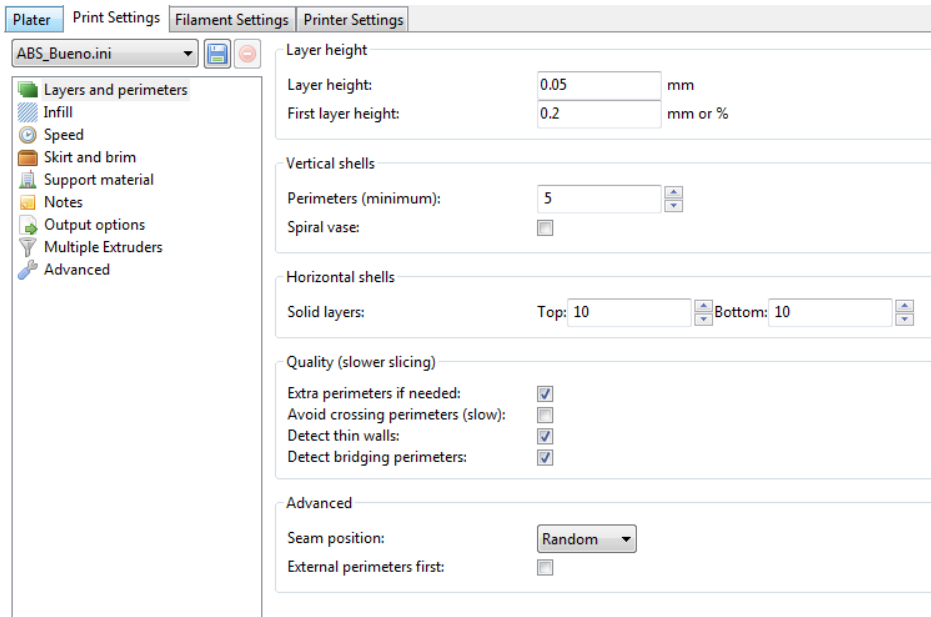
Imagen 178. Modelo tridimensional del diseño final del accesorio ideado

En primer lugar se ajustó la geometría de la pieza a las necesidades propias del proceso de impresión, es decir, eliminación de voladizos innecesarios, decisión que afecta a la cavidad que contendrá a la junta tórica sustituyendo la parte superior por un plano a 30°.

En segundo lugar, una vez finalizado el diseño, se procedió a la elección del material, teniendo como posibles ABS o PLA. Ya que los vapores que soportará serán de Glutaraldehído, el cual puede afectar a determinados materiales, escogemos el ABS porque contiene butadieno que no es soluble en disolventes orgánicos además de ser mecanizable, lo cual es un requisito de ajuste en nuestra pieza. Por los problemas de adhesión ABS-vidrio, se decidió echar una capa de laca sobre la cama.

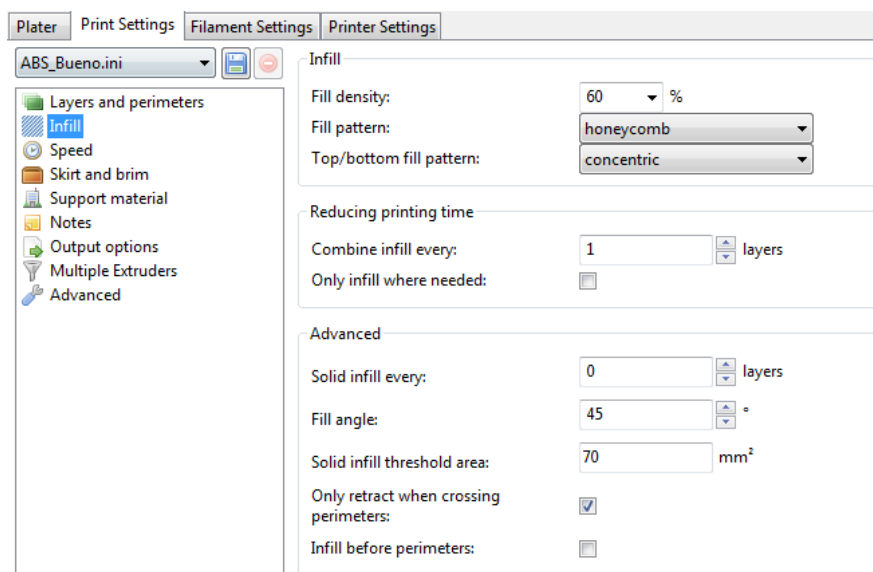
Para la impresión, se decidió colocar la pieza apoyada sobre la cama con su diámetro mayor, es decir, la superficie en la que se localizan los orificios. De esta forma se evitarán los voladizos y se tiene más superficie de apoyo. Sin embargo, es posible que se produzca combado en la superficie de apoyo por las tensiones térmicas generadas.

