



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES
Grado en Ingeniería mecánica

***BIOSENSORES DE PEDOT-PSS.
MODIFICADOS PARA LA
DETECCIÓN DE ANTIOXIDANTES.***

Autora:

García del Río, Sara

Tutora:

García Cabezón, Cristina

Departamento

CMeIM/EGI/ICGF/IM/IPF

Valladolid, Julio 2016

Agradecimientos.

En primer lugar me gustaría agradecer a la profesora D^a Cristina García Cabezón, por toda su ayuda y esfuerzo, toda la dedicación que ha tenido conmigo a lo largo del trabajo, las horas que ha pasado en el laboratorio explicándome y ayudándome, ya que sin su ayuda la realización de este TFG habría sido imposible.

En segundo lugar me gustaría agradecer a Celia García Hernández toda la ayuda que me ha ofrecido, las explicaciones que me ha dado, desde el primer día que empecé este trabajo y toda la paciencia que ha tenido conmigo.

En general, agradecer a toda la gente del laboratorio, tanto de química Inorgánica como de Ciencia de materiales, la ayuda que me han ofrecido en todo momento, y la compañía, ya que han sido muchas horas las que hemos pasado juntos.

A mis compañeros de la carrera, en especial a Teresa, por todos los momentos que hemos pasado juntos, en los cuales ha habido de todo, llantos pero sobretodo risas, ha sido genial habernos conocido.

A mí familia y amigos, por toda la preocupación que han tenido por mí a lo largo de los años de carrera, agradecerles todo el apoyo que me han dado y los ánimos en los momentos más difíciles, los exámenes.

Sobretodo agradecer a mis padres, Rubén A^o García y M^a Elena del Río y a mis hermanos todo el esfuerzo que han realizado para que yo pudiera estudiar, y la ayuda y el apoyo que me han dado a lo largo de toda la carrera, la confianza que han depositado en mí, ya que sin ellos no habría conseguido llegar hasta aquí.

También agradecer a mi novio, Jesús, todo lo que ha hecho por mí, y aguantar mi mal humor de exámenes, la paciencia que ha tenido conmigo y el ánimo que me ha dado.

Gracias a todos de corazón por confiar en que yo podría acabar la carrera de Ingeniería mecánica, en especial a mi tío Damián, que desde el Cielo seguro que está muy orgulloso de mí.

A todos, muchas gracias

RESUMEN

Se han fabricado biosensores de PEDOT-PSS para su uso en la detección de antioxidantes de interés en la industria alimentaria. A estos sensores, se les ha añadido modificadores para mejorar su capacidad electrocatalítica, estos modificadores son ftalocianinas de Lutecio y de Cobre y nanopartículas de Oro. Adicionalmente a estos sensores, se les han añadido dos enzimas, Lacasa y Tirosina con objeto de aumentar su especificidad ante compuestos fenólicos. Inicialmente estos biosensores se han utilizado como sensores voltamétricos para la detección de dos isómeros como son catecol e hidroquinona de gran interés en la industria de la alimentación. El estudio se ha completado con el análisis cinético y la determinación de límites de detección. Se ha observado que en todos los casos se obtienen límites del orden de micromolar, constatando el efecto beneficioso de los modificadores como mediadores electrónicos. Posteriormente se ha construido una red voltamétrica para la discriminación de ocho variedades distintas de vinos. Se han analizado tres lenguas electrónicas diferentes, una a base de biosensores de lacasa, otra con biosensores modificados con tirosinasa y una tercera mezclando ambos tipos de enzimas con objeto de determinar cuál es la red que ofrece mayor capacidad de discriminación de antioxidantes.

Palabras clave: Sensor, biosensor, enzima, antioxidante, ITO.

Abreviaturas y acrónimos:

AuNp: Nanopartículas de Oro

CC: Catecol

HQ: Hidroquinona

LD: Límite de detección

CV: voltametría cíclica

Tyr: Tirosinasa

Lac: Lacasa

Glu: Glutaraldehído

REDOX: Reacción reducción-oxidación

Pc: Ftalocianinas

MPc: Metaloftalocianina

LuPc₂: Ftalocianina de Lutecio

CuPc: Ftalocianina de Cobre.

PCA: Análisis de Componentes Principales

MS: Mencia Secano

MR: MenciaRegadio.

R:Rufete

C: Cabernet

G: Garnacha

T: Tempranillo

JG: Juan García.

PP: Prieto Picudo.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivos	2
CAPÍTULO 2: ASPECTOS GENERALES. FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
2.1. Polímeros conductores.....	3
2.2. PEDOT-PSS.....	5
2.3. Sensores para detección de antioxidantes	9
2.4. Modificadores electrocatalíticos.....	24
2.5. Lengua electrónica.	31
CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.1. Preparación de los sensores.....	35
3.1.1. Materiales empleados.....	35
3.1.2. Preparación de los sensores.....	36
3.2. Preparación de biosensores	43
3.2.1 Materiales empleados.....	43
3.2.2. Preparación de los Biosensores.	43
3.2.3. Preparación de las enzimas.....	48
3.2.4 Preparación de las disoluciones.	49
3.2.5. Análisis de fenoles por voltametría cíclica	52
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1. Detección de antioxidantes mediante Biosensores	59
4.1.1. Caracterización de biosensores en Buffer.....	59
4.1.2. Detección de antioxidantes con biosensores.....	62
4.2. Red de biosensores. Análisis de vinos.....	93
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.	105
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA.....	106

MEMORIA

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

El Grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo fin de grado tiene una línea de investigación basada en el desarrollo de Biosensores para detectar distintos componentes en el campo de la alimentación, en especial en vinos y mostos. Este trabajo se integra dentro de esta línea de investigación, en cuanto a la búsqueda de nuevos modificadores que se pudieran utilizar en sensores basados en polímeros conductores que detecten componentes antioxidantes procedentes de las uvas en mostos y vinos. En concreto, es de gran interés en este campo el estudio de polifenoles y azúcares debido a que son estos componentes de las uvas los que confieren las propiedades deseadas tanto a los mostos como a los vinos, las cuales, son función de la cantidad en que estos componentes estén presentes.

Uno de los principales objetivos es encontrar sensores capaces de caracterizar dichos analitos de forma selectiva, rápida y económica y, ello nos permitirá, obtener unos sensores de elevada selectividad, los cuales han de ser capaces de discriminar las diferentes variedades de vino en función de su contenido en polifenoles. Con este fin, y debido al uso extendido de materiales conductores y modificadores, tanto ftalocianinas, nanopartículas como enzimas, los cuales ayudan a mejorar la respuesta obtenida, se ha pensado que sería muy útil fabricar sensores a base de PEDOT-PSS, copolímero conductor, y modificarlos con sustancias que puedan actuar como catalizadores electrocatalíticos. Finalmente se utilizarán diferentes enzimas con objeto de hacer selectivos nuestros sensores y determinar su capacidad para detectar estos componentes fenólicos, incluso en bajos rangos de concentraciones, ya que es así como se encuentra en los vinos y mostos.

1.2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la obtención de una red de biosensores que conformen una lengua electrónica para el análisis de vinos de diferentes variedades. Para ello hemos de seguir objetivos menores:

- Obtención de biosensores de PEDOT-PSS, modificación de los mismos con dos tipos de ftalocianinas o con nanopartículas de oro y añadir la enzima específica, de modo que sean capaces de detectar antioxidantes.
- Determinación de la capacidad de detección de fenoles, de dos en concreto, como son el Catecol (CC) e Hidroquinona (HQ), comparando la respuesta obtenida con cada uno de los modificadores, y dentro de cada uno de ellos las diferencias existentes en función de la enzima que le hallamos añadido en la fabricación del biosensor.
- Utilizar técnicas de voltametría cíclica que permitirán conocer la respuesta obtenida con cada tipo de biosensor en ocho variedades diferentes de vino, correspondientes a la añada de 2014.
- Evaluar de la capacidad de la lengua electrónica para discriminar diferentes variedades de vinos mediante análisis multivariante de datos (PCA).

CAPÍTULO 2: ASPECTOS GENERALES. FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1. Polímeros conductores.

Los polímeros son conocidos históricamente por sus propiedades como aislantes, sin embargo en la década de los setenta los profesores Alan G. MacDiarmid, Alan J. Heeger y Hideki Shirakawa descubrieron que algunos polímeros son capaces de conducir electricidad.

Los polímeros conductores, son polímeros orgánicos que combinan las propiedades de los polímeros tradicionales, como son las buenas propiedades mecánicas (ligereza, flexibilidad y moldeabilidad), bajo coste y la buena procesabilidad de los plásticos,[1] con una de las propiedades más importantes de los metales, como es la conductividad eléctrica, (son tan buenos conductores de electricidad que reciben el nombre de metales sintéticos), y las propiedades ópticas de los metales. A estas ventajas, hay que añadir, además, la versatilidad química de estos materiales, gracias a la cual se pueden modificar sus propiedades mediante síntesis química.

La capacidad para conducir electricidad de estos polímeros se debe a la adición de sustancias (dopado) y también a la existencia de dobles enlaces alternados con enlaces simples, es decir, pueden conducir electricidad debido a que presentan enlaces deslocalizados, poseen una gran cadena de carbonos con una alternancia de enlaces simples y dobles o triples. En estos polímeros la distancia entre los átomos de Carbono va variando, lo cual hace que disminuya la energía de los electrones π , si los comparamos con sus niveles en otros compuestos que posean las mismas distancias. [2]

Como ya sabemos la conductividad de los materiales se debe fundamentalmente a la libertad de movimiento de algunos electrones que no están unidos a los átomos. Para que este electrón pase del orbital a un estado en el cual tenga libertad de movimiento necesitamos darle al polímero una cantidad de energía suficientemente alta. Es por esto, que se realiza el dopaje de átomos con electronegatividades muy distintas a las del Carbono.

Cuando se dopa un polímero con moléculas, lo que sucede es que estas favorecen la generación de niveles electrónicos, en la zona prohibida de la

estructura de bandas del sólido sintetizado, con lo que deja de ser totalmente aislante y sí permite el paso de la electricidad cuando está dopado, hasta niveles próximos a los de los metales.

La principal diferencia entre los polímeros conductores y semiconductores reside en la movilidad de los electrones, siendo mucho menor en los polímeros conductores. [3]

Entre los polímeros más investigados desde los años ochenta, se pueden destacar los polipirroles, politiofenos, poliacetilenos y polianilinas.

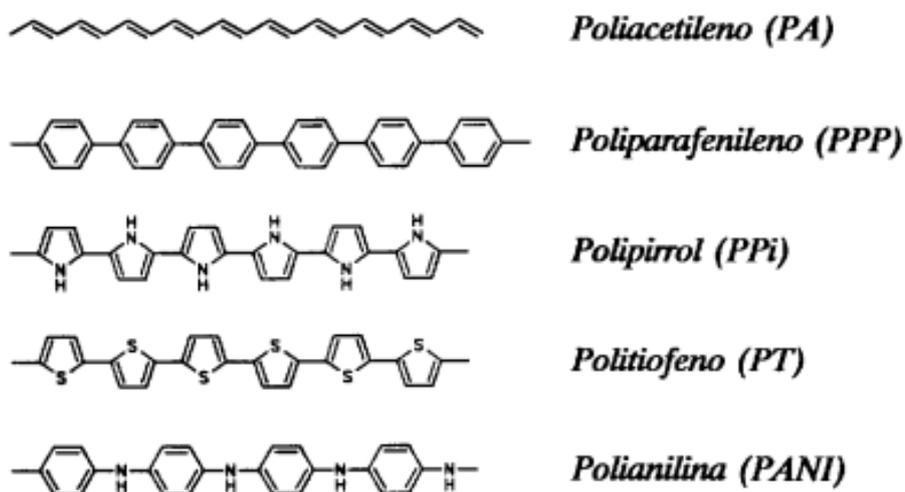


Figura 2.1, Estructura de las cadenas conjugadas de los principales polímeros conductores.

Dopaje de los polímeros:

Como ya hemos dicho estos polímeros son semiconductores y necesitan de dopaje, los polímeros pueden ser dopados mediante la adición de un reactivo químico que oxida o reduce el sistema, lo que hace transitar los electrones de la banda de valencia a la banda de conducción, haciendo que el sistema sea más conductor. Al dopar los polímeros, se pueden producir cambios en sus propiedades, como puede ser, cambio de color, de volumen o porosidad.[4]

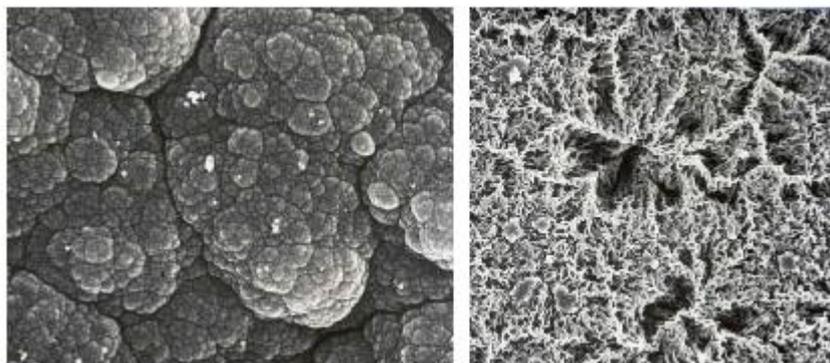


Figura 2.2, Superficie aumentada de Polímeros conductores, superficie exterior (Izq) y superficie adherida al electrodo (der).

El principal método de dopaje se basa en la oxidación-reducción.

Dopaje electroquímico. Se basa en un electrodo recubierto con un polímero y ambos son bañados en una solución electrolítica en la cual el polímero es insoluble. Se aplica un voltaje entre ambos electrodos que provoca un movimiento de la solución de iones y electrones que se fijan entonces sobre el polímero tratado o se escapan.

2.2. PEDOT-PSS

El PEDOT o poli(3,4-etilendioxitiofeno) es un polímero conductor de los más destacados debido a sus buenas propiedades, como son, su alta transparencia, estabilidad tanto electroquímica como térmica, sin embargo, el PEDOT tiene la gran desventaja de ser insoluble. Este polímero puede ser utilizado tanto en el estado oxidado (dopado p) como en el estado reducido. Aunque, debido a que en el estado reducido es inestable en condiciones atmosféricas y tiene una conductividad muy baja, se usa normalmente en su estado oxidado.

El PEDOT se utiliza para recubrimientos antiestáticos y conductores, en componentes electrónicos y pantallas. Tiene un estado catiónico (dopado p) altamente conductor (400-600 S/cm), sin embargo la procesabilidad del PEDOT es muy baja, debido, como ya hemos comentado a su insolubilidad, pero se descubrió que gracias a la adición del poli(estiren sulfonato) (PSS) se

radicaba este problema debido a que el PSS es un polímero soluble que ejerce una función de dopante y dispersante.

PEDOT-PSS o poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato) es un polímero resultante de la mezcla de dos ionomeros, tiene un color azul oscuro, que lo caracteriza. Es eléctricamente estable en su forma dopada positiva, su conductividad es moderada, del orden de 1-10 s/cm, también tiene muy buenas propiedades para la formación de películas.

La presencia del PSS en el complejo tiene dos funciones. La primera es servir como contra catión, para hacer balancear la carga de la molécula de PEDOT. La segunda función, como ya hemos comentado, es la de dispersante de PEDOT en agua, sin embargo, el complejo resultante PEDOT-PSS no es soluble en agua realmente, sino que se forma una microdispersión de partículas de gel estable. [5]

Hemos de recordar que el complejo PEDOT-PSS tiene una alta estabilidad térmica, puede resistir altas temperaturas, incluso de hasta 100°C, durante largos periodos de tiempo sin que sufra cambios notables en sus otras propiedades como por ejemplo, en la conductividad eléctrica o en la transparencia óptica.

En la siguiente imagen podemos ver un modelo estructural del sistema PEDOT-PSS.

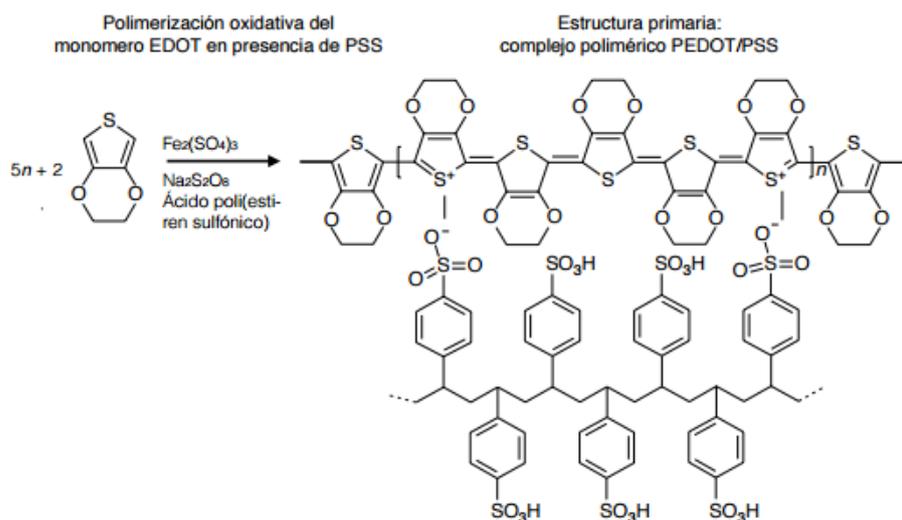


Figura 2.3, Síntesis y estructura primaria del PEDOT-PSS.

En este modelo, los oligómeros del PEDOT están unidos a la cadena de PSS mediante enlaces de tipo iónico. La molécula de PEDOT tiene la tendencia de conservar su linealidad, ya que es una molécula pequeña, como mucho unos 20 monómeros, y a que su cadena principal π -conjugada le aporta rigidez. Se ha determinado que el PEDOT-PSS presenta una alta anisotropía con un orden cristalino muy limitado. [6]

Los modelos de PEDOT-PSS en película revelaron una segregación de fases entre el PEDOT y el PSS, se vio que los granos individuales dentro de la película consistían en una capa exterior rica en PSS, debido a su carácter hidrofílico, conteniendo un centro rico en PEDOT, el cual, como ya hemos comentado posee carácter hidrofóbico.

Una de las principales APLICACIONES que tiene el PEDOT-PSS es en células solares:

La estructura más simple de una celda solar consiste en la capa activa dispuesta entre dos contactos como podemos ver en la siguiente figura. El ánodo, suele ser un conductor transparente, por ejemplo, el óxido de estaño e Indio, (ITO), cubierto con una lámina de un conductor orgánico, el PEDOT-PSS. la cual tiene la función de alisar la superficie y de ayudar a la compactibilidad eléctrica entre el óxido y el semiconductor. El cátodo suele ser un metal, por ejemplo, el aluminio, en algunas ocasiones, se introduce una lámina de calcio o fluoruro de litio entre el cátodo y el semiconductor para así facilitar la extracción selectiva de electrones.

En la siguiente figura podemos ver la estructura de una celda solar, las diferentes capas que la componen:

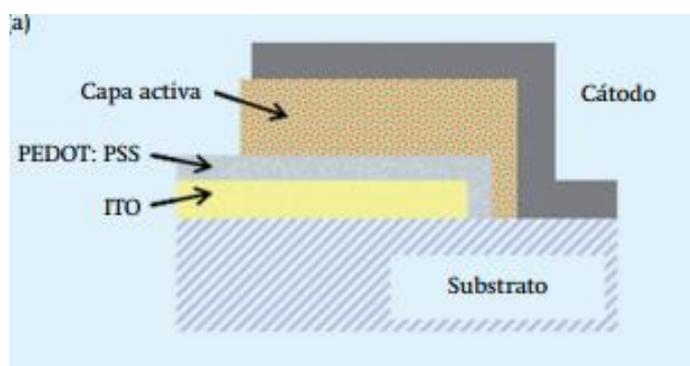


Figura 2.4, Estructura de una celda solar

Los pasos que se siguen en la generación de electricidad en una célula solar son:

- 1- Se absorbe un fotón en el polímero.
- 2- El excitón se difunde dentro del dominio del polímero hasta que alcanza un interfaz con el fullereno.
- 3- Debido a la distinta afinidad electrónica y a la diferencia energética, el electrón salta al fullereno dejando el hueco en el polímero, es decir, se produce una transferencia de carga.
- 4- El excitón se separa en cargas libres las cuales se transportan por dominios de cada uno de los materiales que percolan hasta ser recogidas en los contactos.

Por tanto se necesitan dos semiconductores para que la célula funcione, uno ha de ser tipo p, es decir, dopante de electrones, y el otro de tipo n, es decir, aceptor de electrones.

Otra de las funciones del PEDOT-PSS es su utilización como sensor, un electrodo modificado con poli (3,4-ethylenedioxythiophene) es considerado como sensor amperométrico, pudiendo ser utilizado solo o conjuntamente con otros sensores, que transformen información complementaria, es decir, dentro de una lengua electrónica.[7] Este sensor tiene la función de analizar vinos, a efectos de clasificación y calibración.

El sensor electroquímico desarrollado, permite, también identificar rápidamente muestras cuyos parámetros significativos superan el umbral dado por el control de calidad, impuesto por la industria del vino, como puede ser el S_2O , la intensidad del color y los polifenoles totales.

Como ya hemos dicho, se utiliza el sensor de PEDOT-PSS modificado con compuestos como son las nanopartículas de Au o de Pt incrustadas en la capa de PEDOT, este tipo de sensores se ha utilizado también para medir muestras de vinos, aplicando la técnica de voltametría de pulso diferencial o también mediante voltametría cíclica. Para analizar la señal obtenida se puede hacer, mediante la señal dada por cada uno de los sensores por separado, o los sensores en conjunto, ya sean dos o incluso tres, para así poder comprobar la posible complementariedad de la información presentada por los diferentes electrodos.[8] La capacidad discriminante se ha evaluado basándose en la sensibilidad y la especificidad de la clasificación.

Se están desarrollando, en los últimos años, estos tipos de sensores para formar la llamada, “lengua electrónica”, que como ya he comentado, se utilizan para el análisis y discriminación en mezclas líquidas de complejos. [9]. Este tipo de sensores se ayudan de un software para poder analizar los datos obtenidos, y así poder sacar conclusiones.

Otra de las aplicaciones como ya hemos comentado es su utilización como agente anti-electrostático en recubrimientos como pueden ser, películas cinematográficas, ya que evita las descargas electrostáticas, independientemente de la humedad e incluso para proteger componentes electrónicos. También se utiliza como electrodo transparente, en aplicaciones como pantallas táctiles, LEDs orgánicos y papel electrónico.

2.3. Sensores para detección de antioxidantes

Sensores químicos.

La definición de sensor nos dice que es un dispositivo que se encarga de recibir cierta información del exterior y convertirla en una señal, la mayoría de ellos de tipo eléctrica, la cual puede ser cuantificada y analizada. [10]

Existe una clasificación principal de sensores que se basa en el tipo de información que reciben:

- ❖ **Sensores físicos:** son aquellos que convierten una señal física, como pueden ser presión, temperatura, potencia, etc. y la transforman en magnitudes de tipo eléctrico.
- ❖ **Sensores químicos:** son aquellos capaces de advertir cambios de tipo químico, como composiciones de un analito o pH, y realizar su caracterización por medio de señales eléctricas.

Para la realización de este proyecto hemos utilizado sensores de tipo químico, por lo que se profundizará más en la explicación de su funcionamiento y la base de los mismos:

En la siguiente tabla podemos ver la definición de algunos de estos sensores

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 piezoelectrónicas.
Térmicos	Dispositivos capaces de medir cambio de calor sobre la superficie del electrodo.

Figura 2.5, Clasificación de sensores químicos y biosensores según el transductor utilizado.

Concepto de sensor químico:

Los sensores químicos representan una alternativa a complejos y aparatosos instrumentos de caracterización de analitos, ya que algunas de las principales características de los sensores es que son de pequeño tamaño, tienen una gran capacidad selectiva y su bajo coste, comparando con el de otro tipo de instrumentación.

Actualmente tienen una importancia creciente en la investigación, debido a las necesidades que han surgido de caracterizar un analito en una muestra con un número elevado de componentes o en unas determinadas condiciones.

El funcionamiento básico de un sensor químico se representa en la siguiente figura:

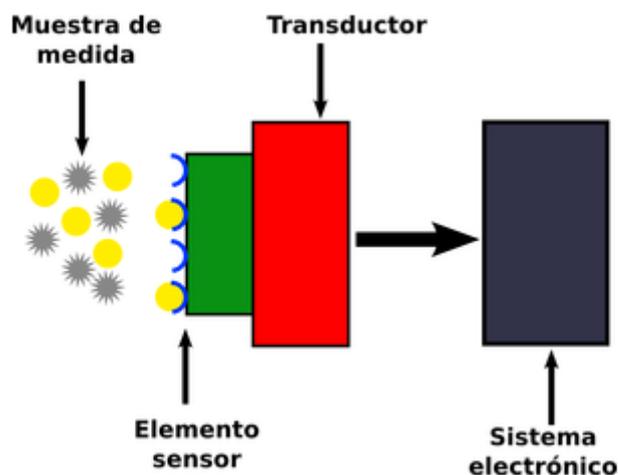


Figura 2.6, Funcionamiento de un sensor químico.

Los elementos principales que componen un sensor químico son:

- Elemento sensor, es el elemento que se encarga del reconocimiento molecular o iónico, este componente también conocido como receptor, es el encargado de reaccionar ante un determinado componente, de la muestra a analizar, o analito de forma selectiva, es decir sólo es capaz de discriminar un único componente.
- Transductor, se encarga de traducir la interacción en una señal procesable. La señal primaria (de tipo másico, electroquímico, etc.) se transforma por medio del transductor en una señal secundaria, de tipo eléctrico para así poderla analizar.
- Sistema electrónico: es el que nos permite el análisis de los datos obtenidos.

Sensores electroquímicos:

Existen diferentes tipos de sensores químicos como por ejemplo, sensores de tipo óptico, de tipo másico, térmico o electroquímico. A lo largo de este trabajo, es este último tipo de sensor químico el que hemos utilizado para la experimentación. Los motivos de esta elección han sido principalmente, el abaratamiento de los costes respecto a otros métodos de análisis, la posibilidad de utilizar cantidades reducidas de analito para su estudio y la ventaja de que se obtiene la señal de forma inmediata con este

tipo de sensores, esto hace que la interpretación de los resultados obtenidos sea directa, además de que no necesitan una instrumentación de elevada complejidad.

Por tanto, en el caso de los sensores de tipo electroquímico, el objeto de estudio es la interacción electroquímica entre el sensor y el analito, que al igual que en los diferentes tipos de sensores que hemos mencionado, se traduce en una señal eléctrica estudiada y caracterizable.

- **Tipo de sensores electroquímicos:**

Los diferentes tipos de sensores electroquímicos existentes son:

- a) Sensores amperométricos: cuyo principio de funcionamiento se basa en el establecimiento de un potencial fijo a un electrodo de trabajo, respecto a un potencial de referencia. Se tendrá una celda electroquímica con estos dos elementos además de un electrodo auxiliar, dentro de esta clasificación podemos encontrar los sensores voltamétricos, los cuales han sido los sensores que hemos utilizado para la realización de este trabajo.
- b) Sensores 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.
- c) Sensores conductimétricos: realizan una medición de conductividad provocada por el analito objeto de estudio.
- d) Sensores impedimétricos: toman como base la espectroscopía de impedancia, es decir miden la impedancia propia de un sistema ante diferentes frecuencias de estudio.

Existe un tipo especial de sensores electroquímicos denominados biosensores electroquímicos en los que se introduce elementos biológicos, en el caso de este trabajo, hemos utilizado enzimas, que explicare a continuación.

Biosensores químicos.

El biosensor químico es un tipo de sensor electroquímico del que se ha hecho un uso extendido en el campo de la investigación científica. La principal

característica de este tipo de sensores consiste en la adición de un componente de tipo biológico como puede ser una enzima, un anticuerpo o un microorganismo. Al igual que los sensores químicos, este tipo de sensores se encargan de transformar una señal química en otra de tipo eléctrico.

Existen diferentes tipos de bioreceptores en función de que se le adicione:

- Anticuerpos
- Ácidos nucleicos
- Microorganismos
- Tejidos orgánicos
- Enzimas

Como ya se ha comentado en este trabajo se ha hecho uso de sensores de tipo enzimático, el sensor de tipo enzimático es el más utilizado para la fabricación de biosensores debido a su bajo coste, alta disponibilidad en el mercado y su fácil manipulación.

Se ha comprobado en numerosos estudios que la adición de enzimas ha aportado a los electrodos una mejor selectividad, mayor efecto autocatalítico y límites de detección más reducidos.

Las enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química, y tienen la capacidad de que reaccionar de manera selectiva con un analito o familia de analitos, provocando que se acelere la reacción química, y sin ellas consumirse. La actividad enzimática, está regulada por el pH del medio, la temperatura y la fuerza iónica.

Existen diferentes tipos de enzimas, clasificadas según el tipo de reacción que llevan a cabo, puede haber, por ejemplo:

- ◆ Oxidoreductasas, catalizan reacciones de óxido-reducción, es decir, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro.
- ◆ *Transferasas*, se encargan de catalizar la transferencia de un grupo químico, de un sustrato a otro.
- ◆ *Hidrolasas*, catalizan las reacciones de hidrólisis.

- ◆ *Liasas*, catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
- ◆ *Isomerasas*, se encargan de interconversión de isómeros.

En este trabajo se han utilizado las oxidoreductasas, las cuales catalizan reacciones de oxidoreducción. Debido a esta capacidad redox, son las más utilizadas para actuar como bioreceptores en biosensores amperométricos [11].

Los principales inconvenientes de las enzimas a tener en cuenta es que pierden su actividad al ser inmovilizadas sobre la superficie del electrodo y tienen un tiempo de vida relativamente corto.

Las enzimas se han de inmovilizar, la inmovilización del material biológico es un proceso mediante el cual se confina el biorreceptor sobre el transductor electroquímico, para así obtener formas insolubles por las cuales se retiene su actividad.

Este proceso de inmovilización, es quizá el proceso más crítico en la fabricación de un biosensor, ya que determina características tan importantes como pueden ser el tiempo de vida, o la sensibilidad.

Las principales ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas son[12]:

- ✓ Aumento de la estabilidad del receptor.
- ✓ Posible reutilización del biosensor, disminuyendo el coste del proceso.

Los principales inconvenientes son:

- ✓ Alteración de la conformación de las enzimas respecto de su estado nativo.
- ✓ Pérdida de la actividad catalítica de las enzimas.

El proceso para inmovilizar las enzimas se puede realizar por diferentes métodos, se dividen en dos grandes grupos: retención física y unión química. De esta forma se pueden encontrar diversas técnicas como por ejemplo:

- Retención física:

1. Atrapamiento.
2. Microencapsulación.
- Unión Química:
 1. Enlace covalente.
 2. Adsorción en la superficie.
 3. Cross-linking (entrecruzamiento)

En nuestro caso se ha utilizado el Glutaraldehído (Glu) como agente de entrecruzamiento.

Cross-linking, entrecruzamiento.

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estabilizar enzimas [13]. Este método está basado en la utilización de reactivos bifuncionales, como por ejemplo, los dialdehidos, disocianatos, sales de bisdiazonio, e incluso, diaminas, si están activadas con carbodimida, que originan uniones intermoleculares entre moléculas de las enzimas. Entre los entrecruzadores más utilizados podemos destacar, el glutaraldehido, hexamentildisocianato.



Figura 2.7, Inmovilización enzimática por adsorción sobre la superficie.

El uso del Glutaraldehido provoca desventajas tales como la interacción de diferentes enzimas en el medio o la desnaturalización de enzimas, lo que provoca una disminución importante de su capacidad biocatalítica.

Durante la realización de este trabajo hemos utilizado los sensores voltamétricos, los cuales se explican a continuación:

Sensores Voltamétricos

Existen diferentes métodos electroquímicos, dentro del campo de la química analítica, que nos permiten analizar un analito. Como por ejemplo:

- Cronoamperometría.
- Conductimetría.
- Voltametría.
- Amperometría
- Cronopotenciometría.
- Gravimetría.
- Electrogravimetria.

De todos estos métodos, nos vamos a centrar en la voltametría, puesto que es el método que hemos aplicado a lo largo del trabajo.

Descripción:

Se caracteriza por ser un método de carácter electrolítico, es decir, se basa en la oxidación y reducción de un analito contenido en la celda electrolítica debido a la aplicación de un potencial a través de un electrodo de trabajo. Las medidas voltamétricas se efectúan cuando en el sistema, el estado de equilibrio no se ha alcanzado aún, y por ende, la señal obtenida es una relación corriente-potencial (I/V). [14]

Las principales ventajas que ofrecen los sensores voltamétricos es que para el análisis multicomponente no se necesita separar previamente los componentes debido a su alta selectividad y sensibilidad, también tiene otras ventajas como son, la alta relación señal-ruido, bajo límite de detección y además que con ellos se pueden utilizar varios modos de medición, por ejemplo, onda cuadrada, cíclica, pulsos, etc.

Este sistema de medida consiste en el establecimiento de una celda electroquímica la cual se compone de tres electrodos: el de trabajo (WE), el

auxiliar o contraelectrodo (AE) y el de referencia (RE), y una disolución en la que se encuentra dicho analito. Se asume que el potencial del electrodo de referencia es constante, y esto hace que el flujo de corriente ocurra entre el electrodo de trabajo y el auxiliar. La reacción de electrolisis se produce en el electrodo de trabajo y este es el proceso responsable de la generación de corriente. Así, la corriente generada es una función de la velocidad o grado de electrólisis, la cual es gobernada por el transporte de especies electroactivas de la muestra (por ejemplo: coeficiente de difusión, concentración de las especies).

El proceso de medida se realiza variando el potencial entre un potencial mínimo y otro máximo, los cuales los tenemos que marcar nosotros. Como ya se ha comentado, la información que se obtiene del analito objeto de estudio es la intensidad de corriente que se produce al ir variando el potencial. Esta información se registra en el sistema electrónico y lo representa en forma de grafico denominado voltamograma, en el cual se representa la intensidad registrada frente al voltaje aplicado.

El fin de este método es posibilitar la detección de una especie electroactiva contenida en un electrolito. Para entender mejor el funcionamiento de la celda electroquímica nos podemos ayudar de la siguiente imagen:

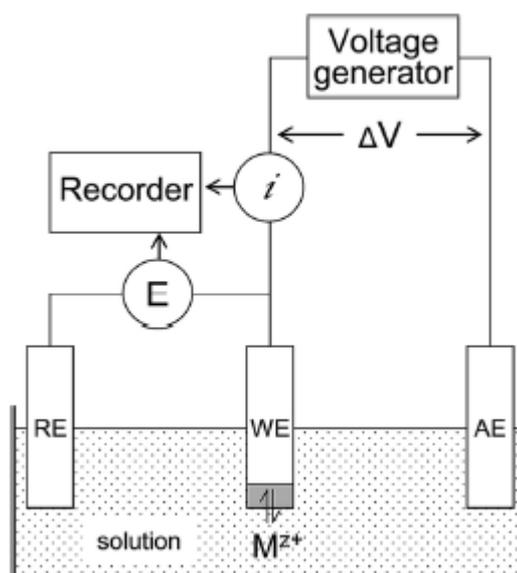


Figura 2.8, Celda electrolítica de voltametría cíclica.

Como podemos ver en la figura, se establece una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (WE) y el electrodo de referencia, como electrodos de trabajo se pueden tener de diferentes materiales como son el platino, mercurio, oro, POLIMEROS CONDUCTORES, etc.

Como electrodo de referencia los que más se utilizan son los de calomelanos saturados y los electrodos de Ag/AgCl. En el caso de este trabajo el que hemos utilizado ha sido el Ag/AgCl, cuya composición principal consiste en un hilo de plata recubierto de una solución de cloruro de plata (AgCl), el cual se introduce una solución de KCl (cloruro potásico).

La función del electrodo de referencia es la de medir la diferencia del potencial que existe entre el electrodo de trabajo y él mismo, siendo el potencial al que se encuentra el electrodo de referencia, como ya hemos comentado, constante.



Figura 2.9, Electrodo de referencia Ag/AgCl.

El tercer electrodo es el electrodo auxiliar o contraelectrodo, fabricado de un material conductor, el cual, como ya se ha mencionado se encarga de transmitir la corriente desde la fuente al electrodo de trabajo, a través del analito. En nuestro caso hemos trabajado con una plaquita de platino como contraelectrodo.

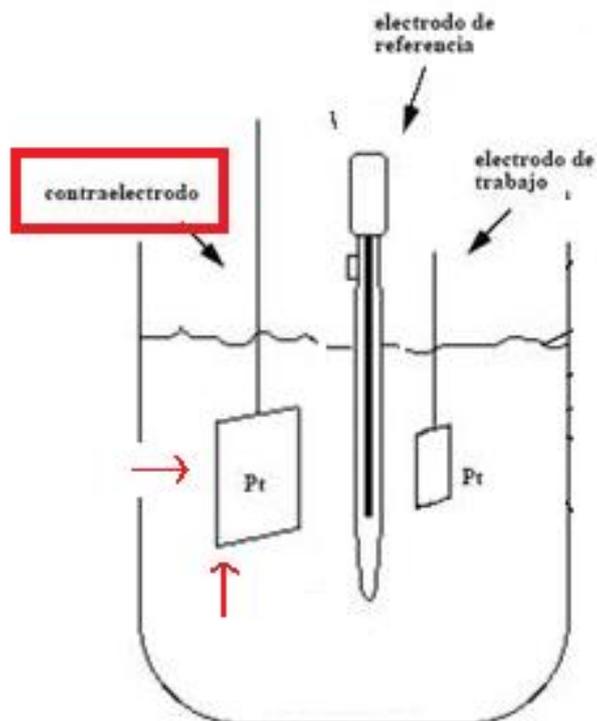


Figura 2.10, Contraelectrodo de platino.

En el instante en que se alcanza cierto potencial para el cual se produce una reacción de oxidación o la de reducción de una de las especies presente en la disolución, se produce un aumento de intensidad considerable, el cual lo podemos ver porque se genera un pico en la respuesta obtenida a través del voltamograma.

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

En el ordenador deberemos tener un software específico, el cual, es el encargado de generar los voltamogramas convenientes con la repuesta obtenida del proceso electroquímico. En la siguiente imagen podemos ver una representación esquemática de todo el conjunto.

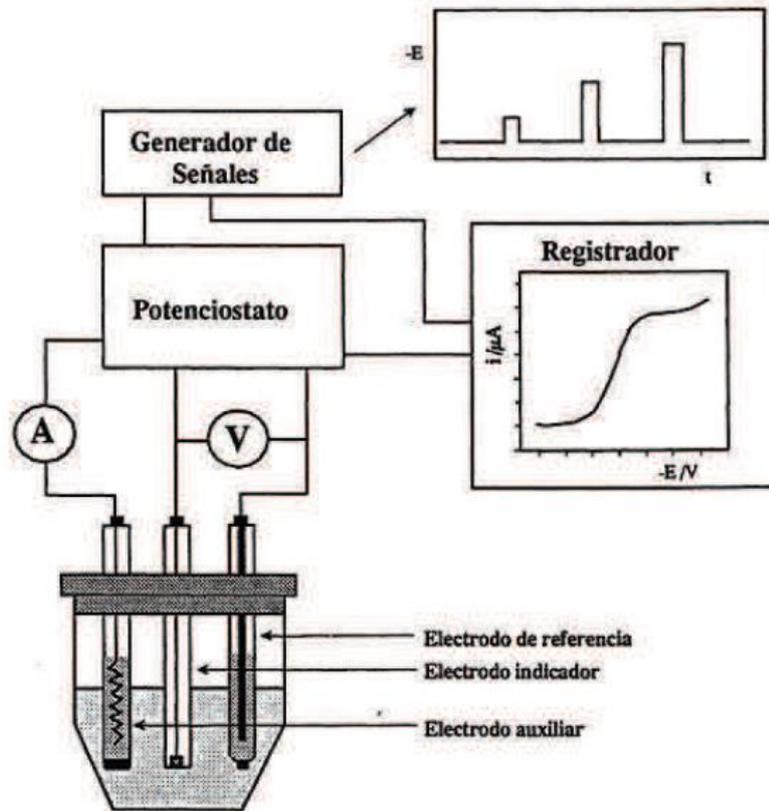


Figura 2.11, Esquema del montaje necesario para la generación de un voltamograma.

Como podemos ver en la imagen aparecen representada la celda y dentro de ella los electrodos, contraelectrodo (auxiliar), el electrodo de trabajo (indicador), y por último el electrodo de referencia.

Tipos de voltametrías.

Existen diferentes tipos de voltametrías en función de cómo se realice el barrido de potencial, como pueden ser:

- i. Voltametría lineal.
- ii. Voltametría de pulsos.
 - i) Voltametría diferencial de impulsos o de barrido en escalón.
 - ii) Voltametría de onda cuadrada.
- iii. Voltametría cíclica.

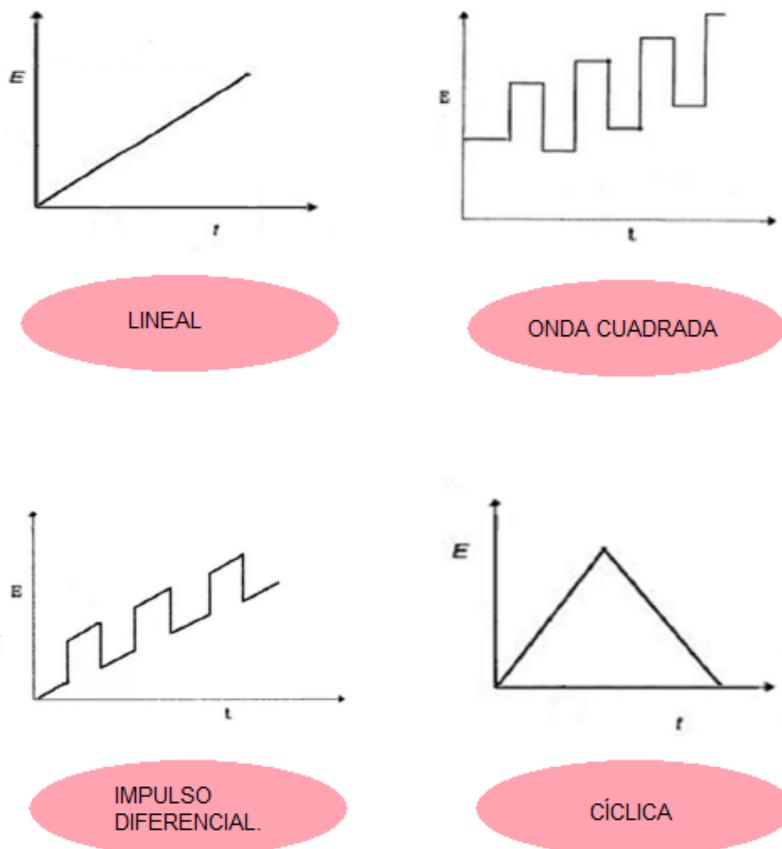


Figura 2.12, Tipos de voltametrías y potencial aplicado en cada caso en función del tiempo.

A lo largo de este trabajo se ha hecho uso de la voltametría de tipo cíclica, por esto vamos a profundizar un poco más en esta técnica:

Voltametría cíclica.

Esta técnica denominada voltametría cíclica (CV), consiste en la aplicación de un potencial a un electrodo de trabajo colocado en la disolución, el potencial aplicado tiene una señal triangular (a velocidad de barrido constante), que varía linealmente en función del tiempo, tal y como podemos ver en la siguiente imagen:

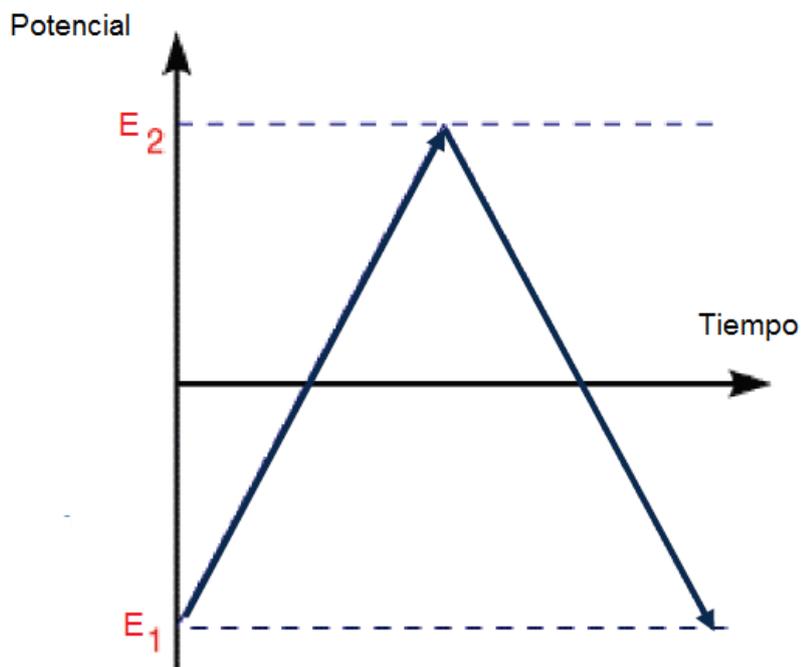


Figura 2.13: Variación del potencial frente al tiempo en una voltametría cíclica.

Para poder llevar a cabo este proceso se deben establecer varios potenciales. En primer lugar, se asigna el potencial de inicio E_1 , el cual, generalmente toma un valor para el que la intensidad se puede considerar despreciable, para así asegurarnos de que el analito no se encuentra ni reducido ni oxidado. A continuación se realiza un barrido lineal de potencial, como ya hemos dicho con la velocidad de barrido constante, hasta el otro potencial que hemos marcado como límite, E_2 . Una vez alcanzado este punto, se invierte la dirección de barrido de forma que se vuelve a alcanzar de nuevo el potencial inicial, E_1 [15].

El potencial E_2 , se elige, de tal forma que al recorrerse el intervalo de potencial, desde E_1 hasta E_2 , se produzca una reacción de reducción y la de oxidación, ya que este es el principal objetivo.

Existen ocasiones en las cuales el barrido que va desde E_2 hasta el inicio, es decir el barrido inverso no tiene como extremo E_1 sino que alcanza potenciales menores, esto se hace en los casos en que sea necesario para caracterizar mejor el analito, o para poder mostrar la reducción, si esta tiene lugar a potenciales más bajos.

Una vez hecho esto ya tendremos representado el voltamograma, es decir, un registro gráfico de la variación de voltaje frente a la intensidad aplicada.

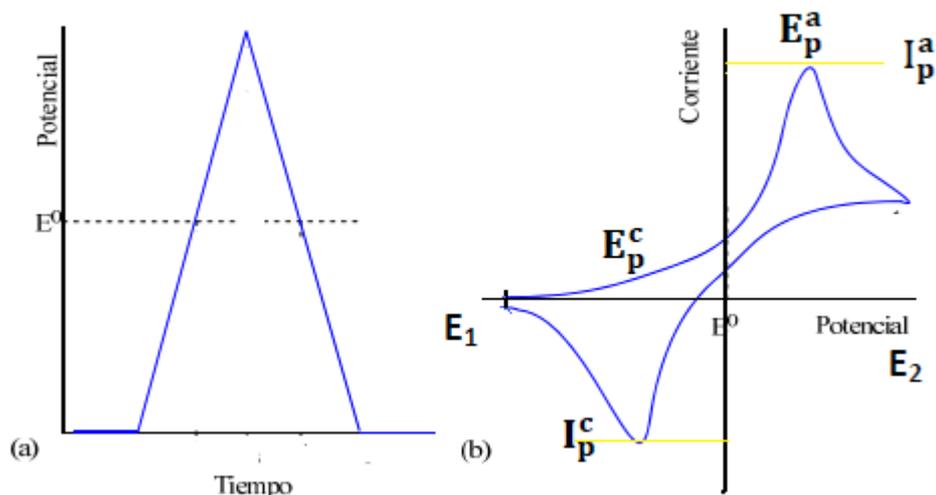


Figura 2.14, Cambio del potencial en función del tiempo junto con curva corriente/potencial resultante en un experimento de voltametría cíclica.

Las intensidades positivas son las intensidades establecidas como corrientes anódicas y las negativas como catódicas. Los picos representan, como hemos comentado ya, la reducción y oxidación del analito. Siendo en el caso de intensidades negativas el pico de reducción, y en el caso de que el pico se produzca en intensidades positivas, se trataría de un pico oxidación. Si nos fijamos en la figura anterior, tendríamos ambos picos, en el caso del pico de reducción viene dado en el potencial E_p^c y una intensidad I_p^c y el pico de oxidación por E_p^a y una intensidad I_p^a .

Gracias a esto podemos caracterizar un analito ya que conocemos sus picos, tanto el de reducción como el de oxidación, la morfología del voltamograma y las intensidades de corriente producidas, otro aspecto a tener en cuenta es la reversibilidad o irreversibilidad del proceso redox, la cual podemos determinar a partir de la respuesta voltamétrica obtenida.

Los parámetros que nos determinan la reversibilidad o irreversibilidad del proceso son:

Un proceso es reversible cuando, al realizar el barrido inverso de potencial, se realiza un desplazamiento a través de las posiciones de equilibrio, reduciéndose el producto de la electrólisis para obtenerse el componente inicial.

Por tanto, un proceso es reversible si se cumplen las siguientes condiciones:

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

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{59}{n} \text{ mV}$$

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

$$\left| \frac{I_p^a}{I_p^c} \right| = 1$$

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

2.4. Modificadores electrocatalíticos

Nanopartículas:

Las nanopartículas de metales nobles, especialmente las nanopartículas de oro (AuNP's), son un material muy atractivo ya que poseen excelentes propiedades físicas: ópticas, electroquímicas o electroestáticas; químicas: reconocimiento molecular, reactividad y biológicas: bioconjugados, ensamblajes ADN-AuNP, sensores de glucosa. Estas propiedades son intrínsecas a su "tamaño nanométrico" y de la forma que estas posean.

Las AuNPs se pueden producir con diferentes tamaños y formas dependiendo de cuál sea el procedimiento experimental por el que se han obtenido. Por ejemplo, al disminuir el tamaño hasta una dimensión nanométrica, se producen cambios considerables en las propiedades ópticas, siendo esto muy notable en las disoluciones de nanopartículas de oro, las cuales adquieren un color distinto en función de cuál sea su tamaño.

En este trabajo hemos empleado las nanopartículas en lo que se conoce como “nanomateriales híbridos”, es decir, deposición o inclusión de nanopartículas metálicas sobre sustratos orgánicos, polímeros obteniendo unas mejoras en las propiedades de los sensores, por ejemplo, mejora la estabilidad, especificidad y sensibilidad.



Figura 2.15, AuNP's con color rosado, aunque anteriormente la disolución es amarillenta.

La preparación de las AuNP's normalmente conlleva la reducción química de una sal de oro en un medio orgánico o acuoso, en presencia de un agente estabilizante o protector, de tal forma que al unirse este a la superficie de las nanopartículas de oro, hace que aumente su estabilidad, neutraliza las fuerzas electrostáticas y provoca que la disolución permanezca estable durante más tiempo.

Las AuNP's se pueden emplear para la modificación de las superficies de electrodos tanto en el caso de la fabricación de biosensores como de sensores químicos. Dentro del campo de los biosensores han sido ampliamente utilizadas para su desarrollo debido a que poseen una excelente capacidad para inmovilizar las biomoléculas.