Debido a las dimensiones de la impresora, los parámetros de impresión fueron condicionados por la necesidad de imprimir varios modelos al mismo tiempo. Esto parámetros fueron:



En opciones de capas establecemos los parámetros siguientes. Cada capa tendrá una altura de 0.05 mm eso equivale a 20 capas por milímetro. El tiempo de ejecución será bastante largo. Se establecieron 10 capas sólidas para la base y la parte superior. Se decidió rellenar con un 60% ya que más sería excesivo para la pieza, en un principio.

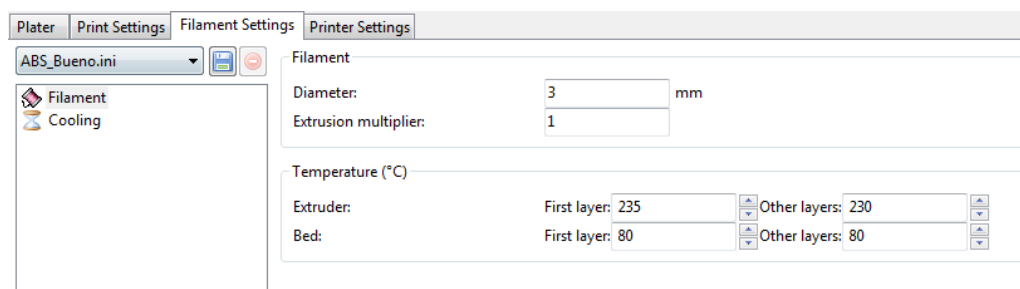
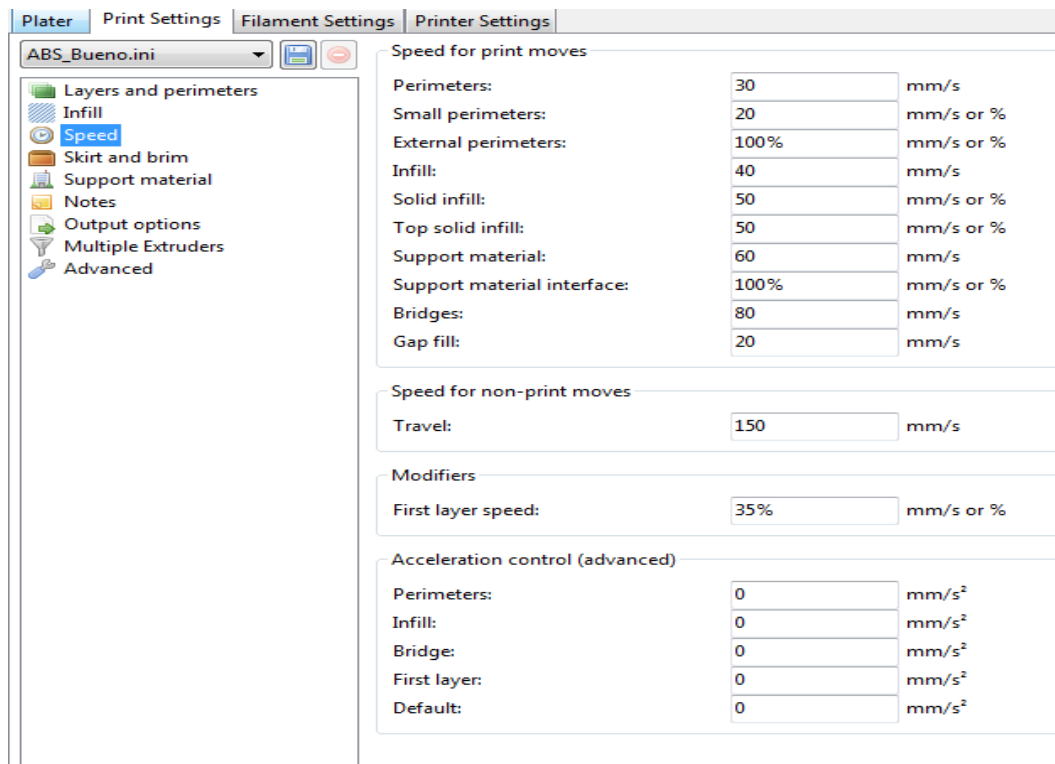
Para el trabajo que va a realizar la pieza, un relleno de panel de abeja puede ser suficiente y soportar los esfuerzos a los que se verá sometida.



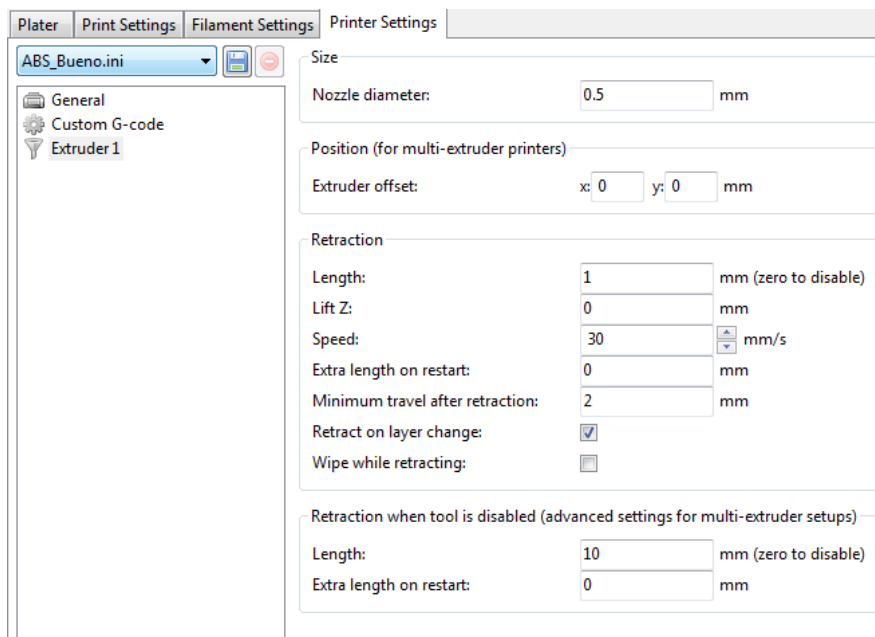
La velocidad de ejecución, como se ha comentado antes, viene condicionada por la impresión de varias piezas a la vez.

Se ha puesto más cuidado en el relleno, tanto de la parte sólida como la de la parte superior, disminuyendo un poco su velocidad.

Los movimientos en vacío vienen dados por la impresora.



El diámetro del filamento es de 3 mm que viene dado por la bobina de ABS que vamos a emplear, siendo el diámetro del hilo de 3.5mm se justifica el menor diámetro de cálculo para conseguir mejor extrusión.



La temperatura de la cama en nuestro caso es de 80°C. Una temperatura de trabajo aceptable son esos 230-235 °C. Finalmente se establecieron las características que presenta la impresora a la hora de trabajar.

La primera pieza obtenida presentó varios problemas. El más importante fue el debido a la decisión de imprimir en primer lugar el perímetro y después el relleno, lo que ocasionó que, debido a la contracción del material, relleno y perímetro no agarraran formando dos piezas independientes.

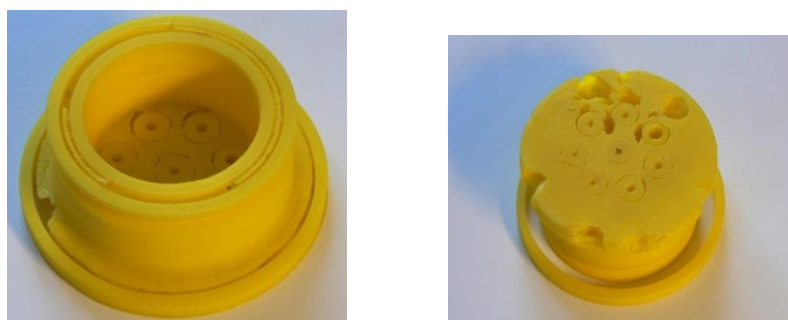


Imagen 179. Pieza obtenida después de la primera impresión del accesorio (izquierda) y detalle de la falta de adhesión del aro exterior (derecha)

En segundo lugar, los orificios eran de dimensiones menores a las establecidas en el modelo; se interpretó este resultado como que, al ser un círculo de pequeño diámetro, el material que salía por el extrusor (sobre el cual no tenemos un control extremadamente preciso) se *derramó* hacia el interior del orificio.