En el caso de los sensores químicos, las nanopartículas tienen la función de sensor, de forma que catalizan los procesos redox de algunas moléculas de interés, como peróxido de hidrógeno u oxígeno, las cuales participan en reacciones bioquímicas que pueden ser monitorizadas mediante el uso de técnicas electroquímicas. [16]

El oro se usa en forma de nanopartículas, lo cual tiene ciertas ventajas si lo comparamos con usarlo como macroelectrodo, ya que éstas crean una

amplia superficie efectiva con un menor coste. Además, con una pequeña adición de AuNP's se consigue un gran incremento en la señal electroquímica.

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

Ftalocianinas.

La palabra ftalocianina deriva del griego nafta (combustible fósil) y cianina (que se refiere al azul oscuro).

La razón por la cual se modifica la superficies de los electrodos con material electroactivo y electrocatalítico (como pueden ser, ftalocianinas, nanopartículas o polímeros conductores) es que se mejora su selectividad.

La interacción existente entre el electrodo y la disolución mejora de forma extraordinaria la selectividad de los electrodos, las razones por las cuales sucede esto son:

- ◆ La actividad electrocatalítica que posee el material del electrodo puede llegar a facilitar la oxidación/reducción de los componentes que estén disueltos en la muestra.
- ◆ El nivel de oxidación o de reducción que posee la muestra puede modificar el potencial de oxidación del material del electrodo.
- ◆ El nivel de pH (ácido/ básico) de la muestra puede protonar o desprotonar el electrodo.
- ◆ La naturaleza y concentración que poseen los iones de la muestra que difunden hacia el interior del material sensible mantienen la electroneutralidad.

Ftalocianinas como material sensible.

Una ftalocianina (Pc) es un macrociclo simétrico, el cual, está compuesto por cuatro unidades isoindólicas (dos anillos fusionados, uno bencénico y el otro una piridina). La unión de las cuatro unidades se hace mediante cuatro átomos de nitrógeno, dando lugar a un anillo de dieciséis átomos, de los

cuales, ocho son de nitrógeno y ocho de carbono, alternados con dobles enlaces conjugados(N=C) estos átomos poseen 18 electrones tipo π , este tipo de estructura es lo que le otorga una extraordinaria estabilidad térmica y química[17]

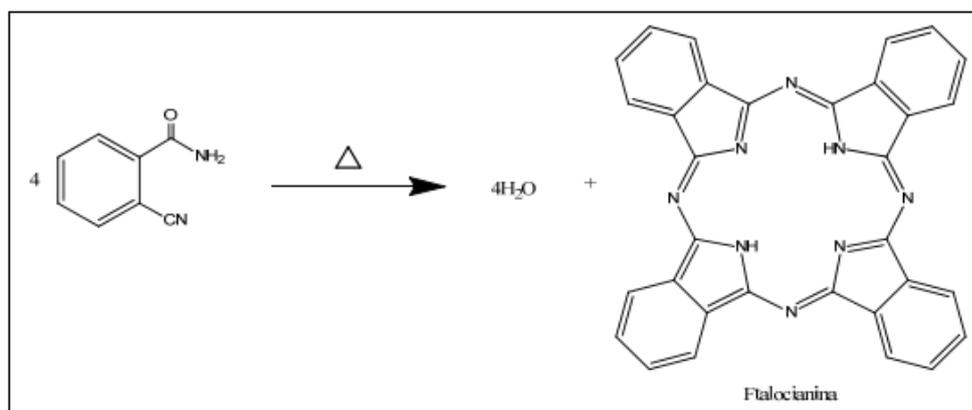


Figura 2.16. Síntesis de Ftalocianina a partir de 2-Cianobenzamida.

Las ftalocianinas tienen un costo moderado de manufactura a nivel industrial, estabilidad química, lo cual significa que mantiene su estructura y propiedades en el tiempo, se usan ampliamente en la industria textil por sus propiedades tintóreas otras cualidades de esta molécula es su versatilidad, flexibilidad de arquitectura y una alta estabilidad a las condiciones del medio ambiente.

Uno de los principales problemas de las ftalocianinas es que poseen una tendencia intrínseca hacia la aglomeración. Este problema es especialmente crítico en medios polares, como por ejemplo, el agua, la cual tiende a autoasociarse y rechazar los sistemas hidrofóbicos π para formar agregados en la solución.[18]

Aplicaciones

La parte central de la molécula se puede coordinar con un átomo metálico, como por ejemplo el cobre, dando lugar a sus derivados. Estos derivados, se suelen emplear como colorantes y pigmentos.

La ftalocianina de cobre, es de las más importantes, se usa como pigmento cian, el cual se obtiene mediante una condensación de cuatro moléculas de ftalonitrilo con cobre. Esta reacción tiene lugar a 200 °C.

Los átomos de hidrogeno se pueden sustituir por átomos de cloro, grupos sulfónicos o cualquier otro sustituyente, de esta forma se obtiene derivados que son de color azul o verde, muy estables a la luz, a las altas temperaturas y a las agresiones químicas.

Como ya hemos mencionado las ftalocianinas (Pcs) son unos compuestos macrocíclicos con una alta estabilidad y que apenas experimentan degradación apreciable a temperaturas tan altas como de 400-550 °C.

Existen algunas ftalocianinas que absorben en el infrarrojo, las cuales se suelen emplear en campos de conversión de energía, (celdas solares y fotovoltaicas), limitadores ópticos. También se está investigando su incorporación en células humanas para el tratamiento de leucemia, aprovechando que estas moléculas manifiestan fluorescencia y esto da la posibilidad de establecer su localización en los tejidos, por lo que es útil en la terapia fotodinámica y el diagnóstico.

Ftalocianinas metálicas (MPcs).

Las ftalocianinas metálicas o metaloftalocianinas (MPcs) son conocidas por el gran interés como conductores eléctricos y sensores químicos. Las ftalocianinas metálicas presentan muy buena estabilidad, por ejemplo se sabe que la ftalocianina de cobre es estable a una temperatura de 900°C.

Sus anillos en forma de disco rígidos pueden fácilmente apilarse en forma de columnas con interesantes propiedades electrónicas y ópticas. La estabilidad de las Pcs en solución, es generalmente, dependiente del metal que forma el complejo, el tipo de solvente, así como la presencia de oxidantes y reductores.

Las principales propiedades de las metaloftalocianinas son:

- **Propiedades ópticas:** las ftalocianinas poseen intensas bandas de absorción, en la región 400-700nm, debido a los enlaces y también poseen coeficientes de extinción molar próximos a $2 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ cuando están disueltas.
- **Semiconductividad:** las metaloftalocianinas tienen un comportamiento como el de los semiconductores de tipo p cuando se están dopadas con oxígeno, siendo el rango de conductividades que presentan de 10^{-10} a $10^{-12} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 300K.

- Propiedades electroquímicas, electrocatalíticas y electrocrómicas: como ya hemos comentado el anillo que poseen las ftalocianinas es un sistema aromático de 18 electrones que en estado neutro posee dos cargas negativas Pc (2). Debido a su estructura electrónica las ftalocianinas se pueden tanto oxidar, dando lugar a las especies Pc (1) y Pc (0), mediante la cesión de uno o dos electrones, respectivamente, como reducir dando lugar a las especies Pc (3-), Pc (4-), Pc (5-) y Pc (6-) en diferentes etapas, las cuales implican de uno a cuatro electrones. El potencial electroquímico al cual tienen lugar las reducciones y oxidaciones depende de la naturaleza de la clase de ftalocianina, ión central y a la presencia de sustituyentes en el anillo aromático.

Durante la realización de este trabajo las ftalocianinas que hemos utilizado han sido la de cobre (CuPc) y lutecio (LuPc₂).

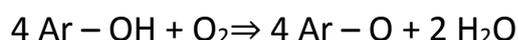
Ftalocianina de cobre (CuPc)

Algunos polímeros tales como polianilina, polipirrol y politiofenos se han funcionalizado con ftalocianina de cobre (CuPc) mediante el método de oxidación química con el fin de evaluar su respuesta como detectores de dióxido de nitrógeno.

Enzimas Lacasa y Tirosinasa.

◆ Lacasa.

La Lacasa es un enzima que pertenece al grupo de las Oxidasas de cobre azul. Catalizan la oxidación de un sustrato orgánico o inorgánico y la reducción de oxígeno molecular a agua, por medio de un mecanismo de transferencia de un electrón tal y como se muestra a continuación:



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

◆ Tirosinasa.

La tirosinasa es una enzima también llamada monofenolmonooxigenasa o catecol oxidasa. La tirosinasa tiene la capacidad de catalizar la oxidación de fenoles, por esta razón se ha empleado en este trabajo para la detección del Catecol y la Hidroquinona.

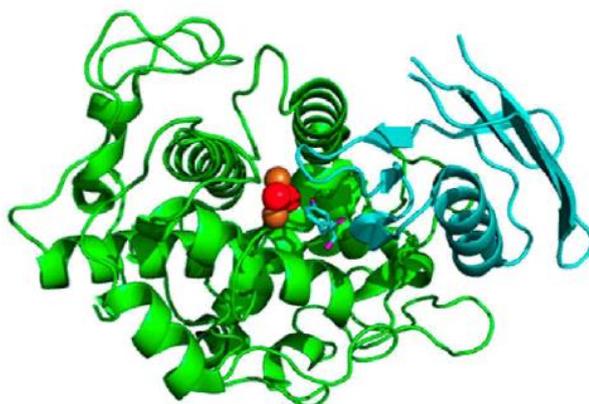


Figura 2.16; Modelo 3D de la estructura de la enzima tiroxinasa.

Con la oxidación de un fenol en presencia de tirosinasa, usando O_2 , para dicha reacción, se obtiene la formación de un difenol como es el Catecol, y si a ese Catecol lo volvemos a someter a una oxidación, obtendremos como productos de dicha reacción, Benzoquinona y agua, como podemos ver en la siguiente figura:

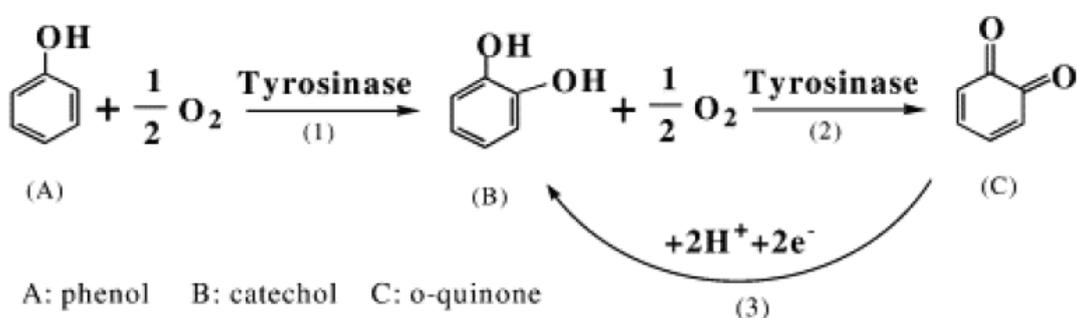


Figura 2.17; 1ºPaso: Reacción de oxidación de un fenol en presencia de la enzima Tyr, 2ºPaso: Reacción de oxidación del Catecol en presencia de la enzima Tyr.

2.5. Lengua electrónica.

La industria alimentaria tiene una legislación cada vez más estricta en cuanto a la calidad de los productos. El éxito de un alimento en el mercado, el cual cada vez es más competitivo, lo marca el sabor y el aroma de dicho alimento. Actualmente, el método principal de evaluación del sabor en la industria alimentaria consiste en análisis sensoriales, los cuales los realizan evaluadores experimentados llamados panelistas sensoriales, que se encargan de la prueba de las muestras para evaluarlas. Por lo tanto, este tipo de análisis tienen algunas desventajas como son la baja objetividad y reproducibilidad, e incluso la gran tensión que tienen que soportar los panelistas, también hay que tener en cuenta que una cata prolongada produce la saturación de los órganos receptores del sabor. Para acabar con estos problemas, se ha creado una tecnología sensorial, la cual sirve para discriminar y cuantificar el sabor que poseen los alimentos y bebidas de forma objetiva, denominada LENGUA ELECTRÓNICA.

Las lenguas electrónicas, tienen la función de clasificar, distintos sabores, detectar cual son los productos que alteran la calidad de los alimentos, también detectan los productos que son contaminantes, es decir, impurezas y sustancias tóxicas.

La definición de lengua electrónica es “sistema para análisis de líquidos basado en una matriz de sensores acoplada a un software de reconocimiento de patrones”. El nombre de lengua electrónica se debe a que las lenguas electrónicas operan de forma similar al sentido del gusto humano.

La similitud existente entre la lengua biológica y la lengua electrónica se da en cada una de sus etapas. Así, en los sistemas de lengua electrónica, lo que en lengua biológica es alimento, son muestras de carácter líquido, las cuales al mantener un contacto íntimo con los sensores actúan de forma similar a la relación de los alimentos con las papilas gustativas.

La principal ventaja que presentan las lenguas electrónicas, frente a los métodos de cata convencional es que estas se pueden aplicar en flujo continuo para el control en procesos en línea en la industria, mientras que no se puede tener a un experto catador de forma continua analizando catas, como hemos dicho anteriormente. También hay que tener en cuenta que se pueden utilizar para reconocer adulteraciones en los productos elaborados.

Existen diferentes tipos de sensores, los cuales poseen diferentes tipos de sensibilidad, al igual que ocurre en la lengua biológica, en la cual existen

diferentes papilas gustativas, con diferentes gustos. En la lengua electrónica, las medidas que realizan los sensores adquieren forma de señal eléctrica, la cual se suele acondicionar, antes de ser transmitida a un ordenador. Esto es aproximado a lo que ocurre en el cuerpo humano, ya que los nervios sensitivos del gusto transmiten la señal nerviosa al cerebro.

Una vez que los datos están en el ordenador, se realiza un análisis de datos, del cual se obtiene patrones de medidas, e incluso se pueden realizar clasificaciones por analogías mediante el software adecuado, este proceso del ordenador, en la lengua biológica, equivale al trabajo que realizan las neuronas del cerebro en procesar la información de la memoria y asociar el nuevo producto tomado a un sabor conocido.

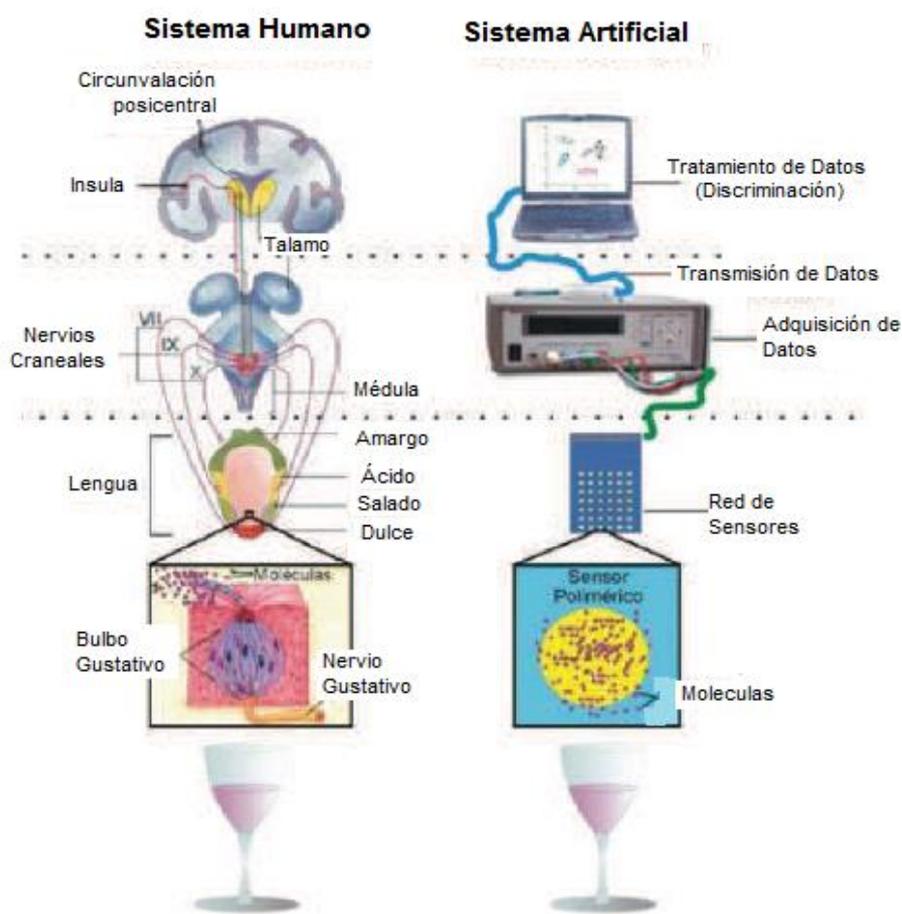


Figura 2.18, Paralelismo del sistema gustativo humano y de las lenguas electrónicas.

La IUPAC define lengua electrónica como: “sistema de multisensores, consistente en un número de sensores poco selectivos, los cuales utilizan procedimientos matemáticos avanzados para el proceso de la señal basados en el reconocimiento de patrones y/o en análisis de datos multivariados, utilizando Artificial Neural Networks (ANNs), Principal Component Analysis (PCA),[19];

Los sensores biológicos no suelen reconocer sustancias químicas de forma individual. Cada uno de los receptores de los cinco sabores básicos(dulce, amargo, salado, agrio, umami) recibe de forma simultánea múltiples sustancias químicas, tienen un comportamiento semiselectivo.

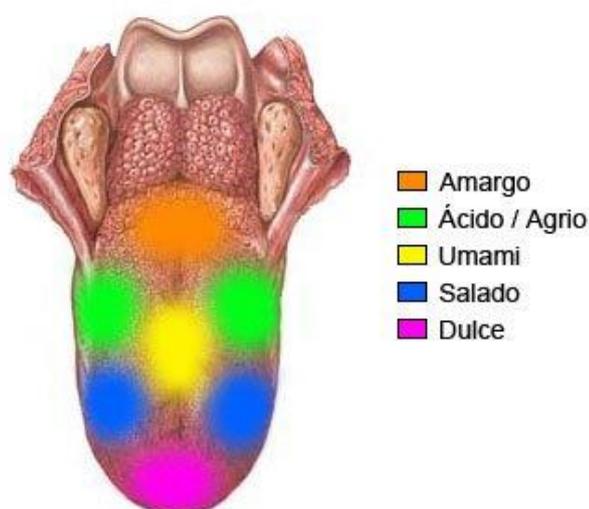


Figura 2.18, Mapa de los sabores en la lengua.

Es prácticamente imposible medir por métodos analíticos químicos el sabor de alimentos o bebidas ya que estos contienen varios cientos de sustancias gustativas, algunos de estos métodos analíticos son: cromatografía de gases o cromatografía líquida, que si pueden ser utilizados para medir la concentración de sustancias químicas.

Es importante tener en cuenta que los gustos en los alimentos son independientes, es decir pueden existir interacciones entre los diferentes gustos (por ejemplo, cuando le añadimos sal a un filete, sabor del filete cambia de forma radical).

Las lenguas electrónicas se suelen utilizar para obtener datos cualitativos sobre las muestras a estudio. Se combinan diferentes sensores químicos no

específicos, los cuales poseen una sensibilidad parcial, y esto da lugar a una sensibilidad cruzada. La respuesta que da la Red de sensores que forman la Lengua Electrónica frente a una muestra a analizar es una colección de señales y estas señales son la que se pueden relacionar a ciertas cualidades o características de la muestra utilizando el software apropiado. [20]

El principal objetivo de las lenguas electrónicas es, por tanto, el de discriminar y analizar alimentos y bebidas contribuyendo a la gestión de la calidad.

CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describirán los materiales, instrumentos, metodologías y condiciones experimentales llevadas a cabo durante la ejecución del proyecto de desarrollo de sensores poliméricos destinados a la detección de antioxidantes, lo cual implica la fabricación de los sensores y biosensores y el ensayo de estos en Hidroquinona y Catecol y en vinos. Finalmente el objetivo es su aplicación en vinos generando una lengua electrónica.

3.1. Preparación de los sensores.

3.1.1. *Materiales empleados*

Para llevar a cabo la preparación de los sensores, tanto los de PEDOT-PSS como los modificados, hemos hecho uso del siguiente material de laboratorio.

- Vidrios de reloj
- Balanza analítica
- Ultrasonidos
- Spin-Coating
- Horno
- Pipetas
- Agua, acetona, lavavajillas de mano.
- Multímetro
- Matraces
- Vasos de precipitado.

- Horno.
- Guantes de latex
- Cuter, tijeras.
- El agua que se emplea es agua ultra pura desionizada (MiliQMilipone) con resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}(25^\circ\text{C})$



Figura3.1, Unidad de ultrapurificación

aguaMiliporeMiliQ

3.1.2. Preparación de los sensores

Los sensores se han preparado sobre la superficie de ITOs, Para preparar los sensores, se parte del ITO perfectamente limpio, para hacer la limpieza de los mismos se necesita lavavajillas y acetona, se echan ambos en un vaso de precipitados junto con los ITOs y se ponen en el ultrasonidos 10 minutos, después se enjuaga uno a uno con agua y se vuelven a poner en el ultrasonidos, esta vez solo con el lavavajillas, otros 10 minutos, cuando ha pasado este tiempo, hay que volverlos a enjuagar perfectamente con el agua y se sumergen en la acetona, poniéndolos en el ultrasonidos durante otros 10 minutos, una vez ha transcurrido este tiempo se enjuagan con agua del grifo y finalmente con agua desionizada y se dejan secar al aire.

Para ponerlos a secar deberemos saber cuál es la cara ionizada, para ello haremos uso del multímetro, el cual, tiene una opción (logín) que nos permite hacerlo.

Cuando están perfectamente secos se colocan, siempre con la cara que conduce electricidad hacia arriba, en el Spin-Coating para proceder a la deposición de una capa fina de PEDOT-PSS.

Y se frotran con un paño especial impregnado de acetona para así asegurarnos de que están perfectamente limpios.

Los pasos a seguir para preparar los sensores de PEDOT-PSS son:

- DEPOSICIÓN PEDOT-PSS. A estos “cristalitos”, ahora que ya están perfectamente preparados deberemos añadirles el PEDOT-PSS, se utiliza una solución comercial diluida 1:10, el cual habremos preparado previamente y metido en el ultrasonidos, unos tres minutos, para que esté perfectamente disuelto al depositarlo sobre el ITO.

La cantidad de PEDOT-PSS a añadir en cada ITO es de 100µl, para llevarlo a cabo nos ayudaremos de un pipeta de precisión, la cual también nos ayudará a repartir bien el PEDOT-PSS por toda la superficie del ITO, una vez ya se lo hemos añadido a todos los ITOs, encendemos el SPIN-COATING y lo ponemos para que alcance las 1200 rpm, siempre poniendo la tapa de seguridad, por si salta alguno.



Figura 3.2, ITOs limpios a los cuales se les ha añadido PEDOT-PSS.

- **CURADO:** Una vez ha terminado el SPIN-COATING, despegamos los ITOs, esta es la parte más complicada del proceso, porque están muy bien pegados y para no quitar la capa de PEDOT-PPS apenas se los puede tocar, como mucho por las esquinas, lo cual hace muy complicado despegarlos. Una vez hemos conseguido retirarlos los tenemos que meter en el horno, a 150°C durante 15 minutos.



Figura 3.3, Horno en el cual se realiza el curado de los ITOS A 150°C.

- Al sacarlos del horno, los debemos dejar enfriar a temperatura ambiente, es conveniente hacerlo en el mismo recipiente en el cual los hemos metido en el horno, para que así el enfriamiento no sea un proceso brusco.

Para manejar los sensores como ya he mencionado hay que tener mucho cuidado por ello, en todo momento hemos empleado las pinzas de un material plástico para no rallar y por tanto quitar las capas.



Figura 3.4, Pinzas de plástico utilizadas para no rallar los sensores.

Preparación de sensores de PEDOT-PSS modificados:

Algunos de estos sensores de PEDOT-PSS les hemos modificado con ftalocianinas o bien con nanopartículas, las ftalocianinas que hemos empleado a lo largo de este trabajo han sido LuPc₂, CuPc. y nanopartículas de oro, AuNPs

El procedimiento para modificar los sensores ha sido el siguiente:

Una vez se ha enfriado la capa de PEDOT-PSS después del curado, continuamos con el proceso, LuPc₂.

- Los volvemos a colocar en el Spin-Coating, esta vez este proceso es más crítico, porque ahora no se puede apenas manipular los ITOs, para no quitar la capa de PEDOT-PSS, y cuesta mucho más que se queden pegados durante el centrifugado.
- Añadimos con una pipeta de precisión, el LuPc₂, 100µl, intentando que se extienda por toda la superficie, pero sin tocar con la punta de la probeta la superficie del ITO, porque en ese caso se destruiría la capa de PEDOT-PSS. Volvemos a poner el Spin-Coating a 1200 r.p.m.



Figura3.5, ITOs colocados en el Spin-Coating con el LuPc₂ antes de que se centrifuguen.

- Lo introducimos en el horno a 150°C durante 15 minutos, para el curado de la capa de LuPc₂.
- Pasados los 15 minutos, se deja enfriar al aire, y cuando ya está frío se meten en el frigorífico para que conserve las propiedades.
- Para la capa de CuPc y AuNP hacemos lo mismo que hemos hecho con el Lutecio, pero en este caso añadimos 200 µl, puesto que estos dos compuestos son mucho más densos que el Lutecio y cuesta más repartirlos por toda la superficie del ITO.



Figura 3.6, ITOs que ya tienen una capa de PEDOT-PSS a los cuales se les ha añadido 200 μ l de CuPc.



Figura 3.7, ITOs que ya tienen una capa de PEDOT-PSS a los cuales se les ha añadido 200 μ l de Au NP.

Cuando ya tenemos todos los sensores fríos, ya los tenemos preparados para poder medir, es decir tenemos una red de sensores de cuatro tipos:

1. PEDOT-PSS
2. PEDOT-PSS+LuPc₂
3. PEDOT-PSS+CuPc
4. PEDOT-PSS+AuNP



Figura 3.8, Sensores ya terminados guardados en el recipiente en cual los conservábamos en el frigorífico.

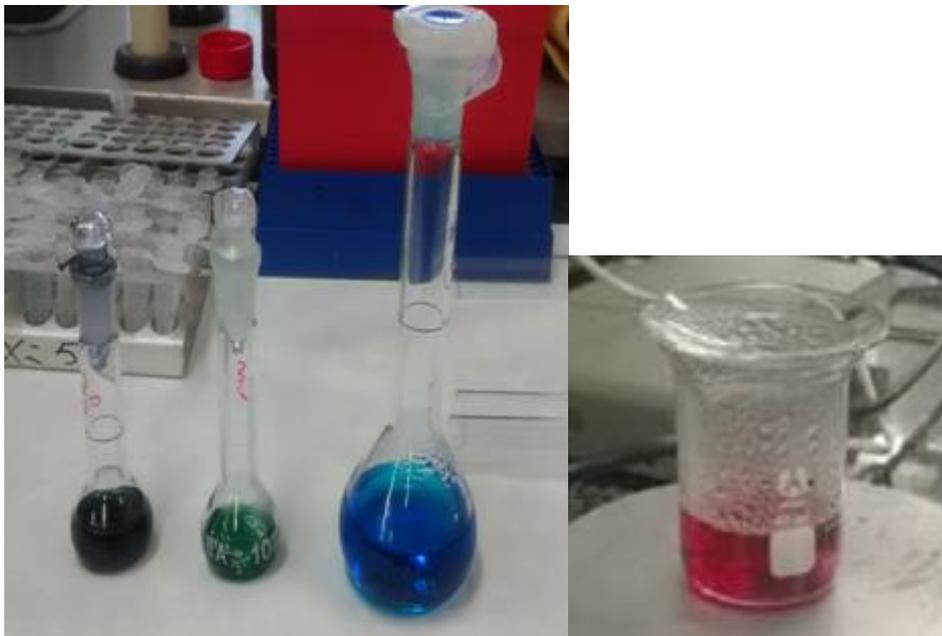


Figura 3.9, De izquierda a derecha: aparecen la disolución de PEDOT-PSS, LuPc₂, CuPc y nanopartículas de oro.

3.2. Preparación de biosensores

3.2.1 *Materiales empleados:*

- Vaso de precipitados.
- Micropipeta.
- Parafilm.
- Tijeras
- Cúter
- Lamina de plástico.
- Guantes de latex
- Pinzas de plástico.
- Pipeta
- Campana extractora.

3.2.2. *Preparación de los Biosensores.*

Sobre los distintos sensores explicados anteriormente se desarrollará la adición de enzimas para aumentar su especificidad. Ensayaremos con dos enzimas diferentes, tyroxinasa y Lacasa.

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

Preparación de los biosensores, la superficie que tienen los ITO'S es demasiado grande y para asegurarnos de que la enzima cubre toda la superficie lo que hacemos es tapar un poco menos de la mitad del ITO con parafilm.

1°- Se limpia el electrodo sumergiéndolo parcialmente en una disolución de buffer 0,01M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaH}_2\text{HPO}_4$) durante dos minutos, se deja secar, puede que nos queden gotas muy grandes de buffer y esto impide que el secado sea rápido, para solventar este problema lo que hacemos es ayudarnos de la gravedad, es decir, colocamos los sensores de forma vertical, para que así las gotas se caigan, en caso de que esto no funcione lo que podemos hacer es con mucho cuidado, coger un trozo de pañuelo y con la punta colocándola encima de la gota, pero sin tocar la superficie del sensor, para así eliminar la gota gracias a la absorción del papel.

2°- Previamente a la adición del enzima debemos haber sacado las enzimas del congelador para que cuando las adicionemos al sensor este perfectamente líquida. Para ayudar a que esté disuelta por completo, y con la ayuda de una pipeta, cogemos un poco de la enzima y la volvemos a echar dentro del eppendorf, este proceso lo debemos hacer muy lentamente para así evitar que la enzima se haga espuma y nunca sacar la punta del líquido, lo realizamos varias veces hasta que vemos que el enzima está perfectamente disuelto.

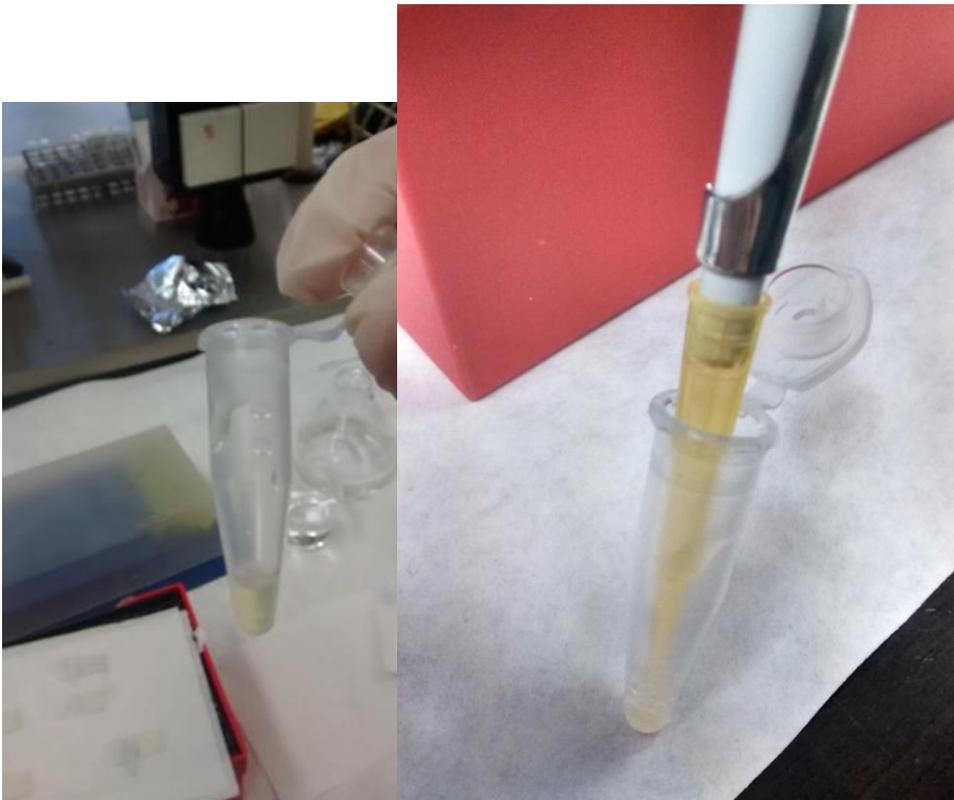


Figura3.10, derecha: la enzima cuando ya se ha descongelado dentro del eppendorf ,Izquierda: Método de agitación de la enzima.

Se coloca una gota (10 μ l) de la enzima mediante una micropipeta sobre la película que ya tenemos echada (PEDOT-PSS, LuPc₂, CuPc, AuNP).

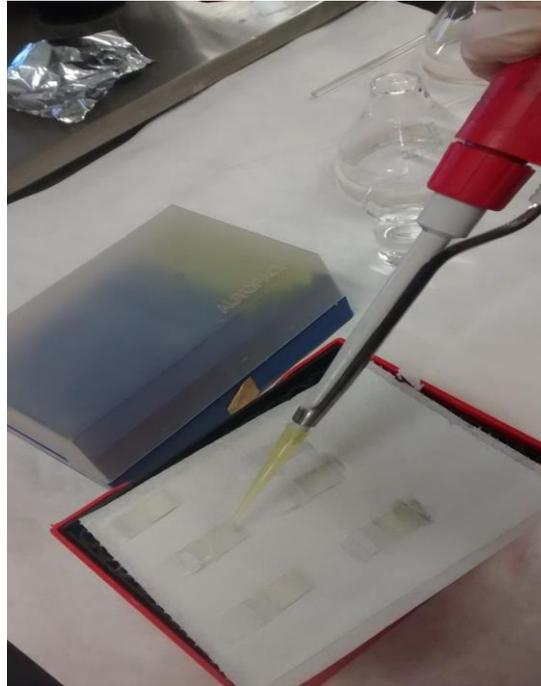


Figura 3.11, Proceso mediante el cual se añade la enzima en el sensor gracias a la micropipeta.

3º- Lo dejamos secar al aire durante quince minutos, o más, hasta que esté completamente seco.

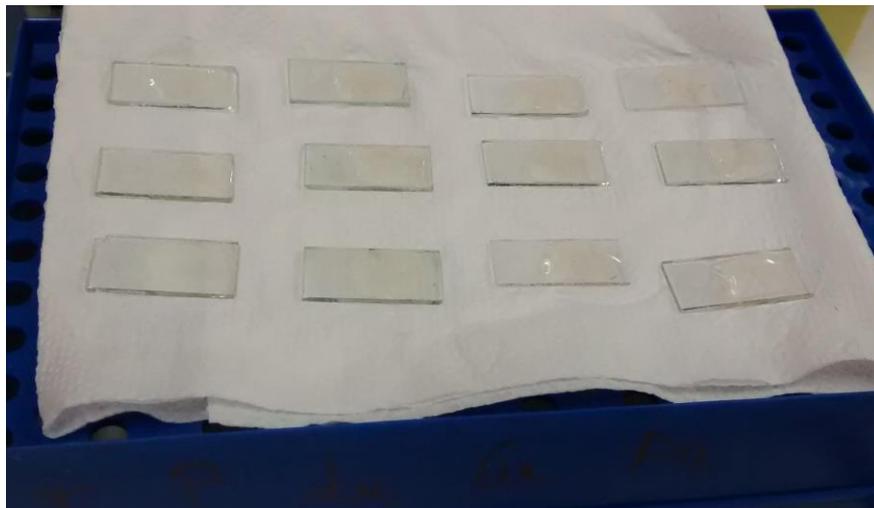


Figura 3.12, Los biosensores a los cuales se les ha añadido la gota de enzima esperando a secarse.

4°- Volvemos a echar otra gota, extendiéndola por toda la superficie del ITO y de nuevo esperamos a que se seque.

5°- Cuando ya están secos, se colocan en los vapores de glutaraldehído durante veinte minutos, para ello se ha diseñado una tapa con diferentes ranuras del mismo largo que los ITOs, para que queden sujetos en ellos, el ancho de estas ranuras es mayor al ancho del ITO para evitar que al introducir el biosensor en la ranura se roce la capa de enzima y se desprenda, debemos intentar mantener los sensores verticales, como podemos ver en la figura 3.13

Este paso se hace para crear enlaces entre las enzimas y aumentar su estabilidad.



Figura 3.13, Biosensores de Lacasa colocados a los vapores del Glutaraldehído.

6°- Pasados los veinte minutos los retiramos de dichos vapores, los debemos dejar secar durante quince minutos, y el glutaraldehído lo demos congelar, para así poderlo utilizar en futuros procesos.

7°- Se vuelven a sumergir en Buffer, esta vez durante treinta segundos, con el fin de mantener mejor las enzimas.

8º- Finalmente se guardan en una nevera, para conservar las enzimas.

De este modo tendremos una red de biosensores diferentes.

- ✓ PEDOT-PSS Lacasa,
- ✓ PEDOT-PSS Tyroxinasa,
- ✓ PEDOT-PSS Tyroxinasa,
- ✓ PEDOT- PSS LuPc₂.Lacasa.
- ✓ PEDOT- PSS LuPc₂-Tyroxinasa.
- ✓ PEDOT-PSS CuPc-Lacasa.
- ✓ PEDOT-PSS CuPc-Tyroxinasa.
- ✓ PEDOT-PSS AuNP-Lacasa.
- ✓ PEDOT-PSS AuNP-Tyroxinasa.

Estos biosensores están ya preparados para ser usados inmediatamente para la realización de las mediciones que se deseen hacer, pero también se pueden guardar en la nevera, durante un tiempo, tampoco puede ser un gran periodo de tiempo debido a que las enzimas pierden sus propiedades.

Modificación del método de creación de Biosensores.

Para hacer los biosensores cambiamos los pasos:

El primer paso es idéntico, es decir los introducimos durante dos minutos en el buffer fosfato y esperamos a que se seque.

El cambio viene en que en vez de añadir una gota de 10microlitros, dejar secar y después volver a añadir otra de la misma cantidad, lo que hacemos es añadir una gota de mayor cantidad, de 25µl, lo cual hace que el secado de la misma sea mucho más lento, ahora lo tenemos que dejar secar aproximadamente durante dos horas, Esta modificación se lleva a cabo ya que las primeras pruebas con los biosensores iniciales no dieron los

resultados apetecibles debido a que la cantidad de enzima depositada no era insuficiente.

Una vez que se ha secado lo metemos al igual que antes en los vapores de glutaraldehído durante veinte minutos y al sacarlos se dejan secar quince minutos y se sumergen en el Buffer durante treinta segundos y ya tendremos preparados los biosensores con este nuevo método.

3.2.3. Preparación de las enzimas

La preparación de las enzimas es un proceso bastante delicado, porque hay que mantener las enzimas siempre en frío.

Tenemos que quemar la varilla con la que vamos a coger la enzima.

Para mantener siempre en frío las enzimas lo que hacemos es coger hielo y picarlo, lo echamos en un bol y en él metemos el bote que contiene las enzimas.

Para pesar la cantidad de enzima, nos debemos ayudar de un eppendor, el cual debemos poner en la báscula y pesarlo y sin moverlo de ella, añadimos las enzimas calculando la cantidad que tenemos que añadir, sumando el peso del eppendor, una vez que ya lo hemos pesado, rápidamente debemos echar el buffer y agitamos con ayuda de la pipeta hasta que queda bien disuelto, esto lo debemos hacer con cuidado y despacio para que no salga espuma y siempre manteniendo el eppendor que contiene el enzima en el hielo.

Una vez lo tenemos bien disuelto, echamos en los eppendor la cantidad deseada, bien 50 μ l o 100 μ l, los eppendor los tenemos introducidos en el hielo y colocados verticalmente para que el llenado sea más rápido y asegurarnos de que las enzimas se mantienen siempre en frío.

Cuando ya tenemos todos llenos los metemos en el congelador, donde pueden estar durante mucho tiempo una vez que están congeladas.

3.2.4 Preparación de las disoluciones.

Durante la realización del proyecto hemos empleado varias disoluciones para comprobar los sensores. El agua que se ha utilizado como disolvente en estas disoluciones es agua ultrapura destilada y desionizada, con la máquina que hemos explicado anteriormente (en los materiales empleados en la creación de sensores).

Para la medición de las diferentes cantidades necesarias que empleamos en cada una de las disoluciones se ha empleado una balanza digital analítica precisa de 125A, como la que podemos ver en la siguiente imagen:



Figura 3.14, Balanza analítica de precisión precisa 125^a

Para la perfecta disolución de los reactivos hemos empleado el dispositivo, que ya hemos comentado anteriormente el ultrasonidos Selectra Ultrasons, el cual podemos ver en la siguiente imagen:



Figura 3.15, Dispositivo de ultrasonidos SelectraUltrasons.

A continuación se presentan las distintas disoluciones empleadas durante la realización de este trabajo:

◆ **Solución de cloruro potásico (KCl) 100ml 0.1M.**

Cogemos 0.7518g de KCl los cuales pesamos en la balanza de precisión colocados en un vidrio de reloj, los disolvemos en agua ultrapuradesionizada. Esta disolución se usa como base para medir los electrodos y comprobar que funcionan de manera adecuada, y como disolvente para preparar disoluciones de Catecol e Hidroquinona.

Esta disolución es la que contiene el electrodo de referencia.

◆ **Solución de buffer fosfato 1000ml, 0,1M(pH=7)**

Esta disolución es una de las que más hemos empleado durante la realización de este trabajo ya que se usa como disolvente de los antioxidantes y la glucosa. Para su preparación es necesario disolver dos elementos diferentes en agua ultrapuradesionizada, las cuales son:

- 0.5393g de Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- 0.7318g de Fosfato monosódico(NaH_2PO_4)

El buffer fosfato se utiliza como disolvente de los analitos en lugar de KCl ya que aporta al medio un pH neutro, a diferencia del KCl que tiene un pH ácido, de aproximadamente cinco. Este dato es muy

importante en el caso de la medición con enzimas, ya que éstas deben trabajar en un medio neutro, por lo que la decisión de usar un disolvente u otro se tomara en función de si las mediciones se realizan con sensores, que se utilizara el KCl, o si las hacemos mediante biosensores, que se usa el buffer fosfato como disolvente.

Una característica importante de este disolvente es que puede usarse incluso semanas después de su preparación, si se guarda en el frigorífico.

◆ **Solución de Catecol 100ml 10^{-3} M**

El Catecol lo vamos a utilizar como medio para analizar antioxidantes, para prepararlo, lo que tenemos que hacer es:

Pesamos 0.011g de Catecol en la báscula de precisión y lo disolvemos en el buffer fosfato, como el catecol suele estar en forma de piedrecita, cuesta que se disuelva, por tanto para facilitar la perfecta disolución lo que hacemos es echar la mezcla en un vaso de precipitados y meterla en el ultrasonido hasta que está bien disuelto, por último vertemos la mezcla en el matraz de 100ml y enrasamos con el buffer.

Para que el catecol se conserve, lo tapamos con papel de aluminio evitando que le dé la luz solar, ya que se oxida con facilidad.

◆ **Solución de hidroquinona 100ml 10^{-3} M.**

Lleva las mismas cantidades de disolución que el Catecol, ya que las masas moleculares de ambos analitos son idénticas. El disolvente empleado también será el beffer.

Esta disolución también es muy sensible a la oxidación, por tanto debemos protegerla de la luz.

◆ **Solución de glutaraldehído(5ml, 25%):**

El glutaraldehído lo hemos utilizado como agente entrecruzante para fijar la enzima al sensor.

Se prepara una disolución de glutaraldehído al 25%, que se empleará para poner los vapores a los sensores con las enzimas.

Esta solución que se puede utilizar varias veces, se mantiene congelada y perfectamente sellada con parafilm.

3.2.5. Análisis de fenoles por voltametría cíclica

Preparación de la celda de ensayo:

Una vez que ya tenemos preparadas, tanto los sensores como las disoluciones, debemos preparar la celda con la cuál vamos a hacer las medidas. Lo más importante al montar la celda es que todos los electrodos estén perfectamente limpios. Para ello los pasos a seguir son:

Echamos la disolución que deseamos medir dentro del recipiente y lo enganchamos perfectamente en el soporte de la celda.



Figura 3.16, Soporte en cual se coloca la celda.

El contraelectrodo de platino se debe sumergir en una disolución de ácido sulfúrico, y después se secará poniéndolo al rojo con un mechero, de esta forma aseguramos que se elimine cualquier tipo de suciedad. Y después se termina de limpiar enjuagándolo con agua desionizada.



Figura 3. 17, Contraelectrodo de platino guardado en su recipiente

El electrodo de referencia también debemos rociarlo con aguadesionizada.

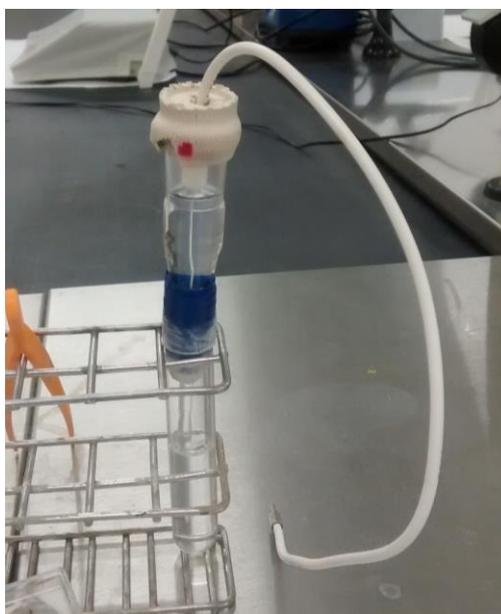


Figura 3.18, Electrodo de referencia sumergido en disolución de Buffer para su mantenimiento.

El electrodo de trabajo, si se trata de un sensor, lo que tenemos que hacer para poder medir con él, es en un extremo echar laca de plata para que así conduzca electricidad, en el caso de los biosensores, como para prepararlos los hemos envuelto la mitad con parafilm debemos eliminar el parafilm, ya que nos impide el paso de corriente, lo que hacemos es con la ayuda del cúter cortar un ranura, hacia dentro del ITO de unos milímetros de anchura, para echar la laca de plata y así poder pinzar por ahí para que el biosensor pueda conducir la electricidad.

Una vez ya tenemos todos los electrodos limpios, lo que tenemos que hacer es montar la celda, la montamos siempre de tal forma que el electrodo de referencia quede en el medio, y a un lado ponemos el contraelectrodo de platino, pinzado por un extremo por la pinza, al otro lado electrodo de trabajo, siempre con la cara con la que vamos a medir, mirando para el electrodo de referencia. El resultado final debe ser que los tres electrodos estén alineados y lo más cercanos posible, eso sí, que no se toquen.



Figura 3. 19, Contraelectro pinzando con la pinza con la cual después se coloca en la celda.

Hay que tener especial cuidado en asegurarnos de que no se mojen las pinzas ya que esto daría errores en la medición. Cada uno de los electrodos los debemos conectar con los cables al potenciostato a través de la pinza, este paso es delicado, puesto que al enganchar los cables puede hacer que se muevan los electrodos y que se toquen unos a otros, lo cual daría error. Una vez conectados los electrodos al potenciostato, se establecerán las condiciones del ensayo mediante un programa informático, es este caso Nova 1.10.



Figura 3.20, Potenciostato marca AUTOLAB.

Medidas voltamétricas en soluciones patrón. Límites de detección

Para conocer la capacidad de detección de los biosensores de PEDOT-PSS con y sin modificadores y con las dos enzimas en estudio nos propusimos su análisis en soluciones patrón de Hidroquinona y Catecol, dos isómeros antioxidantes fenólicos básicos en los vinos.

En este análisis nos proponemos llevar a cabo la medida de límites de detección y cinéticas que nos permitan conocer nuestros biosensores ante de su uso en los vinos objeto de estudio. Para el cálculo de los límites de detección se sigue el siguiente procedimiento: Ponemos 50ml de buffer fosfato en la celda, y hacemos el primer ensayo.

Para guardar los datos al finalizar la medida debemos poner el nombre siendo la estructura:

Fecha	Enzima	PEDOT-PSS/ PEDOT-PSS+modificante	Concentración	LD
-------	--------	-------------------------------------	---------------	----

Por ejemplo 19FTyrPEDOT-PSS CuPc-10LDBuffer.

Una vez hemos hecho la medida solo con Buffer lo que tenemos que hacer es ir añadiendo o bien el Catecol o la Hidroquinona en las siguientes cantidades:

- 1) 200 ml
- 2) $200\text{ml} + 500\text{ml} = 700\text{ml}$
- 3) $700\text{ml} + 300\text{ml} = 1000\text{ml}$.
- 4) $1000\text{ml} + 1000\text{ml} = 2000\text{ml}$.
- 5) $2000\text{ml} + 1000\text{ml} = 3000\text{ml}$
- 6) $3000\text{ml} + 1500\text{ml} = 4500\text{ml}$
- 7) $4500\text{ml} + 2000\text{ml} = 6500\text{ml}$.
- 8) $6500\text{ml} + 1000\text{ml} = 7500\text{ml}$

Cuando ya hemos añadido un total de 7500ml lo que tenemos que hacer es desmontar la celda y hacer la medida con una disolución pura de lo que estemos midiendo, es decir, o de Catecol, Hidroquinona, para hacer esta medida lo que debemos hacer es echar la mezcla en una celda pequeña, porque sino gastaríamos grandes cantidades de disolución para estas medidas.

Se realiza el estudio de los datos voltamétricos obtenidos en el pico de reducción y oxidación para obtener los límites de detección deseados.

Medidas voltamétricas en VINOS.

Para medir los vinos, los cuales, están congelados, los debemos sacar unas horas antes de medirlos, o incluso el día antes de medirlos para asegurarnos de que están perfectamente líquidos.

Para medir los vinos los debemos disolver, esta disolución la hacemos mezclando a partes iguales el vino que deseamos medir con disolución de KCl 0.3M, por ejemplo 20ml de ambos. Debemos hacer que sea una mezcla totalmente homogénea, para ello medimos primero la cantidad de vino y lo

echamos en un vaso de precipitados y después medimos el KCl y lo juntamos en el mismo recipiente, tapamos el agujero con parafilm y procedemos a agitarlo hasta que estén totalmente mezclados. Cuando ya lo tenemos mezclado lo echamos en la celda. Ahora ya podemos montar la celda, como ya hemos explicado anteriormente, en el caso del análisis de los vinos no adicionamos ningún producto a lo largo de las mediciones. Para medir cada uno de los vinos hemos utilizado una red de biosensores formada por los ocho biosensores que hemos fabricado, es decir, los cuatro sensores que hemos generado con PEDOT-PSS con o sin modificadores, convertidos en biosensores gracias a la adición de las enzimas Lacasa y a otros cuatro de la enzima tirosinasa, es decir obtenemos:

- 4 de PEDOT-PSS.+ Lacasa/Tirosinasa.
- 4 de PEDOT-PSS con LuPc₂+ Lacasa/Tirosinasa.
- 4 de PEDOT-PSS con CuPc + Lacasa/Tirosinasa.
- 4 de PEDOT-PSS con AuNP + Lacasa/Tirosinasa.

Una vez que usamos un biosensor para medir un vino, lo debemos desechar, es decir debemos volverlo a limpiar, no se puede utilizar para medir otro vino diferente.