Imagen 180. Detalle de los orificios para la localización de los sensores

Además, en ciertas partes no había relleno y existían descuelgues de material entre capas como podemos apreciar en la ilustración número 5, defecto que se pensó que se solucionaría cambiando la política de relleno del 60 al 100% en cada capa.



Imagen 181. Detalle de la falta de relleno y descuelgues de la primera impresión

Otra deficiencia apareció en la zona de contacto entre la pieza y el vaso (zona en el modelo de geometría más estrecha, que hace de pared al orificio hueco central de la pieza). El material de relleno entre perímetros no estaba adherido, debido a que el área de relleno era muy próxima a las dimensiones de extrusión de la boquilla y como se había elegido una política de relleno de panal de abeja sin establecer un área mínima de relleno, el programa estableció una trayectoria de relleno en zig-zag sin ninguna conexión con las paredes. Finalmente, se observa que la pieza no posee capa final o ésta no queda definida como tal.



Imagen 182. Detalle de la falta de adhesión y material en la pared (izquierda) y pieza en la posición teórica de trabajo con un soporte material del sensor de muestra (derecha)

Por otra parte, por la decisión de aplicar laca sobre la cama la pieza quedó perfectamente adherida.

En un segundo intento, y cambiando todas las opciones de impresión, que dieron lugar a los fallos comentados en los párrafos anteriores, obtuvimos el siguiente resultado:

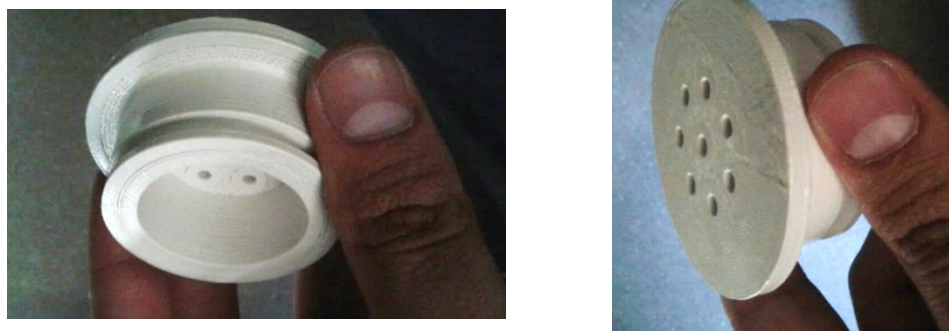


Imagen 183. Detalle de la pieza final obtenida tras la segunda impresión con la elección de los parámetros correctos

BIBLIOGRAFIA

- [1] Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria. Javier Gonzalo Ruiz. Tesis Doctoral-2006. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Químicas.
- [2] Nickel oxide nanoparticles: A novel antioxidant. Jyoti Prasad Saikia. Samrat Paul. Bolin Kumar Konwar, Sanjoy Kumar Samdarshi. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 78 (2010) 146-148.
- [3] Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. Xiaoyun Lin. Yongnian Ni. Serge Kokot. *Analytica Chimica Acta*. 785 (2013) 54-62.
- [4] Investigation of the effect of sol-gel synthesis variables on structural and photocatalytic properties of TiO_2 nanoparticles. M.A. Behajady, H. Eskandarloo, N. Mordishahla. M. Shokri. *Desalination* 278 (2011) 10-17.
- [5] Estudio de las propiedades estructurales, texturales y catalíticas del TiO_2 , dopado con indio y níquel. Leticia M. Torres-Martínez, Miguel A. Ruíz-Gómez. Departamento de Ecomateriales y energía, de la facultad de ingeniería civil, Instituto de ingeniería Civil, UANL. *Ingenierías*, Octubre-Diciembre 2011, Vol. XIV, No. 53
- [6] Mineralogía. Tema 25 Óxidos e hidróxidos. Célia Marcos Pascual. OCW. Universidad de Oviedo.
- [7] The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta* 668 (2010) 155-165.
- [8] Evaluation of red wines antioxidant capacity by means of a voltammetric e-tongue with an optimized sensor array. Xavi Cetó, Constantin Apetrei, Manel del Valle, Maria Luz Rodríguez -Méndez. *Electrochimica Acta* 120 (2014) 180-186.
- [9]- "Voltammetric BioElectronic Tongue for the analysis of phenolic compounds in rosé cava wines" Xavier Cetó, Josefina Cpadevilla, Santiago Mínguez, Manel del valle. *Food Research International* 55 (2014) 455-461.
- [10] Electrochemical stability of citrate-capped gold nanoparticles electrostatically assembled on amine-modified glassy carbon. *Electrochimica Acta* 34 (2008)- 5570
- [11] Metal Oxide based multisensory array and portable database for field analysis of antioxidants. Erica Sharpe, Ryan Bradley, Thalia Frasco, Dilhani Jayathilaka, Amanda Marsh, Silvana Andreescu. *Sensors and Actuators B: Chemical* 193 (2014) 552-562.