Figura 3.21, Dos tipos diferentes de vinos colocados en la celda. Para ser analizado con los biosensores.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Detección de antioxidantes mediante Biosensores.

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en los ensayos voltamétricos utilizando los biosensores anteriormente descritos. Comenzamos analizando su respuesta en la solución de buffer fosfato que se usa como electrolito base, a continuación se expone el comportamiento de los biosensores con tirosinasa frente a Catecol e hidroquinona y finalmente se hace lo propio con los biosensores de Lacasa.

4.1.1. Caracterización de biosensores en Buffer.

Lo primero que debemos hacer es caracterizar la red de biosensores que tenemos, para ello, analizamos en Buffer fosfato, como electrolito base, los ocho tipos de biosensores que tenemos.

Las medidas que se han realizado en buffer sirven como base para determinar cuál es el comportamiento de los electrodos sin analito, así como para analizar posibles fallos del electrodo, detectar un posible mal comportamiento tanto del electrodo de referencia como del contraelectrodo o cualquier otro elemento del equipo de trabajo. Estas medidas también nos sirven como base para el estudio de los límites de detección de los diferentes biosensores, los cuales se explicaran en apartados posteriores. Es decir, antes de estudiar el analito en cuestión, en nuestro caso los antioxidantes, vamos a realizar siempre mediciones de todos los tipos de electrodos en Buffer y observar su respuesta; para así tener una referencia previa a los ensayos de análisis de antioxidantes.

En la siguiente figura se representan las cuatro tipos de biosensores, a los cuales se les ha convertido en biosensores mediante la a adición del enzima tirosinasa, medidos en buffer.

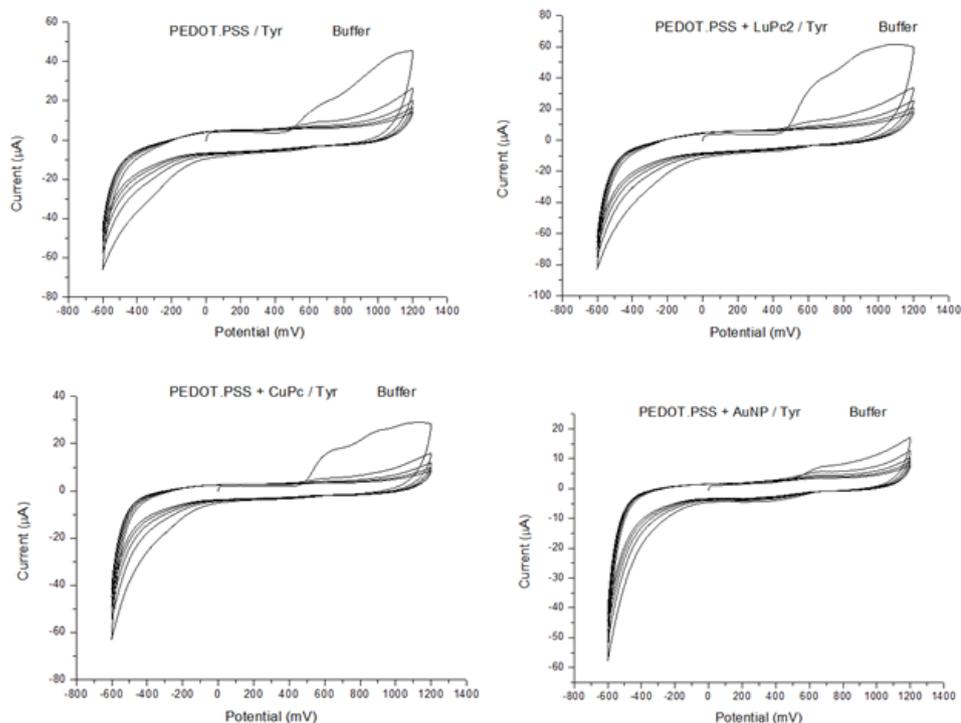


Figura 4.1, Medición voltamétrica en Buffer de los cuatro tipos de biosensores con la enzima tiroxinasasa.

Como podemos ver la morfología del voltamograma es muy similar en todos los casos, siendo destacable que el primer ciclo es claramente distinto al resto en todos los biosensores.

Podemos ver que el biosensor que alcanza mayores intensidades es el que está modificado con LuPc₂, llegando casi a intensidades del orden de 70µA en el caso de las positivas, las cuales, se alcanzan con la tensión de aproximadamente 1,1V.

De nuevo, el que también registra máximas intensidades negativas es el biosensor de PEDT-PSS+LuPc₂/Tyr. Llegando a valores de -80µA. Los biosensores modificados con ftalocianinas de cobre y los de nanopartículas de oro presentan intensidades claramente inferiores. Excepto en el primer ciclo, en el resto no aparecen picos significativos a excepción de los de la hidrólisis del agua lo que nos permite concluir la idoneidad del buffer como electrolito base para nuestros analitos.

Como conclusión, al analizarlos, podemos decir que el que mayor rango de intensidades alcanza es el biosensor modificado con LuPc₂, siendo este desde -85µA hasta 62µA.

Ahora vamos a analizar los mismos sensores, es decir, el sensor de PEDOT-PSS modificado tanto por las ftalocianinas de Lutecio, como de Cobre y el que hemos modificado con nanopartículas de oro, pero en este caso les hemos adicionado Lacasa para convertirlos en biosensores.

Vemos en la siguiente figura los resultados obtenidos del análisis en Buffer. Si observamos los voltamogramas, podemos ver que todos tienen una morfología similar, y similar a los registrados con el enzima Tirosinasa. También el primer ciclo es claramente diferente en el barrido inicial de oxidación y no se observan picos que pudieran interferir en las medidas de nuestros analitos.

En estos biosensores, hemos medido en un rango de voltajes desde -0,6V hasta 1,2V. De nuevo el biosensor que alcanza mayores intensidades es el biosensor de LuPc₂/Lac.

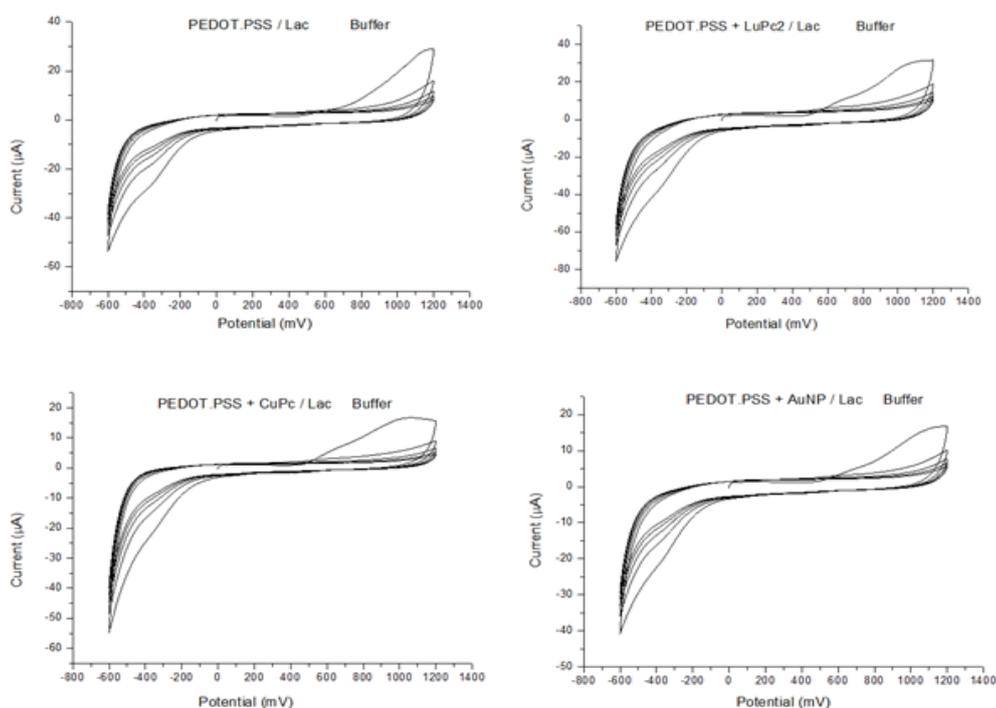


Figura 4.2, Medición voltamétrica en Buffer de los cuatro tipos de biosensores con la enzima Lacasa.

4.1.2. Detección de antioxidantes con biosensores.

En este apartado vamos a analizar la capacidad de los sensores de detectar los antioxidantes, en un primer caso se ha realizado la detección de Catecol, así se puede ver cómo funcionan los diferentes tipos de biosensores y llegar a la conclusión de cual son sus capacidades en relación con los modificadores electroquímicos utilizados para detectar este antioxidante.

También vamos a realizar las cinéticas de estos mismos sensores con el objetivo de observar similitudes o diferencias entre los diferentes modificadores en lo relativo al mecanismo de reacción y realizaremos el cálculo de sus límites de detección, y así tener cuantificados el efecto de cada uno de los modificadores en los sensores en la detección de Catecol.

- Biosensores de Tirosinasa.

- ❖ **Detección en CATECOL.**

Realizamos este estudio para conocer el comportamiento de los sensores en la detección de fenoles, en este caso lo vamos a realizar en Catecol.

Lo que hemos hecho en primer lugar es una comparativa de las señales obtenidas con los diferentes sensores. A continuación hemos realizado un estudio analítico de la cinética para conocer el mecanismo básico de reacción. Por último se ha estudiado el límite de detección (LD) para cada uno de ellos.

Se han realizado mediciones en Catecol con todos los diferentes biosensores a ocho concentraciones diferentes, desde $4 \cdot 10^{-6}$ hasta $1.5 \cdot 10^{-4}$. Para cada una de estas concentraciones se realizaron cinco ciclos, en los cuales la señal varía ampliamente. Las concentraciones que hemos utilizado son:

$4 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-5}$	$1.3 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	---------------------	---------------------

Con objeto de mostrar estas variaciones se ha representado a modo de ejemplo la figura 4.3, la cual tenemos a continuación, en la que aparecen representados los cinco ciclos a la concentración de $6 \cdot 10^{-5}$ en Catecol siendo el sensor que hemos empleado en este caso el de PEDOT-PSS+CuPc/Tyr

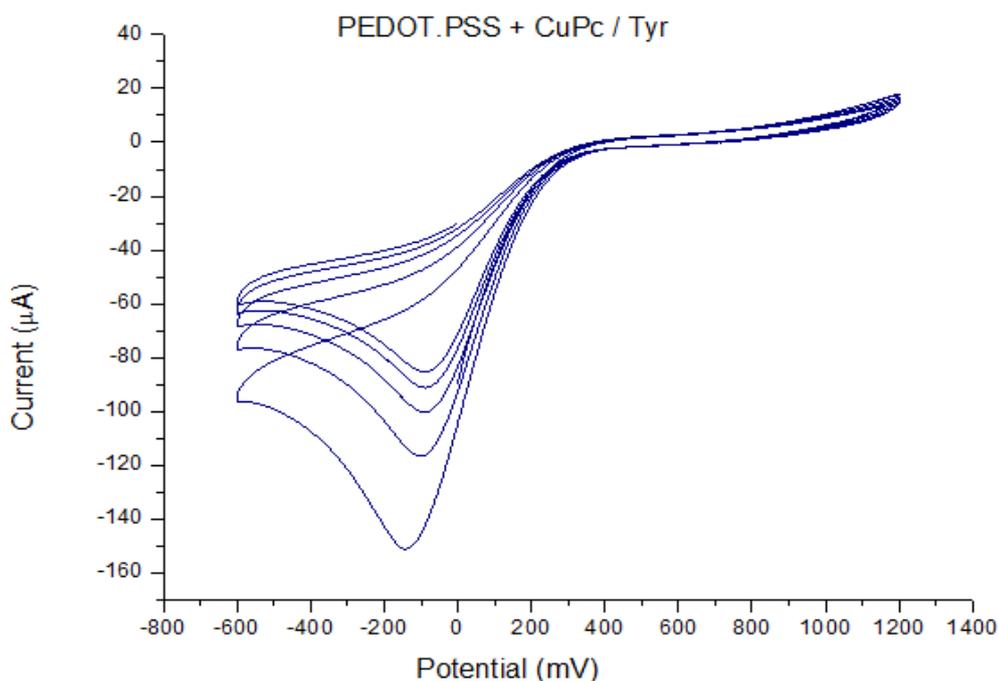


Figura 4.3, Voltamograma de sensor de PEDOT-PSS+CuPc/Tyr medido en Catecol siendo la concentración de este $6 \cdot 10^{-5}$

Se ha escogido el sensor modificado con ftalocianina de cobre de forma aleatoria, puesto que lo que se quiere con esta imagen es ver cómo va variando las medidas a lo largo de los cinco ciclos. Como podemos observar en la parte de oxidación apenas existen diferencias entre los ciclos, sin embargo en la parte de reducción las diferencias en la intensidad se van haciendo cada vez menores.

Si analizamos un poco más profundamente el voltamograma podemos ver que, como ya hemos dicho anteriormente en la parte de oxidación, los cinco ciclos aparecen casi superpuestos, no existiendo apenas diferencias entre ellos. En la parte de reducción, esto no sucede, sino que existen diferencias tanto en la forma del ciclo como en la intensidad que alcanza en el pico de reducción y voltaje al que tiene lugar. En todos los casos se observa

una estabilización a partir del quinto ciclo que será el seleccionado para calcular los límites de detección.

En la siguiente imagen podemos ver las diferencias existentes entre los diferentes tipos de biosensores, en función del tipo de modificador, en ella aparecen representados los cinco ciclos de cada uno de los biosensores para una concentración dada, $6 \cdot 10^{-5}$ Catecol

Como se puede apreciar la señal obtenida de los cuatro tipos de biosensores es muy diferente frente a la medida de los antioxidantes, lo que resulta ser beneficioso para poder construir nuestra lengua bioelectrónica.

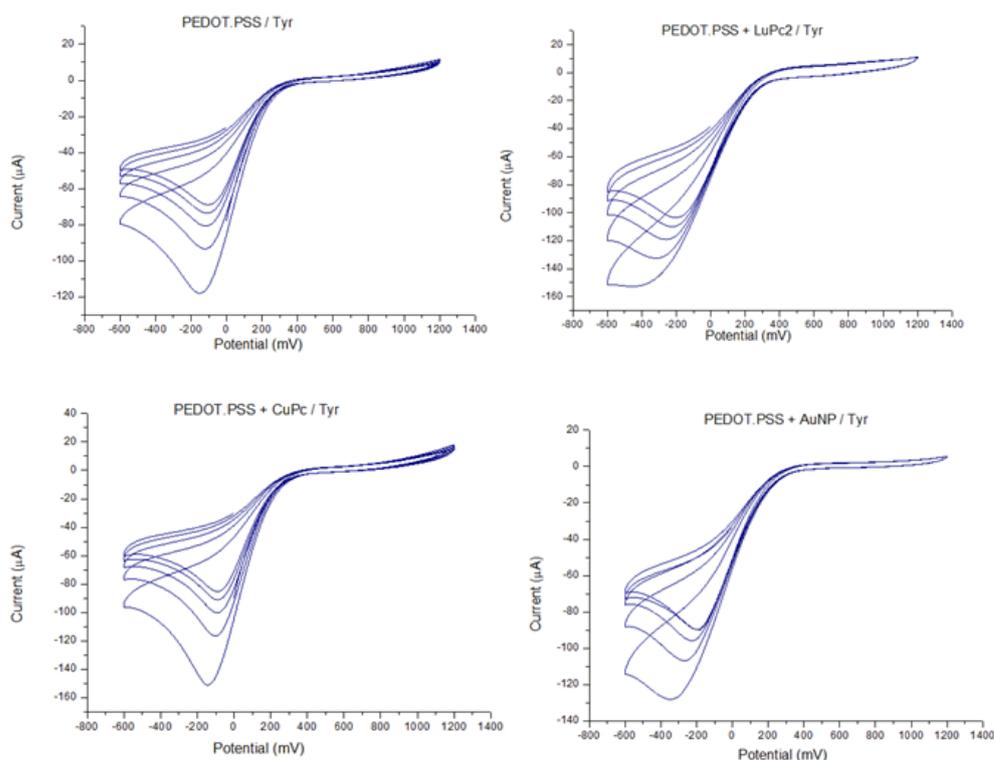


Figura 4.4, Voltamogramas de los cuatro tipos de Biosensores a la concentración en Catecol de $6 \cdot 10^{-5}$

Podemos ver que en todos los biosensores, en la parte de oxidación los cinco ciclos se solapan, es decir, no existen apenas diferencias entre ellos, sin embargo como ya hemos comentado anteriormente en la parte de reducción, que son las que nos interesan puesto que son los picos que cataliza el enzima, estos tienen lugar a medida que ciclamos a potenciales más positivos y a intensidades cada vez menos intensas, con tendencia clara a la estabilización.

Se puede apreciar que cualquiera de los sensores nos sirve para medir los picos de reducción, siendo los biosensores modificados con las ftalocianinas de Cu y de Lu los que alcanzan menores intensidades de pico, del orden de los $-150 \mu\text{A}$, más concretamente en el caso del LuPc_2 puede alcanzar intensidades de $-150 \mu\text{A}$ o en el caso de CuPc de $-145 \mu\text{A}$. En el caso de los sensores modificados con nanopartículas de oro, la densidad de corriente en el pico también es mayor que en el electrodo sin modificar. Por tanto podemos concluir que los modificadores están ejerciendo un efecto beneficioso como mediadores electrónicos. En cuanto al potencial se observa un ligero desplazamiento de los picos a potenciales más negativos en los electrodos modificados.

❖ Estudio cinético.

A continuación se analizan los resultados obtenidos del estudio cinético realizado en catecol a diferentes velocidades de barrido con objeto de identificar el mecanismo que controla la cinética de los diferentes biosensores. Vamos a comenzar con los de PEDOT-PSS/Tyr

En la siguiente figura podemos ver la comparativa de los seis voltamogramas registrados para las seis velocidades de barrido medido en una disolución 10^{-3} M de Catecol. Como podemos ver la señal va aumentando en intensidad, a media que lo hace la velocidad de barrido y cada vez el proceso se hace más irreversible. En el caso de las cinéticas tampoco existe el pico de oxidación, pero si el de reducción. Que como se puede ver a la mayor velocidad de barrido (1000mV/s) se presenta una intensidad del pico de reducción (catódico) de $-350\mu\text{A}$. En este estudio cinético trataremos de correlacionar los datos de intensidad medidos en el pico de reducción asociado al catecol con los de la velocidad de barrido así como con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

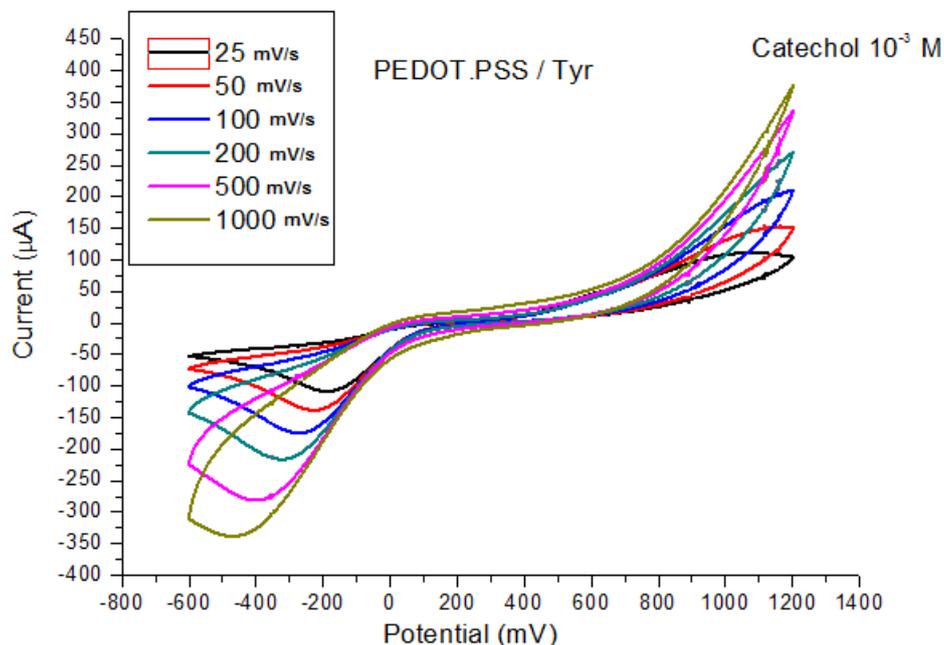


Figura 4.5, Estudio cinético de Pedot-Pss/Tyr en Catecol 10^{-3} M con diferentes velocidades de barrido.

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	$ I $ (µA)
25	5	108,27637
50	7,07	138,33618
100	10	174,49951
200	14,14	216,21704
500	22,36	280,76172
1000	31,62	337,95166

Tabla 4.1. Cálculo estudio cinético PEDOT-PSS/Tyr en Catecol 10^{-3} M.

En esta tabla podemos ver las intensidades (en valor absoluto), las cuales se corresponden con el pico de reducción para cada velocidad de barrido junto con los valores de velocidades y las raíces cuadradas de cada velocidad.

La intensidad del pico de reducción del Catecol aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik.

$$I_p = 0.4463nF \sqrt{\frac{nFD}{RT}} AC\sqrt{v}$$

Donde I_p es la intensidad del pico, n es el número de electrones, F es la constante de Faraday, T es la temperatura en Kelvin, R es la constante de los gases, A es el área del electrodo de trabajo, D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, C es la concentración de la especie y v es la velocidad de barrido.

Estos datos son los que se emplean en el estudio, para ello se representan gráficamente, como podemos ver a continuación:

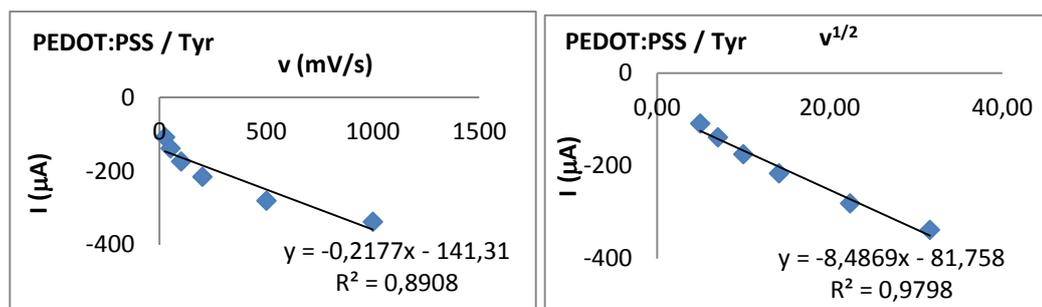


Figura 4.6, Recta de calibración de biosensor PEDOT-PSS/TYR en Catecol para el estudio cinético. Gráfica izq: en función del v , gráfica derecha en función de $v^{1/2}$

Como podemos ver en las gráficas tiene un mejor ajuste la de $v^{1/2}$, esto nos indica que el mecanismo se produce por difusión. Para comprobar que esto es así, lo representamos frente al $\log(v^{1/2})$, Se observa un coeficiente de correlación R^2 mayor que 0.9 indicando que el proceso estaría limitado por la difusión, como hemos visto. El logaritmo de la intensidad del pico de corriente cambia linealmente con el logaritmo de la velocidad de barrido con una pendiente cercana a 0.5 lo que confirmaría el mecanismo de difusión.

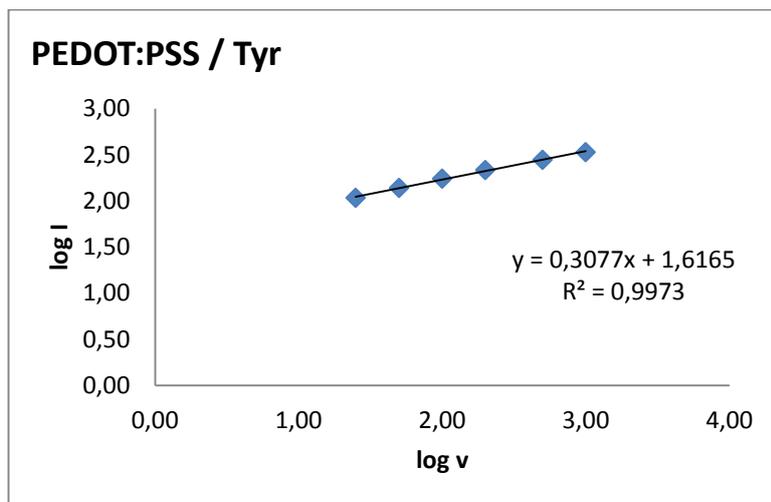


Figura 4.7, Recta de calibración de biosensor PEDOT-PSS/TYR en Catecol para el estudio cinético.

Hacemos exactamente lo mismo con los demás Biosensores y obtenemos los siguientes datos:

	Relación con la velocidad de barrido, I(μA) vs V(mV)		Relación con la velocidad de barrido, I(μA) vs V		Relación con la velocidad de barrido, log I vs log V	
	Pendiente	R ²	Pendiente	R ²	Pendiente	R ²
PEDOT-PSS	0.2177	0.8908	8.4869	0.9798	0.3077	0.9976
PEDOT-PSS+ LuPc	0.2506	0.8839	9.7921	0.9766	0.28	0.9976
PEDOT-PSS+ CuPc	0.1872	0.8966	7.2812	0.9818	0.2834	0.9982
PEDOT-PSS+ AuNP	0.1888	0.9004	7.3361	0.9839	0.3037	0.9986

Tabla 4.2, Valores obtenidos entre la relación de velocidad de barrido, la pendiente de la recta de regresión y el ajuste obtenido.

El estudio cinético, el cual se representa en la gráfica, nos indica que el coeficiente de correlación con el logaritmo de la raíz de la velocidad es muy alto. Esto nos indica, al igual que pasaba con el biosensor de PEDOT-PPS que el mecanismo limitante es la difusión, esta misma conclusión la sacamos si nos fijamos en la representación logarítmica, en la cual vemos que el valor de

la pendiente de todos los biosensores es próximo a 0,5, esto nos confirma que para todos los biosensores el mecanismo limitante es la difusión.

El siguiente electrodo, el cual hemos analizado es el de PEDOT-PSS +LuPc₂/Tyr, como en el caso anterior lo primero que hacemos es analizar el voltamograma, que podemos ver en la siguiente imagen.

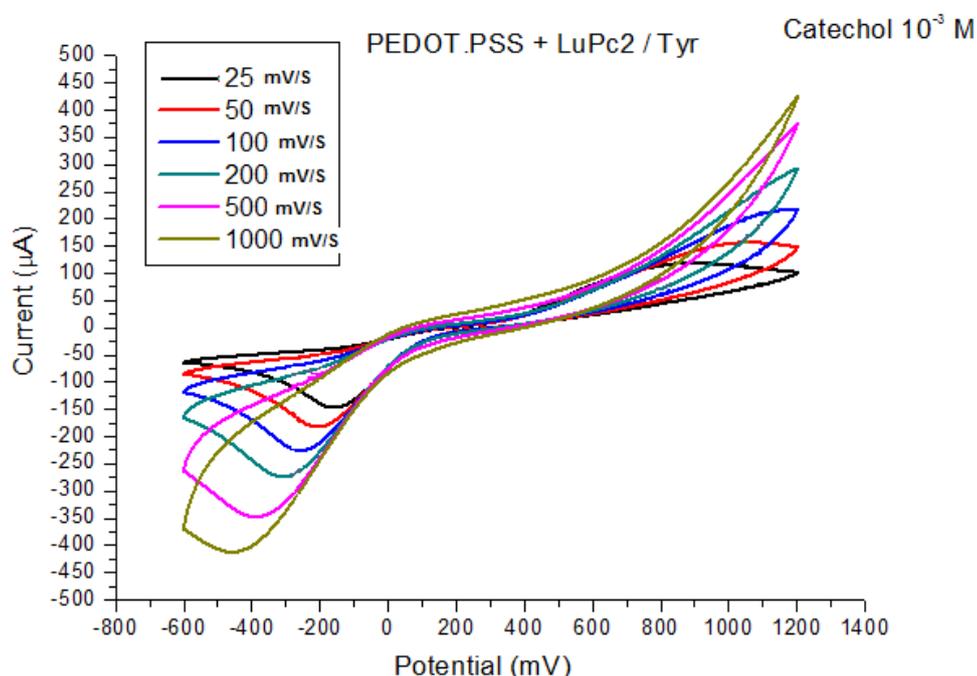


Figura 4.7, Estudio cinético de Pedot-pss/Tyr +LuPc₂ en Catecol 10⁻³M con diferentes velocidades de barrido.

Como podemos observar no existe, en este caso tampoco el pico de oxidación, pero si el de reducción que como en el caso anterior las intensidades crecen a medida que crece la velocidad de barrido. Siendo en este caso la máxima intensidad alcanzada -425µA con la velocidad de 1000mV/s. También se observa un desplazamiento a potenciales más negativos a medida que aumenta la velocidad de barrido

Si hacemos la tabla con los valores de los picos de reducción obtenemos para cada velocidad de barrido.

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	$ I $ (μA)
25	5,00	146,51489
50	7,07	181,97632
100	10,00	225,49438
200	14,14	273,83423
500	22,36	347,53418
1000	31,62	411,92627

Tabla 4.2. Calculo estudio cinético de Biosensor PEDOT-PSS/Tyr +LuPc₂ en Catecol 10⁻³ M.

Si hacemos lo mismo con el biosensor de PEDOT-PSS/Tyr+ CuPc, representamos el voltamograma:

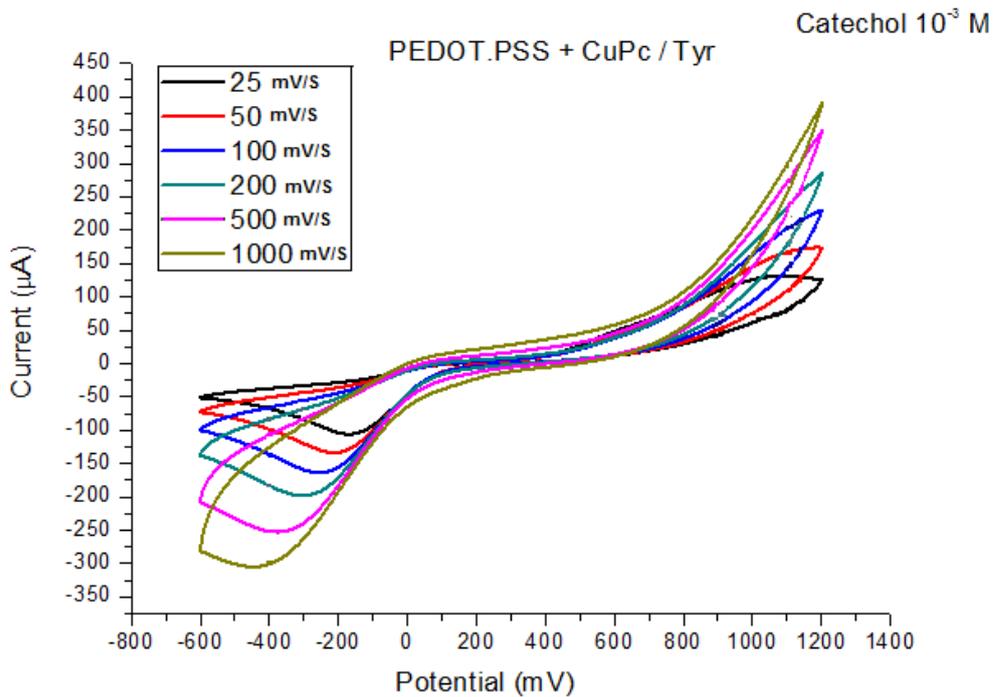


Figura 4.8, Estudio cinético de Pedot-Pss+CuPc/tyr en Catecol 10⁻³ M con diferentes velocidades de barrido.

Como podemos ver, sigue la tendencia que tenía en casos anteriores y aumenta la intensidad del pico a medida que aumenta la velocidad de barrido.

Si ponemos los datos obtenido con la ftalocianina de Cobre.

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	$ I $ (μ A)
25	5,00	105,77393
50	7,07	133,48389
100	10,00	163,45215
200	14,14	198,15063
500	22,36	252,38037
1000	31,62	304,59595

Tabla 4.3, Calculo estudio cinético de Biosensor PEDOT-PSS/Tyr +CuPc en Catecol 10^{-3} M.

Y por último veremos los datos que hemos obtenido con el biosensor modificado con las nanopartículas de Oro.

Lo primero que representamos como en los casos anteriores es la representación del estudio cinético.

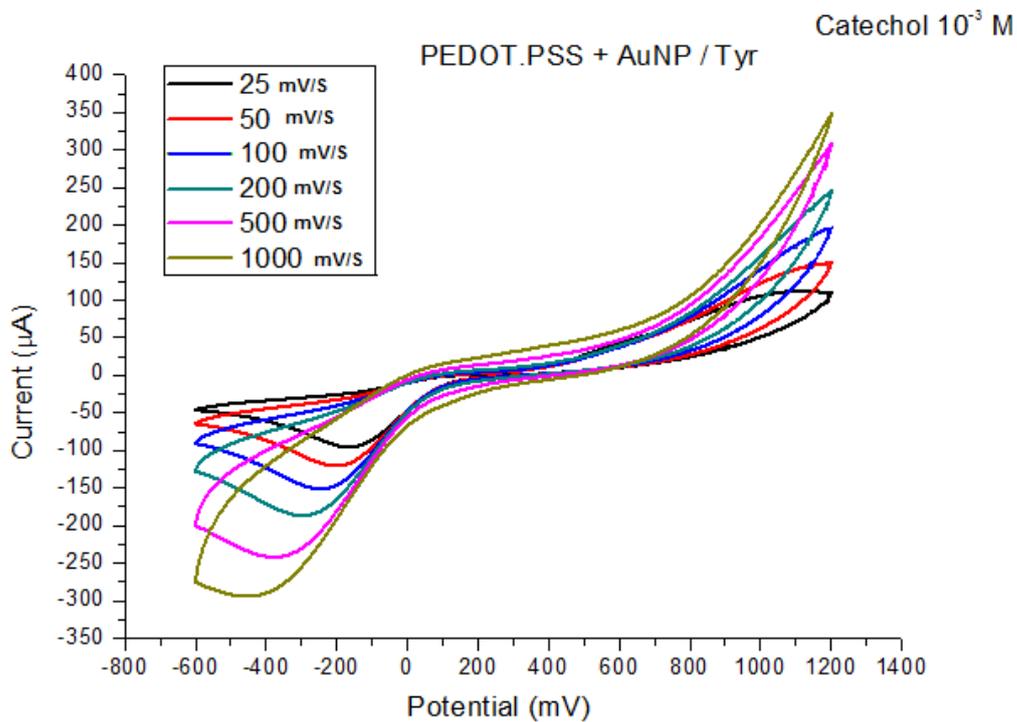


Figura 4.9, Estudio cinético de Pedot-Pss+AuNP/tyr en Catecol 10^{-3} M con diferentes velocidades de barrido.

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	I (µA)
25	5,00	95,58105
50	7,07	120,54443
100	10,00	151,00098
200	14,14	186,52344
500	22,36	241,85181
1000	31,62	294,18945

Tabla 4.4. Calculo estudio cinético de Biosensor PEDOT-PSS/Tyr +AuNP en Catecol 10^{-3} M.

Si hacemos una comparativa entre los datos obtenidos como podemos ver en la siguiente imagen, vemos que el biosensor que alcanza mayores

intensidades es el que está modificado con Lutecio, siendo un valor muy alto con respecto a los demás, como se puede observar tienen unas intensidades variadas.

PEDOT-PSS/TYR

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	I (μA)
25	5,00	108,27637
50	7,07	138,33618
100	10,00	174,49951
200	14,14	216,21704
500	22,36	280,76172
1000	31,62	337,95166

PEDOT-PSS+LuPc₂/Tyr

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	I (μA)
25	5,00	146,51489
50	7,07	181,97632
100	10,00	225,49438
200	14,14	273,83423
500	22,36	347,53418
1000	31,62	411,92627

PEDOT-PSS+CuPc/Tyr

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	I (μA)
25	5,00	105,77393
50	7,07	133,48389
100	10,00	163,45215
200	14,14	198,15063
500	22,36	252,38037
1000	31,62	304,59595

PEDOT-PSS+AuNP/Tyr

v (mV/s)	$v^{1/2}$ (mV/s) ^{1/2}	I (μA)
25	5,00	95,58105
50	7,07	120,54443
100	10,00	151,00098
200	14,14	186,52344
500	22,36	241,85181
1000	31,62	294,18945

Tablas 4.5, Tablas recopilatorias del cálculo del estudio cinéticos

❖ Límites de detección.

Completado el estudio cinético pasamos a calcular el límite de detección del Catecol en los diferentes sensores, como hemos hecho hasta ahora el primer biosensor que vamos a analizar es el de PEDOT-PSS/Tyr.

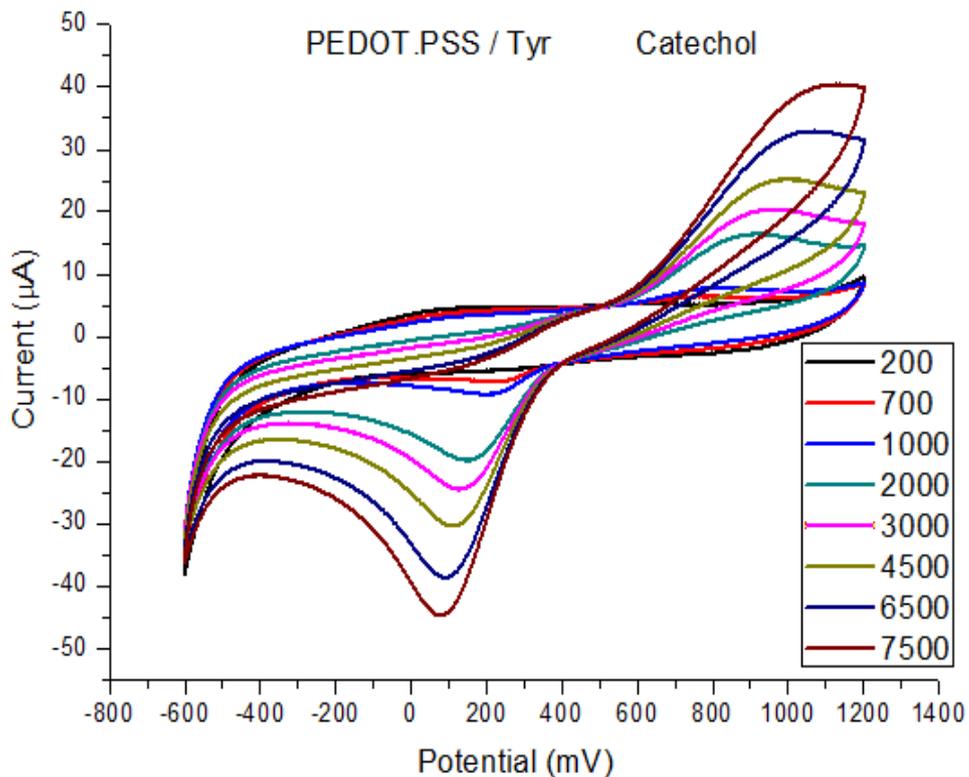


Figura 4.10, Limite de detección de PEDOT-PSS/Tyr en Catecol.

Los ocho voltamogramas obtenidos en la figura anterior, cada uno corresponde a una concentración en la cual se representa únicamente el último ciclo de cada concentración para poder realizar una mejor visualización, considerando además que es a partir del quinto ciclo en el que se consigue una mayor estabilidad.

Una vez que ya tenemos los datos del último ciclo de cada una de las concentraciones, lo que debemos hacer es copiar la intensidad a la cual se da el pico, en este caso de reducción. Se ha de hacer con todas las concentraciones, es decir obtenemos en total ocho intensidades. Estas ocho intensidades las copiamos en una tabla de Excel junto con la concentración a la que corresponde.

Concentración	Intensidad
4,00E-06	-7,79724
1,00E-05	-14,72473
2,00E-05	-26,6449
4,00E-05	-54,62646
6,00E-05	-68,96973
9,00E-05	-72,26563
1,30E-04	-76,14136
1,50E-04	-79,65088

Tabla 4.6, Concentraciones e intensidades de pico.

Ahora realizamos el cálculo del límite de detección, para este caso solo lo hemos analizado en el pico de reducción por su mayor intensidad, aunque se debe llamar la atención de que también queda claramente visible el de oxidación. La fórmula que hemos utilizado para su cálculo es la siguiente:

$$LOD = \frac{3 \cdot SD}{m} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

Siendo SD la desviación estándar de las intensidades para el potencial al que aparece el pico de oxidación y m la pendiente de la recta de calibración. Para calcular la desviación estándar hemos marcado un potencial medio (de los tres últimos ciclos) para las medidas de la intensidad ya que el potencial del pico va variando como ya hemos visto.

Para el cálculo de la pendiente, lo que debemos hacer es representar los datos obtenidos de las intensidades de pico (en μA), en función de las concentraciones (en mol/L) a las cuales se dan, los datos que he puesto anteriormente en la figura obteniendo:

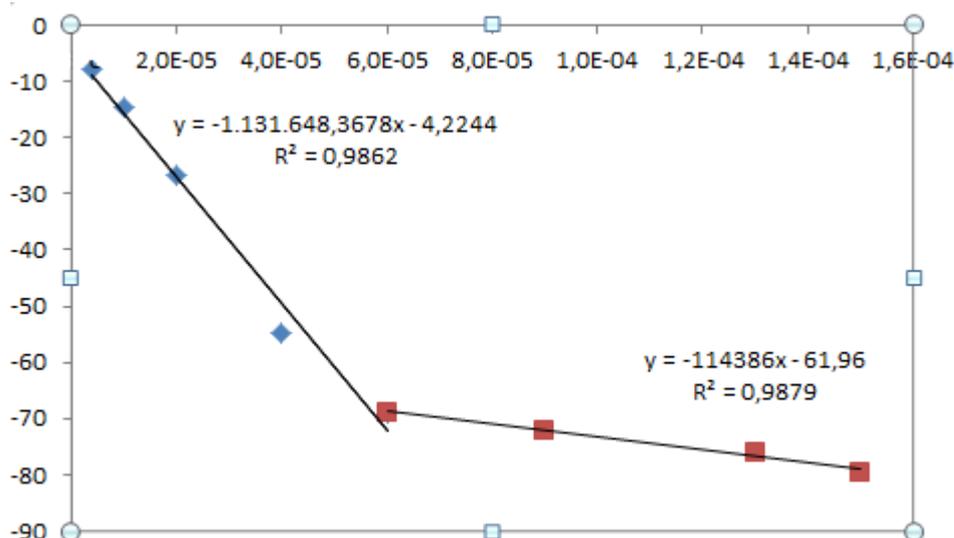


Figura 4.11, Recta de calibración de PEDOT-PSS/Tyr en Catecol para el cálculo de LOD.

En este caso para un mejor ajuste hemos dividido en dos rectas la gráfica para así poder obtener una mayor precisión.

Por tanto ya disponemos de todos los datos para realizar el cálculo del límite de detección aplicando la fórmula que hemos explicado anteriormente

$$LOD_1 = \frac{3 \cdot 0.24988}{1131648} = 6.6244 \cdot 10^{-7} \quad LOD_2 = \frac{3 \cdot 0.24988}{114386} = 6.5537 \cdot 10^{-6}$$

Como podemos observar son valores bastante buenos.

Hicimos lo mismo para el cálculo del límite de detección de los demás biosensores. En la siguiente imagen podemos observar la representación del último ciclo de todas las concentraciones. Debemos considerar que los voltamogramas son totalmente diferentes de los obtenidos en el caso anterior. Se observa claramente el efecto de la enzima tirosina en la reducción del Catecol como era previsible, lo que no ocurría en el caso del biosensor de PEDOT-PSS. Esto es indicativo de que las nanopartículas de oro y las ftalocianinas de cobre y lutecio están cumpliendo con su papel de mediador electrónico. En el caso del PEDOT-PSS lo que veíamos era el comportamiento del sensor hacia el Catecol pero no se veía el efecto de la enzima.

Como podemos observar, el pico se va desplazando a medida que aumenta la concentración hacia potenciales cada vez menos negativos (hacia la derecha) y hacia intensidades cada vez más negativas. Como se ha comentado anteriormente con los biosensores modificados con tiroxinasa y con mediadores electrónicos solo aparece el pico de reducción, y es en este pico en el que procedemos a realizar el cálculo del límite de detección.

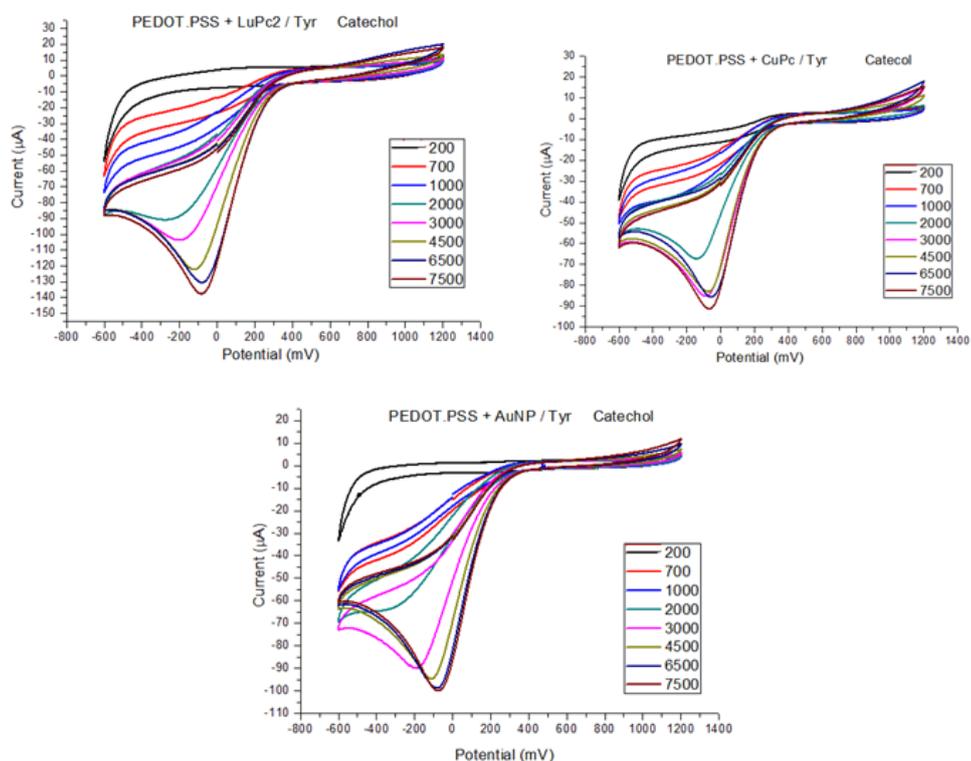


Figura 4.12, Voltamogramas de los diferentes biosensores modificados

En la siguiente tabla podemos ver los diferentes LD obtenidos para cada uno de los biosensores:

	Bajas concentraciones	Altas concentraciones
PEDOT-PSS/Tyr	$6.62444 \cdot 10^{-7}$	$6.5537 \cdot 10^{-6}$
Pedot-Pss+LuPc2/Tyr	$4.61593 \cdot 10^{-7}$	$2.5366 \cdot 10^{-6}$
Pedot-Pss+CuPc/Tyr	$4.36568 \cdot 10^{-7}$	$3.1746 \cdot 10^{-6}$
Pedot-Pss+AuNP/Tyr	$3.88469 \cdot 10^{-7}$	$3.8037 \cdot 10^{-6}$

Tabla 4.7, Límites de detección calculado para cada uno de los biosensores.

Como podemos ver todos los límites de detección son de órdenes de magnitud muy similares en todos los casos, ligeramente mejores en los biosensores modificados, se observa que en el primer caso el mejor sería para el que está modificado con nanopartículas de Oro, y en la segunda parte de la gráfica sería para el biosensor modificado con ftalocianina de Lutecio. En todos los casos muy por debajo de las concentraciones usuales de Catecol en las muestras de vino que pretendemos analizar.

Las gráficas de la intensidad de pico frente a la concentración que hemos obtenido en cada uno de los casos son:

Para el caso del pedot-pss+LuPc2/Tyr

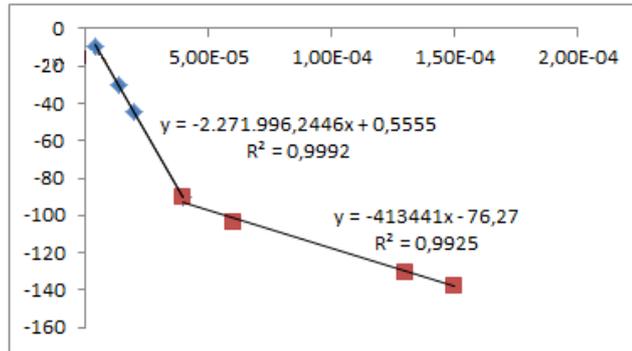


Figura 4.13, Recta de calibración de PEDOT-PSS+luPc2/Tyr en Catecol para el cálculo de LOD.

Para el caso del Pedot-Pss+CuPc/Tyr

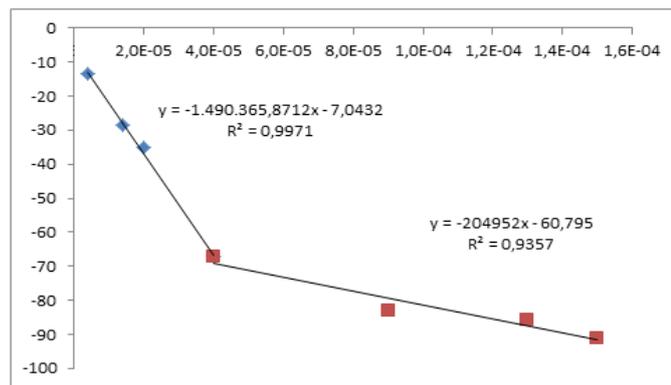


Figura 4.14, Recta de calibración de PEDOT-PSS+ CuPc/Tyr en Catecol para el cálculo de LOD.

Y por último la gráfica obtenida con el biosensor modificado con nanopartículas de Oro.

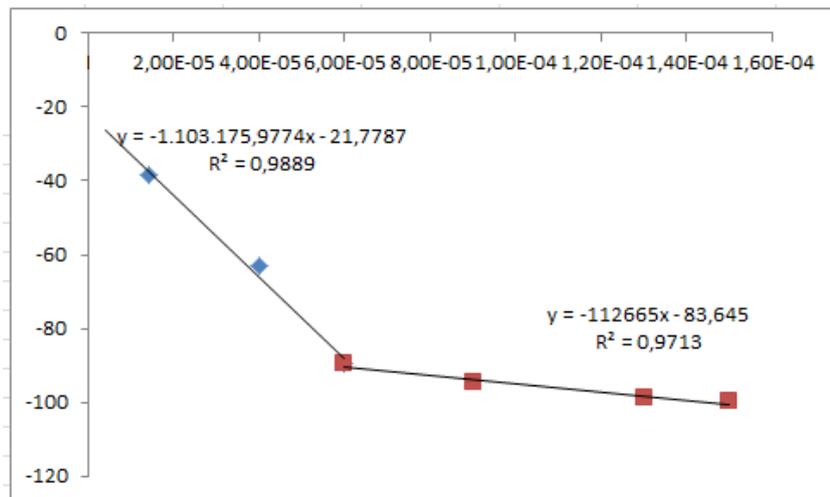


Figura 4.15, Recta de calibración de PEDOT-PSS+ AuNP/Tyr en Catecol para el cálculo de LOD.