- [12] Chemical sensors, biosensors and thick-film technology. C.A.Galan-Vidal, J. Munoz, C. Dominguez, y S. Alegret. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1995. 14(5):p. 225-231.
- [13] *Biosensors: fundamentals and applications*. Ed. O.U. Press. 1987 – New York. A. K. Turner, Isao; Wilson, George.
- [14] *Biosensors, an introduction*. B.Eggins. 1996: John Wiley & Sons Ltd.
- [15] Chemical sensors, J. Janata, M. Josowicz, P. Vanysek, D. M. DeVaney. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(12), p: 179 R-208 R.
- [16] Chemical Sensors, J. Janata, M. Josowicz, D.M. Devaney. *Analytical Chemistry*, 1994. 66(12): P. R207-R288.
- [17] Centennial retrospective on chemical sensors. J. Janata. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(5): p, 150A-153A.
- [18] Fluid characterization using sensor elements based on interdigitated electrodes. T. Hofmann, K. Schroder, J. Zacheja, J. Binder. *Sensors and Actuators, B-Chemical*, 1996. 37(1-2): p.37-42
- [19] Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. E. Kazty, I. Willner, *Electroanalysis*, 2003, 15(11):p. 913-947.
- [20] Influence of surface Modifications on Semiconductor Gas sensor Behavior. E. Souteyrand, D. Nicolas, E. Queau, J. R. Martin. *Sensors and Actuators B- Chemical* 1995. 26 (1-3): p. 174-178.
- [21] Direct electron transfer reaction of glucose oxidase at bare silver electrodes and its application in analysis. Wang. G., Xu, J.J., Chen, H.Y., *Electrochem. Commun*, 2002. 4, 506-509.
- [22] Effect of nanometer particles on the adsorbability and enzymatic activity of glucose oxidase. Chen, Z.J. , Ou, X.M., Tang, F.Q., Juang, L. *Colloids Surf.* 1996. B: *Biointerf* 7, 173-179.
- [23] Biochemically functionalized silica nanoparticles. Qhobosheane, M., Santra, S., Zang, P. Tan W.H. *Analyst* 2004. 196 1274-1278.
- [24] Immobilization of oligonucleotides onto silica nanoparticles for DNA hybridization studies. Hilliard, L.R., Zhao, X.J. , Tan, W.H. *Anal. Chm Acta* 2002. 470, 51-56.
- [25] Rapid determination of glucose and sucrose by an amperometric glucose-sensing electrode combined with invertase/mutarotase-attached measuring cell. Mizutani, S, Yabuki, S. *Biosens. Bioelectron* 1997. 12, 1013-1020.