Biosensores de Lacasa

❖ Detección en HIDROQUINONA.

Al igual que en el caso de los biosensores analizados en el apartado anterior, vamos a analizar el comportamiento de los biosensores modificados con Lacasa en la detección de fenoles, en este caso lo vamos a realizar en Hidroquinona, isómero del Catecol medido con la enzima Tirosinasa.

Vamos a realizar como antes, en primer lugar la comparativa de las señales que nos da cada uno de los biosensores, con objeto de conocer su comportamiento electroquímico en voltametría cíclica, después la cinética que hemos obtenido y para finalizar los límites de detección de cada uno de ellos.

Se han realizado mediciones en Hidroquinona con los diferentes biosensores para las ocho concentraciones de referencia, como en el caso del Catecol, para medir cada una de estas concentraciones, se realizaron cinco ciclos, en los cuales como podemos ver que la señal varía en los primeros ciclos, los cuales descartamos y es a partir del ciclo que usamos como medida cuando se estabiliza el comportamiento. Esto es lo que ya hemos

comentado anteriormente y que de nuevo se repite para los biosensores de lacasa con algunas diferencias.

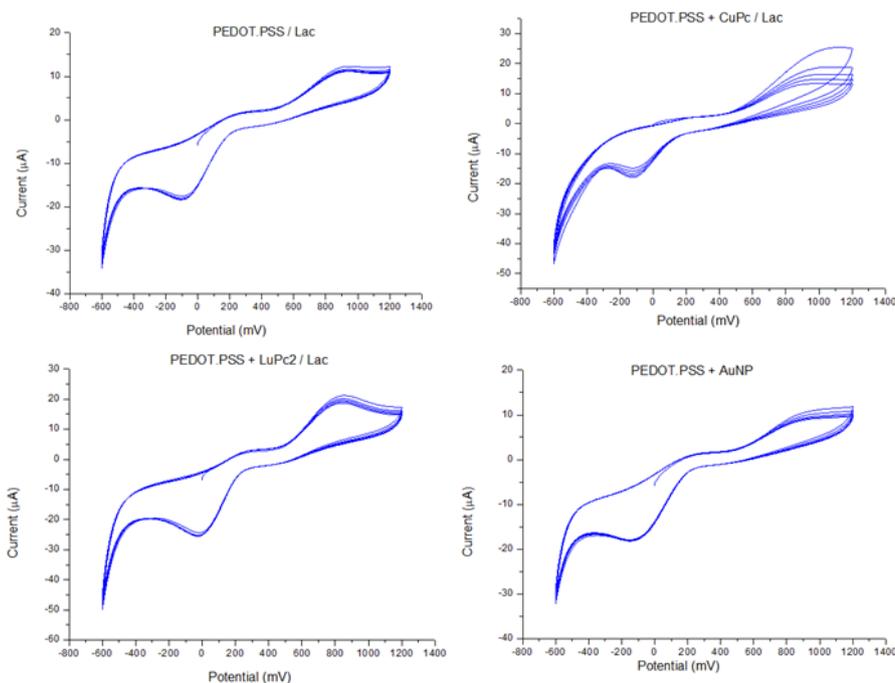


Figura 4.16, Voltamogramas de los cuatro tipos de Biosensores a la concentración en Hidroquinona de $6 \cdot 10^{-5}$

Lo primero que podemos apreciar, es que en los biosensores modificados con el enzima Lacasa, tenemos dos picos, el de oxidación y el pico de reducción, tanto con o sin modificadores, también podemos ver que no existen variaciones importantes en la intensidad entre los ciclos, como si pasaba en los de Tirosinasa, lo que es indicativo de una mayor estabilidad.

Quizá en el que podemos ver más variaciones entre los diferentes ciclos es el que está modificado con ftalocianina de Cobre, en la zona del pico de oxidación. Siendo el biosensor modificado con LuPc2 el que muestra intensidades más altas a la vez que un desplazamiento del pico de oxidación a potenciales menores y mejor reversibilidad.

Si los analizamos numéricamente vemos que el biosensor de PEDOT-PSS/Lac alcanza intensidades no muy altas en ambos picos, por ejemplo en el pico de oxidación, se da para el potencial de aproximadamente 1V y la intensidad de $12 \mu\text{A}$. El pico de reducción, se da en un potencial de -0.1V y a una intensidad de $-18 \mu\text{A}$.

El biosensor que más se parece, en cuanto a la morfología al de PEDOT-PSS, como podemos observar, es el de AuNP, variando en la zona de oxidación, estando el pico de oxidación menos definido en este caso.

Como vemos el que tiene un pico de oxidación más marcado es el que está modificado con Lutecio, el pico se produce a un potencial de 0.8V y llega a una intensidad de 23 μA , el pico de reducción también es el pico que más “marcado” está, se da en un potencial muy próximo a cero llegando a alcanzar una intensidad de -25 μA .

❖ Estudio cinético.

Como hemos hecho a lo largo del trabajo, el primer biosensor al que vamos a analizar es de PEDOT-PSS/Lac.

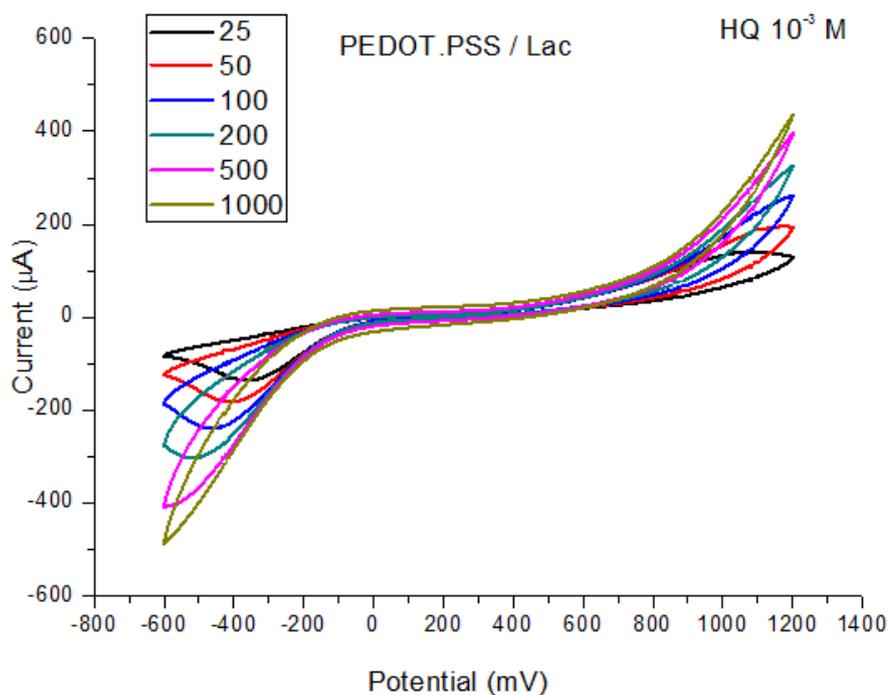


Figura 4.17, Estudio cinético de Pedot-PSS/Lac en Hidroquinona 10⁻³ M con diferentes velocidades de barrido. Las velocidades se miden en mV/s

En esta imagen se observa que el sensor no presenta los picos de oxidación y reducción definidos, los cuales sí que se veían en el apartado anterior, cuando se aumenta la velocidad de barrido por encima de 200mV/s.

v (mV/s)	v ^{1/2} (mV/s) ^{1/2}	I (μA)
25	5,00	136,16943
50	7,07	182,22046
100	10,00	238,92212
200	14,14	303,25317
500	22,36	407,89795
1000	31,62	486,02295

Tabla 4.8. Cálculo estudio cinético PEDOT-PSS/Tyr en Catecol 10-3 M.

Estas son las intensidades (en valor absoluto), las cuales se corresponden con el pico de reducción para cada velocidad de barrido junto con los valores de velocidades y las raíces cuadradas de cada velocidad.

En la siguiente imagen podemos ver las gráficas obtenidas al representar la Intensidad en función de V y de V^{1/2}.

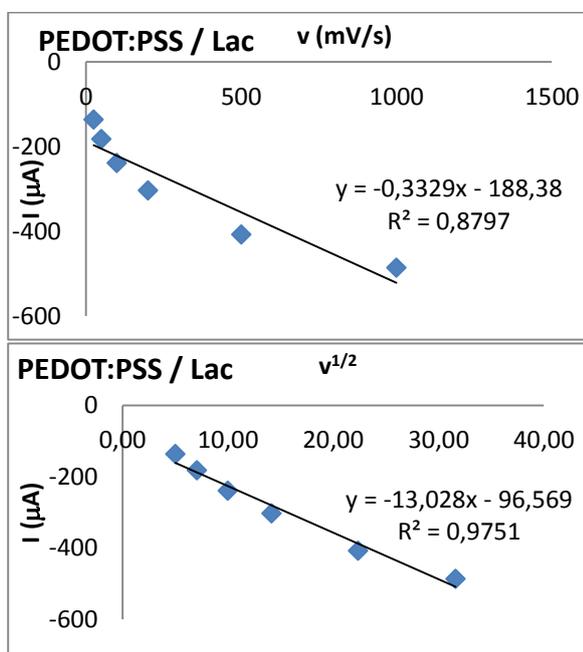


Figura 4.18, Recta de calibración de biosensor PEDOT-PSS/Lac en Catecol para el estudio cinético. Gráfica arriba: en función del V, gráfica abajo en función de V^{1/2}

Como podemos ver en las gráficas, presenta un mejor ajuste la que está representada en función de la $V^{1/2}$, esto nos indica que el mecanismo limitante es el de difusión. Para comprobar que esto es cierto, representamos la intensidad frente al log de V.

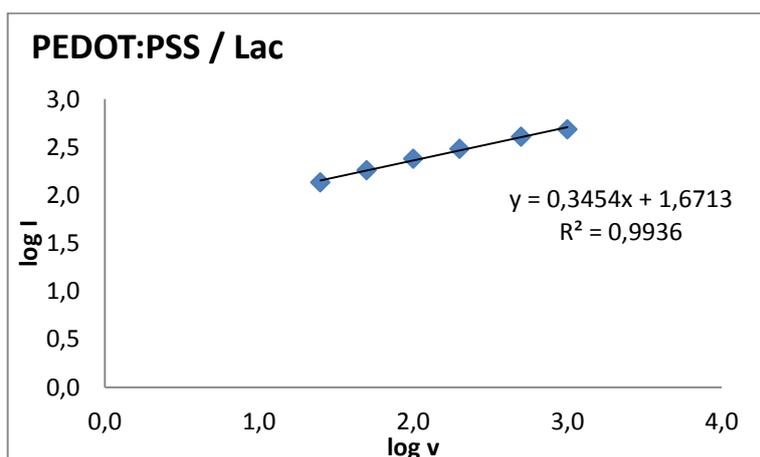


Figura 4.19, Recta de calibración de biosensor PEDOT-PSS/Lac en Catecol para el estudio cinético.

Como podemos ver la pendiente tiene un valor próximo a 0.5, esto nos confirma que el mecanismo limitante es el de difusión.

Para ver lo que ocurre en los diferentes biosensores hemos hecho exactamente lo mismo, y estos han sido los resultados que hemos obtenido.

	Relación con la velocidad de barrido, $I(\mu A)$ vs $V(mV)$		Relación con la velocidad de barrido, $I(\mu A)$ vs $V^{1/2}$		Relación con la velocidad de barrido, $\log I$ vs $\log V$	
	Pendiente	R^2	Pendiente	R^2	Pendiente	R^2
PEDOT-PSS	0.3329	0.8797	13.028	0.9751	0.3454	0.9936
PEDOT-PSS+ LuPc	0.4147	0.8866	16.19	0.9783	0.3597	0.9956
PEDOT-PSS+ CuPc	0.4287	0.8666	16.85	0.9688	0.3622	0.9904
PEDOT-PSS+ AuNP	0.3734	0.8687	14.661	0.9694	0.3292	0.9917

Tabla 4.9, Valores obtenidos entre la relación de velocidad de barrido, la pendiente de la recta de regresión y el ajuste obtenido en los biosensores de Lacasa.

Como se puede ver en la gráfica, al igual que pasaba con los biosensores de tirosina, el coeficiente de correlación con la raíz de la velocidad es muy alto, esto nos indica, que el mecanismo limitante es la difusión.

Siguiendo el mismo esquema que se siguió en el estudio de los biosensores de *Tirosinasa*, vamos a analizar a continuación el comportamiento del biosensor modificado con ftalocianina de lutecio.

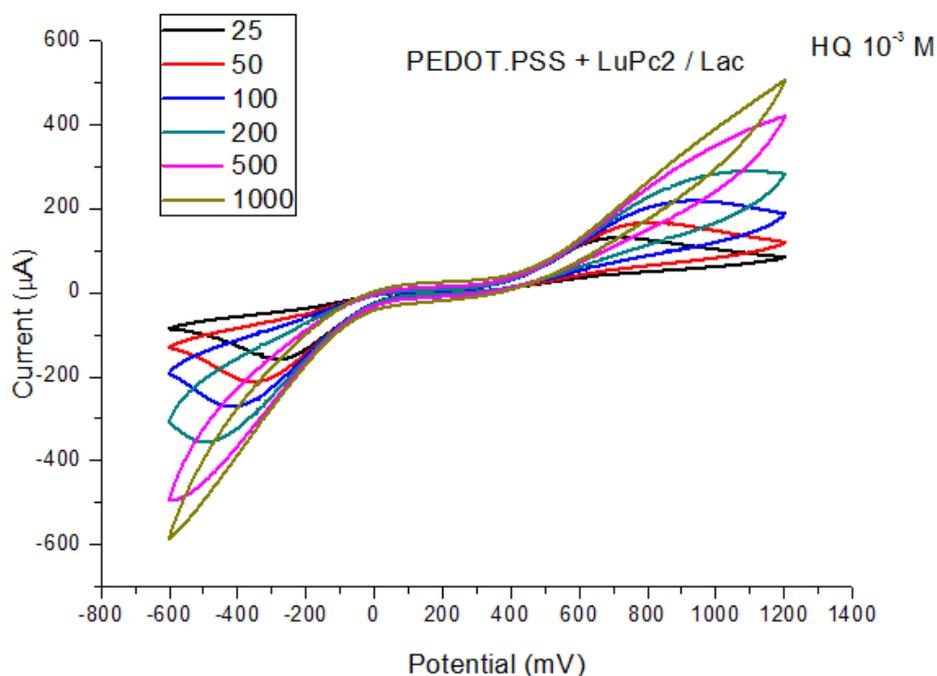


Figura 4.20, Estudio cinético de Pedot-Pss+LuPc₂/Lac en Hidroquinona 10⁻³ M con diferentes velocidades de barrido. Las velocidades se miden en mV/s

Vemos que el pico es más visible en las velocidades menores, y que se va alejando cada vez más, esto nos indica, que el proceso se va haciendo cada vez más irreversible al aumentar la velocidad de barrido aunque todavía son visibles los dos picos de oxidación y reducción.

Si ahora analizamos la cinética del biosensor modificado con ftalocianina de cobre:

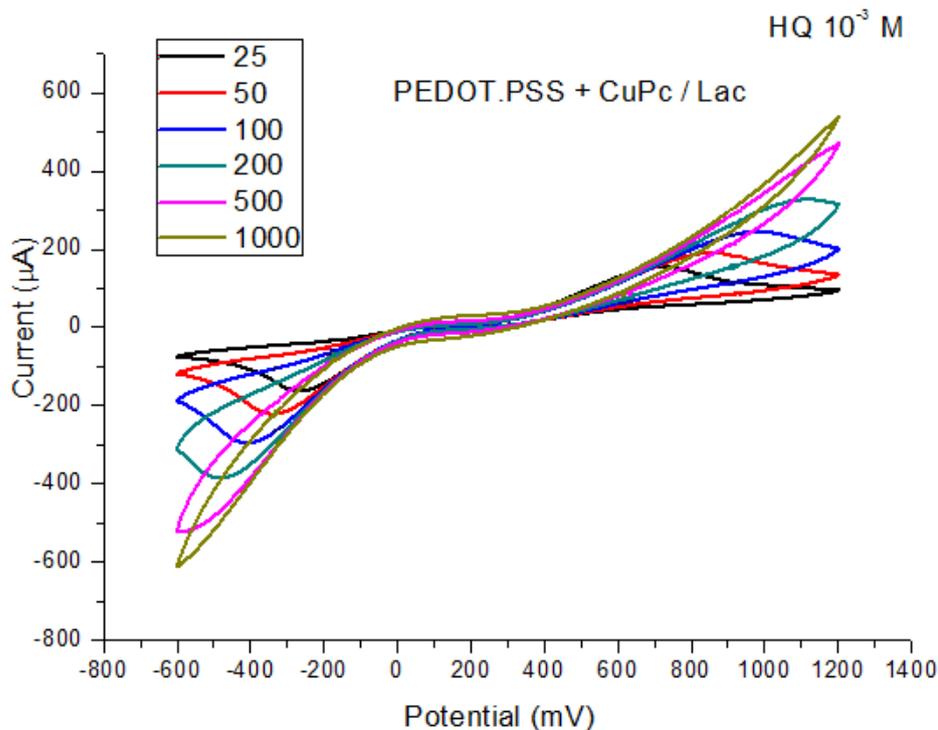


Figura 4.21 Estudio cinético de Pedot-Pss+CuPc/Lac en Hidroquinona 10^{-3} M con diferentes velocidades de barrido. Las velocidades se miden en mV/s

En este biosensor podemos ver que tiene pico, tanto de oxidación como de reducción, y en ambos, se ve más claro en las velocidades menores y a media que la velocidad va aumentando el pico es menos pronunciado, va creciendo de intensidad.

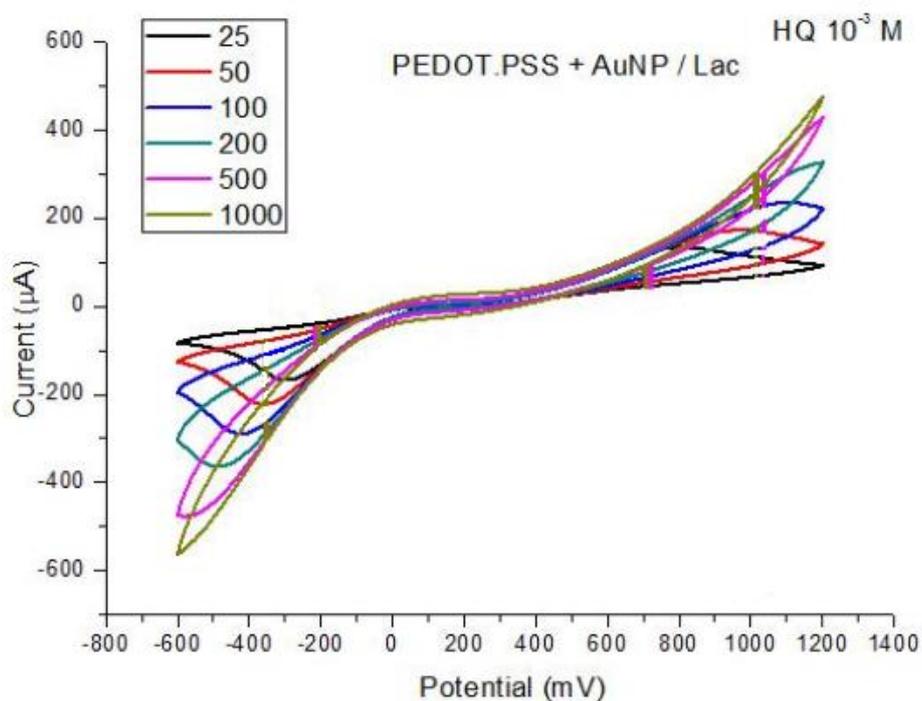


Figura 4.22, Estudio cinético de Pedot-Pss+AuNP/Lac en Hidroquinona 10^{-3} M con diferentes velocidades de barrido. Las velocidades se miden en mV/s

Podemos ver que en el caso del biosensor modificado con nanopartículas de oro los picos de reducción son más pronunciados que los de oxidación, aunque en ambos casos claramente visibles.

❖ Límites de detección.

Vamos a proceder a calcular los límites de detección de los biosensores de modo análogo a lo realizado anteriormente en el caso de los sensores con tirosinasa, en primer lugar, el límite de detección del biosensor de PEDOT-PSS/Lacasa.

En la siguiente gráfica se puede ver las respuestas para las diferentes concentraciones de hidroquinona medidas en la solución de buffer.

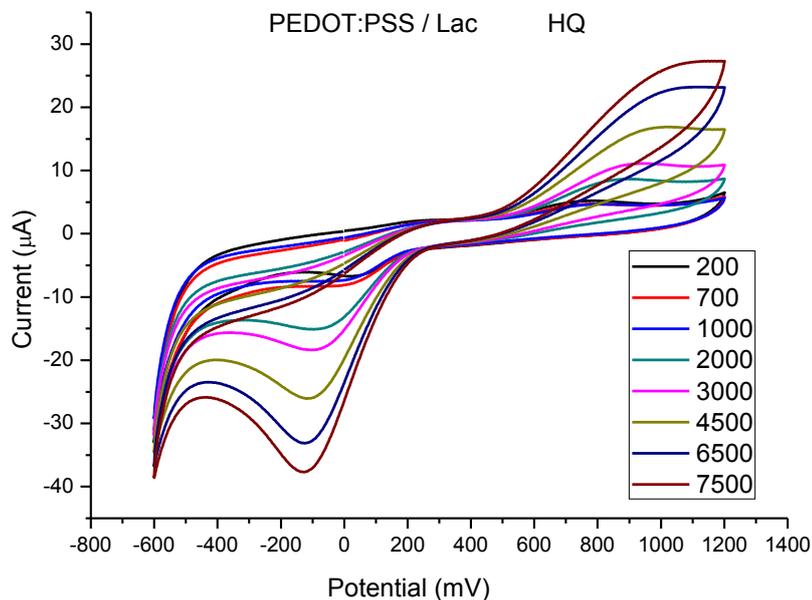


Figura 4.23, Limite de detección de PEDOT-PSS/Lac en Hidroquinona

En el caso de los biosensores de Lacasa, hemos cambiado el Catecol por la Hidroquinona pero las concentraciones a las que hemos medido son las mismas.

En la gráfica viene representado el último ciclo de las ocho concentraciones a las que hemos medido, esto es así simplemente para que nos sea más fácil poder comparar los cambios que sufre al añadir la HQ, ya que si representáramos todos los ciclos sería imposible poderlo ver.

Lo primero que nos llama la atención es el pico de reducción, este es un pico muy pronunciado, lo que muestra la actividad del enzima y también que en este tipo de biosensores, con Lacasa, se muestra claramente el pico de oxidación.

Para poder calcular el límite de detección representamos las intensidades máximas de los picos, tanto en el de reducción como en el de oxidación, para cada una de las concentraciones.

Primero calculamos para la oxidación:

Concentración	intensidad
$1,40 \cdot 10^{-5}$	4,68048
$2,00 \cdot 10^{-5}$	4,68597
$4,00 \cdot 10^{-5}$	8,66394
$6,00 \cdot 10^{-5}$	11,12366
$9,00 \cdot 10^{-5}$	16,89453
$1,30 \cdot 10^{-4}$	23,20557
$1,50 \cdot 10^{-4}$	27,31934

Tabla 4.10, Concentraciones e intensidades de pico de oxidación.

Cuando ya tenemos los datos, podemos realizar los cálculos del límite de detección, primero para los de oxidación. La fórmula que hemos utilizado para ello es:

$$LOD = \frac{3 \cdot SD}{m} \quad (\text{Ecuación 5.})$$

Siendo SD la desviación estándar de las intensidades para el potencial al que aparece el pico de oxidación y m la pendiente de la recta de calibración. Para calcular la desviación estándar hemos marcado un potencial medio (de los tres últimos ciclos) para las medidas de la intensidad ya que el potencial del pico va variando como ya hemos visto.

Para el cálculo de la pendiente, lo que debemos hacer es representar los datos obtenidos de las intensidades de pico (en μA), en función de las concentraciones (en mol/L) a las cuales se dan, los datos que he puesto anteriormente en la tabla 4.10, obteniendo:

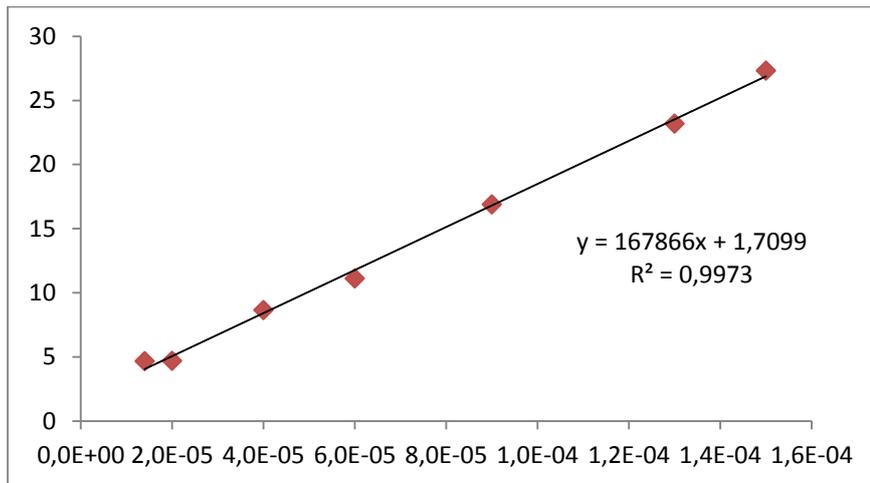


Figura 4.24, Recta de calibración de PEDOT-PSS/Lac en Hidroquinona para el cálculo de LOD.

Como podemos ver tiene un ajuste casi perfecto, sin necesidad, como teníamos en el caso de los de Tirosinasa, de dividir en dos rectas.