- [26] A reagentless glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped into osmium.complez modified polypyrrole film. Reiter, S., Habermuller, K., Schuhmann, W. *Sensor. Actuat. B-chem* 2001. 79, 150-156.
- [27] Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrons as basis for third generation biosensors. Gorton, L., Lindgren, A., Larsson, T., Munteanu, F.D., Ruzgas, T., Gazaryan, I., *Anal. chim. Acta* 1999. Acta 400, 91-1008.
- [28] Electron transfer on an electrode of glucose oxidase immobilized in polyaniline. Lu, S.Y., Li, C.E., Zhang, D.D., Zhang, Y., Mo, Z. H., Cai, Q., Zhu, A.R. *Electroanal. Chem* 19974. 364, 31-36.
- [29] Enhanced direct electron transport with glucose oxidase immobilized on (aminophenyl) boronic acid modified glassy carbon electrode. Narasimhan, K., Wingard Jr., L.B. *Anal. Chem.* 1986. 58, 2984-2987.
- [30] Electrochemistry of reconstituted glucose oxidase on carbon paste electrodes. Savitridi, D., Mitra, C.K., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1998. 47, 67-73.
- [31] Differential pulse voltammetric study of direct electron in glucose oxidase chemically modified graphite electrodes. Ianniello R.M., Lindsay, T.J., Yacynych, A.M. *Anal. Chem* 1982. 54, 1098-1101.
- [32] Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes. Guiseppi- Elie, A., Lei, C., Baughman, R.H., *Nanotechnology* 2002. 13, 559-564.
- [33] An electrochemical investigation of glucose oxidase at a CdS nanoparticles modified electrode. Yinxi Huang, Wenjun Zhang, Han Xiao, Genxi Li. *Biosensors and bioelectronics* 2005. 21, 817-821.
- [34] A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode. Chunyan Deng, Jinhua Chen, Zhou Nie, Shihui Si. *Biosensors and Bioelectronics* 2010. 26, 213-219.
- [35] Carbon nanofiber-based glucose biosensor. Vamvakaki, V., Hatzimarinaki, M. chaniotakis, N. *Anal. Chem.* 2008. 80, 5970-5975.
- [36] Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. Kang, X.H., Wang, J., Wu, H. Aksay, I.A., Liu, J., Lin, Y.H., *Biosens. Bioelectro.* 2009. 25, 901-905.
- [37] Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. Liu, S.Q., Ju, H.X., *Biosens. Bioelectron.* 2003. 19, 177-283.
- [38] Wu, F.H., Xu, J.J., Tian, Y., Dong, S.J. *Biosens. Bioelectron* 2008. 24, 198-203.

- [39] Covalent attachment of osmium complexes to glucose oxidase and the application of the resulting modified enzyme in a enzyme switch responsive to glucose. Battaglini F. Bartlett, P.N., Wang, J.H. *Anal. Chem.* 2000. 72, 502-509.
- [40] Integrated Oligoaniline-Cross-Linked Composites of Au Nanoparticles/Glucose Oxidase Electrodes: A Generic Paradigm for Electrically Contacted Enzyme Systems. Yan, Y.M. Baravik, I., Yehezkeli, O., Willner, I., *J. Phys. Chem* 2008. 112, 17883-17888.
- [41] Shen, L., Hu, N.F. *Biomacromolecules* 2005. 6, 1475-1483.
- [42] Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays. Gooding, J.J., Wibowo, R. Liu, J., Yang. W., Losic, D., Orbons, S., Mearns, F.J., Shapter, J.G., Hibbert, D.B., *J. Am. Chem. Soc.* 2003. 125, 9006-9007.
- [43] Zhang, H., Hu, N.F., *Biosens. Bioelectron.* 2007. 23, 393-399.
- [44] Protein engineering using molecular assembly: functional conversion of cytochrome c via nanocovalent interactios. Hamachi, I., Fujita, A., Kunitake, T., *J. AM, Chem Soc* 1997. 73, 1979-1991.
- [45] Applications of Electrochemical Sensors and Detection Systems in Biomedical Analysis, in *Pharmaceutical Sciences*. University of Pardubice: Pardubice 1998.
- [46] *Sensors A comprehensive Survey*. W. H. Göpel, J. Zemel. J. N. Vol 2. Ed. W. VCN. 1991.
- [47] Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* 2001. D.R. Thevenot K. Toth, R. A. Durst, y G. S. Wilson. 2001 16 (1-2): p. 121-131.7.
- [48] *Chemical sensors and biosensors. B: Eggins*. Ed. L. Wiley John. Wiley and Sons. 2002.
- [49] Biosensors, what real progress is being made. D. Griffithsy, G. Hall. *Trends in Biotechnology* 1993. 11 (4): p. 122-130.
- [50] Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors. M. -P. Marco, S. Gee, y B. D. Hammock. *TrAC Trends in Analytical Chemistry Biosensors for environmental monitoring*. 1995. 14(7): p. 341-350.
- [51] Recent advances in electrochemical enzymeimmunoassays. M. Diaz-Gonzalez, M. B. Gonzalez-García, A. Costa-García. *Electroanalysis*, 2005 ,17(21): p. 1901-1918
- [52] DNA based biosensors. J.H. Zhai, H. Cui, y R. F. Yang, *Biotechnology Advances*, 1997. 15(1): p. 43-58.
- [53] Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. S. Zhang, G. Wright, y Y. Yang. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000. 15(5-6): p. 273-282.

- [54] Voltammetric DNA Biosensor for Cystic-Fibrosis Based on a Modified Carbon - Paste Electrode. K. M. Millan, A. Saraullo, y S. R. Mikkelsen. *Analytical Chemistry*, 1994. 66(18): p- 2943-2948.
- [55] Sequence - Selective Biosensor for DNA - Based on Electroactive Hybridization Indicators. K. M. Millany, S. R. Mikkelsen, *Analytical Chemistry* 1993. 65(17): p. 2317-2323.
- [56] Covalent Immobilization of DNA onto Glassy - Carbon Electrodes. K. M. Millan, A. J. Spurmanis, y S. R. Mikkelsen. *Electroanalysis*, 1992. 4(10):p. 929-932.
- [57] *Chemical sensors and biosensors*. B. Eggins, ed. El. WileyJohn Wiley and Sons. 2002, England.
- [58] On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor. W. Vaiopoulou, P. Melidis, E. Kampragou. *Biosensors & Bioelectronics*, 20025. 21 (2): p. 365-371.
- [59] Rapid detection of viable *Salmonella typhimurium* in a selective medium by monitoring oxygen consumption with electrochemical cyclic voltammetry. C. M. Ruan, L. J. Yang, Y. B. Li. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2002. 519(1-2): p. 33-38.
- [60] *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. 377(3):p.434-445.
- [61] Study of Adrenal-Medullary Tissue-Transplantation to Striatum in Parkinsonism. S. Jiao, W.C: Zhang, J.K. Cao, Z.M. Zhang, H. Wang, M. C. Ding, Z. Zhang, J.B Sun, y C. Sun, y M.T. Shi. *Progress in Brain Research*, 1998. 78:p.575-580.
- [62] Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir-Blodgett films based on functionalized nanoparticles. C. Mediana-Plaza, C-García-Cabezón, C. García-hernández, C. Bramorski, Y. Blanco-Vall, F. Martín-Pedrosa, T. Kawai, J.A. de Saja, M.L Rodríguez-Méndez. *Analytica Chimica Acta* 853, 2015, P. 572-578.
- [63] Guía para la evaluación sensorial de la calidad de los vinos tintos de Rioja Alavesa. Vinos jóvenes y vinos con crianza en barrica. I. E. Alonso, F. J. P. Egea, M.O. Atxiaga, E.G. Estanga. *Colección LUR nº 10 [2007]*. P 23-41 .
- [64] Immobilized Biocatalysis - from simple to Complex-systems. W. Hartmeiner. *Trends in Biotechnology*, 1985. 3(6):p.149-153.
- [65] Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. M. Arroyo. *Ars Pharmaceutica*, 1998, 39 (2): p. 93-157.
- [67] Chemical Cross-linking and the Stabilization of Proteins and Enzymes. S. S. Wong, L. J. C. Wong, *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(11): P. 866-874.

[68] Immobilization of the biological component of biosensors, in *Biosensors Fundamentals and applications*, S. A. Barker, A.P.F.K. Turner, I., Editor. 1987, Oxford University Press: New York.

[69] Use of photopolymerizable membranes based on polyacrylamide hydrogels for enzymatic microsensor construction. C. Jimenez, J. Bartrol, N. F. De Rooij, M. Koudelka-Hep. *Analytica Chimica Acta*, 1997. 351 (1-3): p. 169-176.

[70] Impedimetric Nanostructured Disposable DNA-based Biosensors for the Detection of Deep DNA Damage and Effect of Antioxidants Ziyatdinova, G., Galandova, J. and Labuda, J., (2008), *Int. J. Electrochem. Sci.*, Vol. 3, pp 223-235.

[71] A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W. and Pilloton R., (2010), *Journal of Molecular Catalysis B*, Vol. 64, pp 189-194.

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