Ahora ya tenemos todos los datos necesarios para el cálculo de LOD, aplicando la ecuación que hemos comentado anteriormente, obtenemos:

$$LOD = \frac{3 \cdot 0.443023612}{167866} = 7.91745 \cdot 10^{-6}$$

Este es un valor bastante bajo de límite de detección, lo que indica un buen comportamiento, también para los sensores modificados con Lacasa.

Si ahora hacemos esto mismo para el pico de reducción, los datos de intensidad de pico que tenemos para cada una de las concentraciones son:

Concentración	Intensidad
4,00 · 10 ⁻⁵	-6,22253
1,40 · 10 ⁻⁵	-8,32825
4,00 · 10 ⁻⁵	-15,12451
6,00 · 10 ⁻⁵	-18,39294
9,00 · 10 ⁻⁵	-26,07117
1,30 · 10 ⁻⁴	-33,12988
1,50 · 10 ⁻⁴	-37,70142

Tabla 4.11, Concentraciones e intensidades de pico de reducción.

Si representamos estos datos obtenemos la siguiente gráfica:

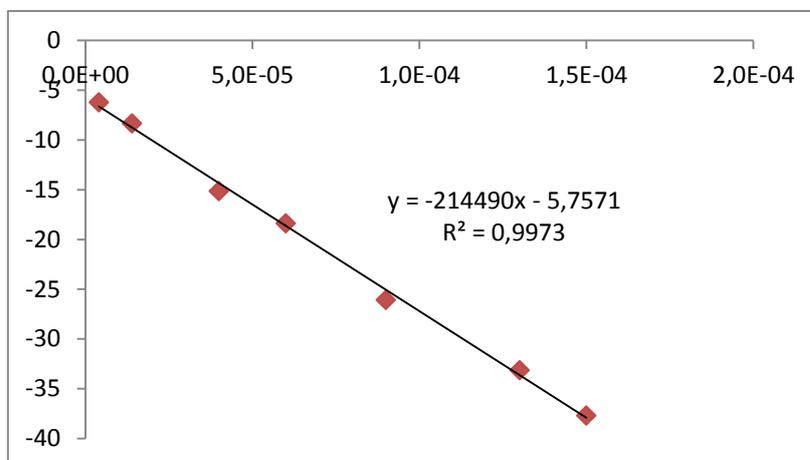


Figura 4.25, Recta de calibración de PEDOT-PSS/Lac en Hidroquinona para el cálculo de LOD.

Como podemos ver esta línea también tiene un valor muy próximo a uno, siendo el valor idéntico al que hemos obtenido en oxidación.

Si aplicamos la ecuación anteriormente comentada: $LOD = \frac{3 \cdot SD}{m}$ nos queda:

$$LOD = \frac{3 \cdot 0.429693883}{214490} = 6.00998 \cdot 10^{-6}$$

Como podemos ver, el valor del límite de detección es incluso menor que en el caso de reducción y el ajuste es muy bueno también.

Ahora hacemos lo mismo para los demás biosensores de Lacasa, modificados con ftalocianinas y nanopartículas. Lo primero que tenemos es la representación del último ciclo para cada una de las concentraciones:

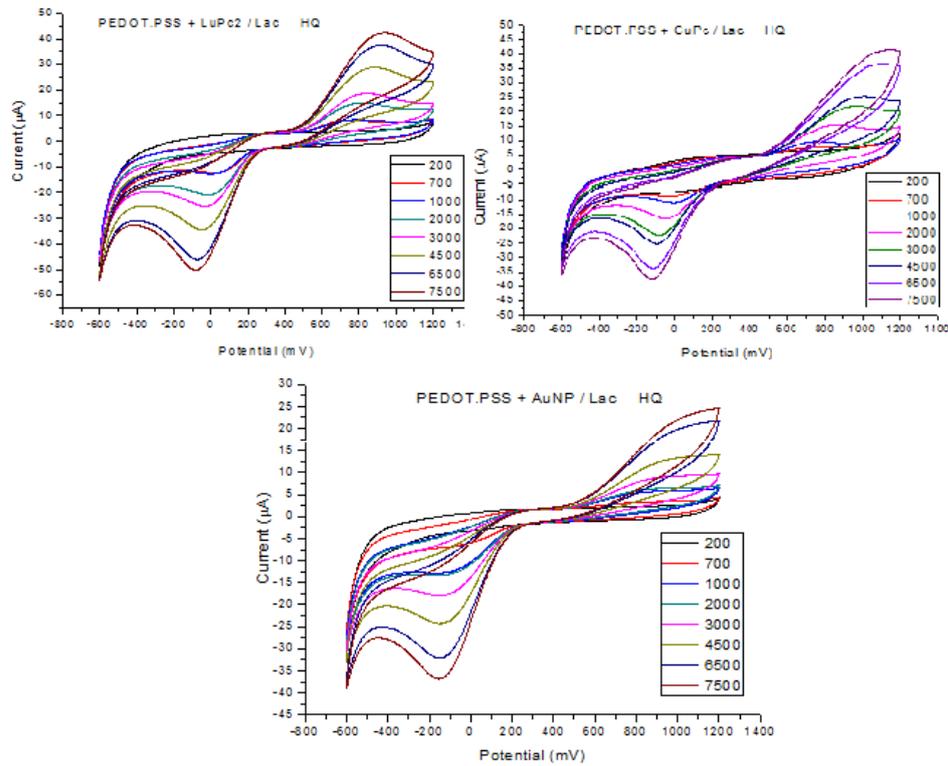


Figura 4.26, Voltamograma de los diferentes biosensores modificados

Podemos ver que en todos los casos claramente ambos picos, tanto el de reducción como el de oxidación, en el caso del biosensor modificado con ftalocianina de Lutecio, vemos que alcanza en el pico de oxidación intensidades muy altas y los picos son más reversibles. Lo mismo que para el pico de reducción, es decir, la ftalocianina está realizando correctamente su función como mediador electrónica.

En la siguiente grafica podemos ver los diferentes LD obtenidos en el pico de oxidación para cada uno de los sensores:

PEDOT-PSS/Lac	$7,91745 \cdot 10^{-6}$
Pedot-Pss+LuPc2/Lac	$3.11791 \cdot 10^{-6}$
Pedot-Pss+CuPc/Lac	$6.58022 \cdot 10^{-6}$
Pedot-Pss+AuNP/Lac	$5.21632 \cdot 10^{-6}$

Tabla 4.12 Limites de detección calculado para cada uno de los biosensores en el pico de oxidación.

Se observa que todos tienen un valor muy bajo, aunque en este caso el que menos sería el de PEDOT-PSS seguido del biosensor modificado con Lutecio.

4.2. Red de biosensores. Análisis de vinos.

Este apartado es uno de los más importantes del trabajo, debido a que en él se evalúa la respuesta de la red de biosensores que hemos realizado a lo largo del trabajo ante varios tipos de vinos con distintas características, diferentes composición química con objeto de comprobar si nuestra red de sensores es capaz de discriminar entre ellos. Previsiblemente la señal electroquímica obtenida de los sensores variará en función del vino analizado, es decir, en función del contenido de azúcares y polifenoles de cada vino, igualmente esperamos que cada uno de los sensores nos dé una señal propia y característica ante una misma variedad de vino. Así que mediante los diferentes ensayos y análisis estadístico de los vinos comprobaremos si los sensores son capaces de diferenciar las distintas variedades de vinos y como conseguir optimizar al máximo la capacidad de discriminación de nuestra red de biosensores mediante el tratamiento de datos.

Para comparar los diferentes tipos de biosensores lo que vamos a hacer es para un mismo tipo de vino analizar el comportamiento que tienen los diferentes biosensores en función del modificador y del enzima utilizado en la fabricación de los sensores:

En las figuras se han representado la señal obtenida por los cuatro tipos de biosensores con tirosinasa en función de que exista o no modificador y del tipo de modificador. La figura corresponde a una de las ocho variedades en concreto a la de Cabernet.

Efecto modificador.

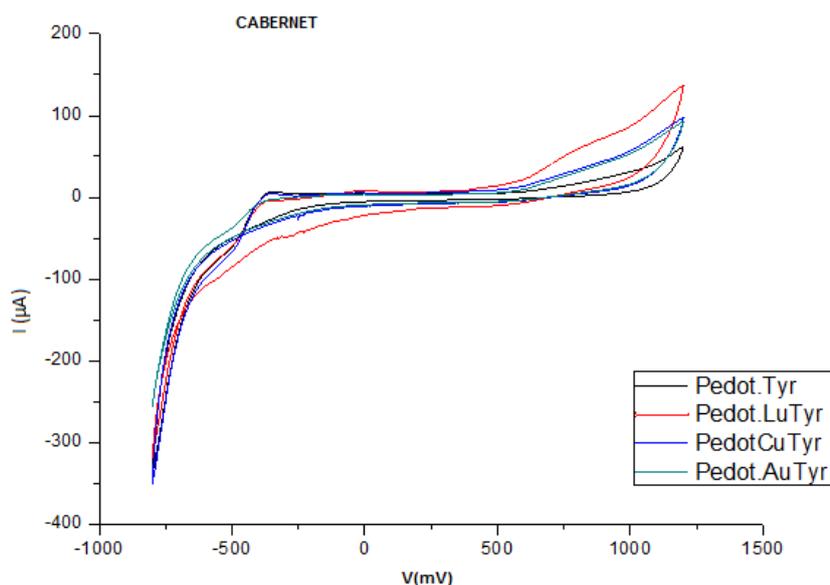


Figura 4.27, Voltamograma de los diferentes biosensores para un mismo vino, Cabernet.

Como se puede observar la morfología de los sensores es muy parecida, como era de esperar, pero se observan diferencias importantes especialmente en las intensidades de los picos, así el que presenta mayores intensidades es el biosensor que está modificado con la ftalocianina de Lutecio. Los sensores con ftalocianina de cobre y los de nanopartículas de oro muestran intensidades similares y claramente superiores a las del biosensor sin modificador.

En el caso de los mismo sensores pero utilizando lacasa como enzima evaluados ante la misma variedad de vino nos encontramos los voltamogramas registrados en la figura 4.27

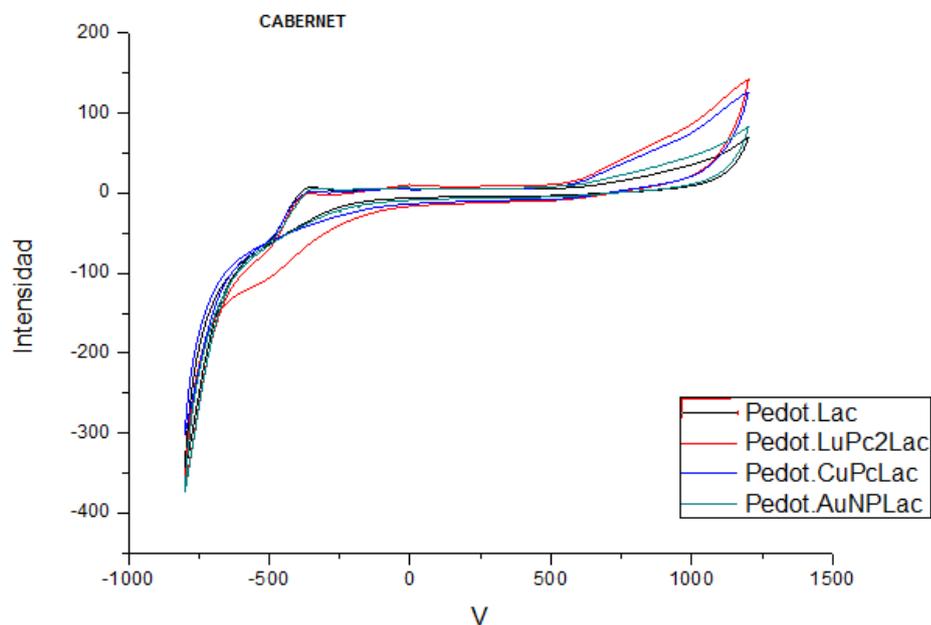


Figura 4.28, Voltamograma de los diferentes biosensores para un mismo vino, Cabernet.

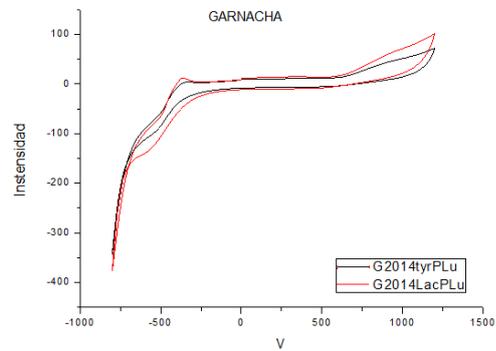
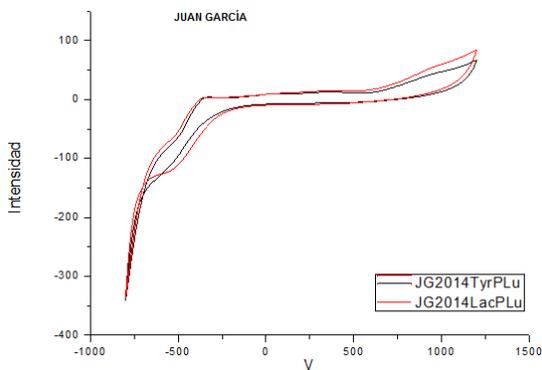
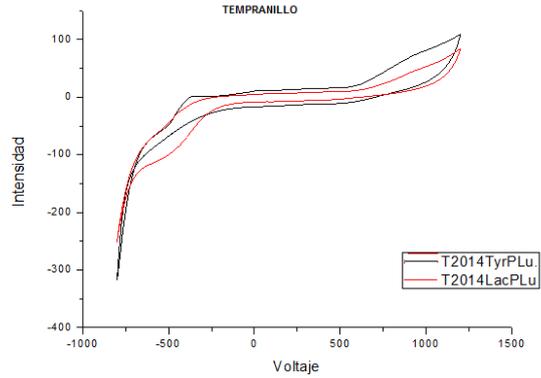
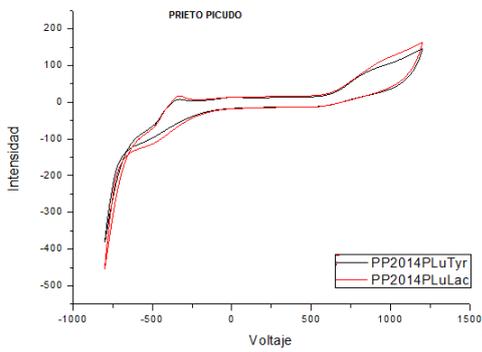
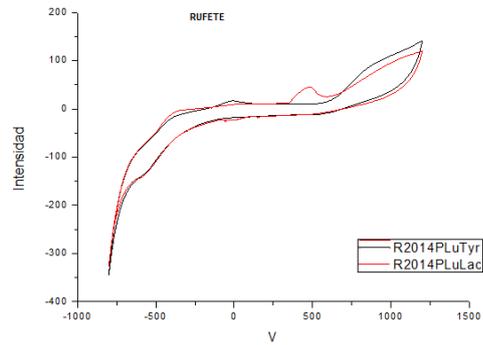
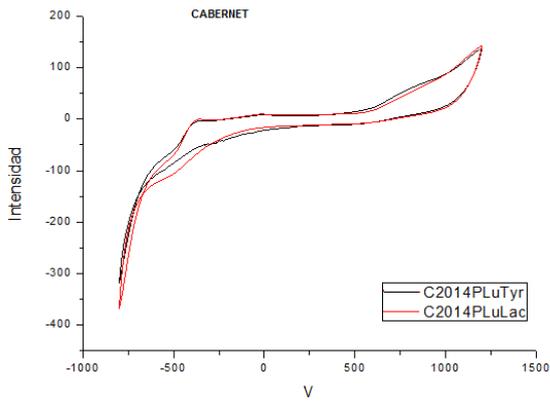
En este caso, al igual que pasaba en los biosensores de tiroxinasa, es el biosensor modificado con la ftalocianina de Lutecio el que presenta mayores intensidades, aunque en este caso el de Pedot-PSS+CuPc/Lac también nos da un buen comportamiento. En todos los casos se observa que los sensores modificados dan lugar a intensidades más altas. En cuanto a la morfología es también el sensor con ftalocianina de lutecio el que da un comportamiento electroquímico diferente especialmente en la zona de reducción. De lo anterior podemos concluir que en todos los casos se observa un efecto electrocatalítico con la adicción del modificador aunque este es mucho más evidente para la ftalocianina de lutecio.

Visto el papel del modificador en el siguiente apartado nos proponemos analizar el diferente comportamiento de nuestros biosensores en función del enzima frente a una misma variedad de vino.

EFEECTO ENZIMA

En este apartado se puede ver como en los diferentes vinos, utilizando el mismo sensor las enzimas son capaces de discriminar los vinos. Se ha seleccionado el biosensor modificado con ftalocianina de lutecio que tal y

como acabamos de ver anteriormente daba máximas intensidades de corriente y por tanto en el que era evidente un mayor efecto electrocatalítico.



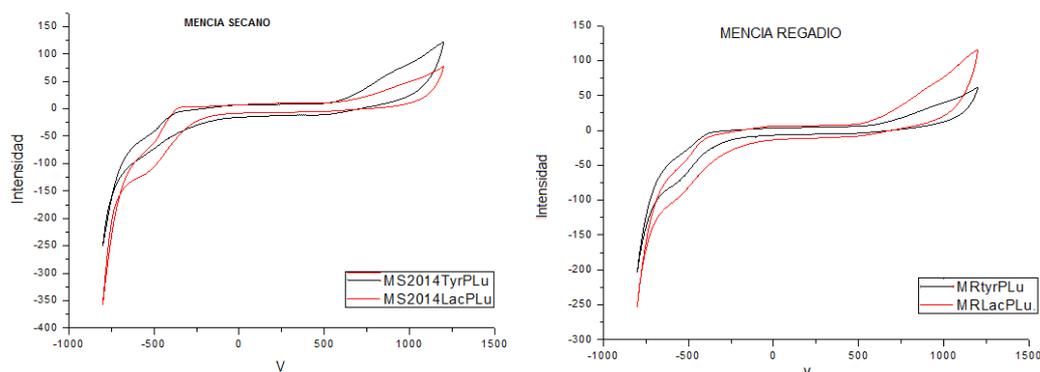


Figura 4.29, Voltamogramas obtenidos con las diferentes variedades de vinos, siendo el mismo biosensor Pedot-PSS/LuPc₂ en cada una de las gráficas podemos ver el efecto de la enzima.

En todos los casos se observa como era previsible una morfología similar con los dos enzimas teniendo en cuenta que ambos son enzimas que se utilizan específicamente para polifenoles. No obstante analizando en detalle las respuestas en las diferentes variedades observamos como en algunas variedades de vinos la diferencias son mínimas en la rama de oxidación es el caso de las variedades de Cabernet, Prieto Picudo y Juan García y son más notables en la reducción, los picos están mejor definidos y son más intensos cuando se utiliza lacasa; mientras que en el resto de variedades las diferencias más importantes entre los dos enzimas se localizan en el barrido de oxidación. En estos casos claramente el pico de oxidación de potenciales más positivos, en torno a 1V, presenta intensidades más altas cuando se utiliza tirosinasa en lugar de lacasa.

EFFECTO MEDIO-VINOS

Finalmente en las siguientes figuras se va a comparar como el biosensor modificado con ftalocianina de Lutecio es capaz de diferenciar los diferentes vinos, obteniendo señales lógicamente similares pero distintas para cada una de las variedades. Se ha realizado este estudio en primer término para los biosensores con tirosinasa, figura 4.30

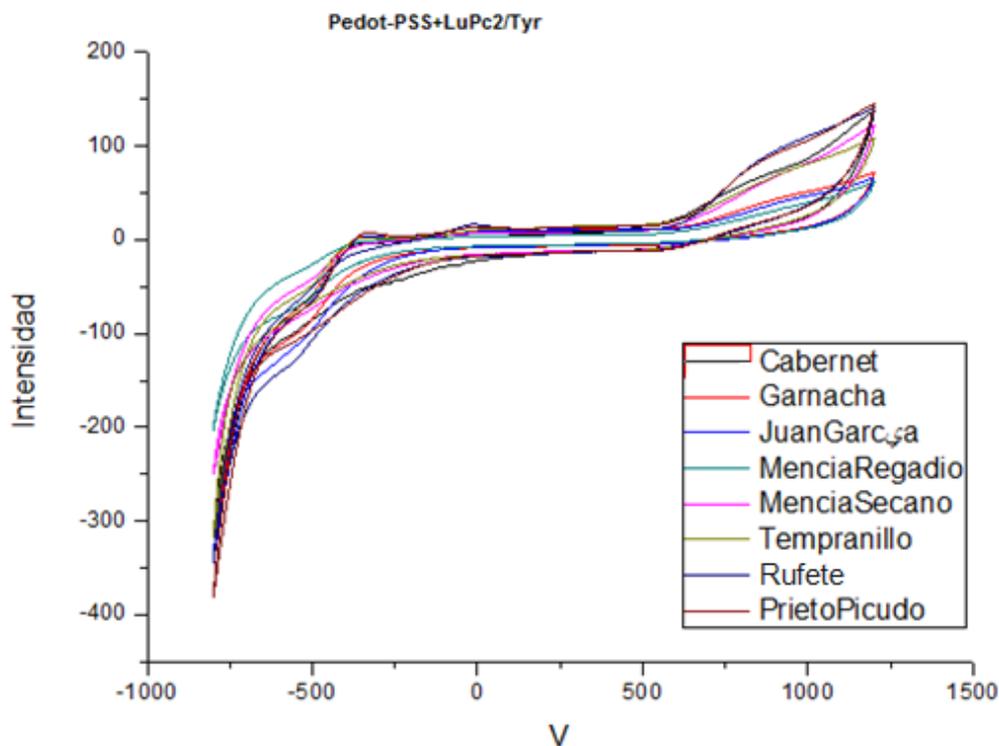


Figura 4.30, Voltamograma de los diferentes vinos para un mismo biosensor, el de Pedot-Pss+LuPc2/tyr.

Se puede ver que en todos los vinos la morfología de los voltamogramas es similar, pero presentan diferencias significativas tanto en el barrido catódico como en el anódico, esto permitirá la diferenciación entre las distintas variedades.

Vemos como en todos los casos se distingue un pico de oxidación a potenciales muy positivos, que es típico de la oxidación de los compuestos fenólicos, en torno a 1V. Este pico vemos que aparece desplazado a potenciales mayores o menores en función de la variedad y que también las intensidades de los picos son claramente diferentes en función de la variedad, las variedades de Rufete y Prieto Picudo son las que dan valores más altos. En muchos sensores se distingue un segundo pico de oxidación en torno a 0V que podría estar asociado a los azúcares y un tercer pico a potenciales más negativos -0.25V, que podría corresponder al contenido en ácidos de los vinos. También la posición y las intensidades de estos picos son función de la variedad.

En lo que respecta al barrido de reducción todos los enzimas muestran un pico de baja intensidad en torno a 0.5V que correspondería a la reducción

de los fenoles y otro a potenciales negativos correspondiente a la reducción de ácidos. También se aprecian diferencias importantes en la reducción del agua a potenciales muy negativos.

La figura 4. 30 muestra de modo conjunto todos los voltamogramas obtenidos para el biosensor modificado con nanopartículas de oro en las diferentes variedades de vino cuando se utiliza lacasa como enzima.

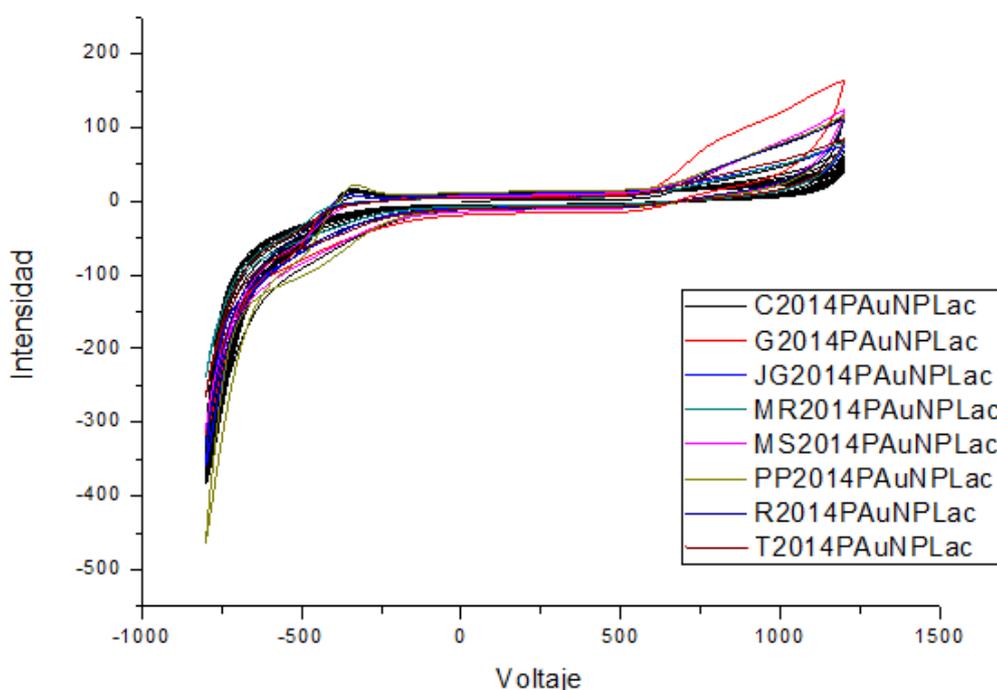


Figura4.31, Voltamograma de los diferentes vinos para un mismo biosensor, el de Pedot-Pss+AuNP/Lac.

Como se puede ver, al igual, que pasaba en el caso anterior, la morfología obtenida con las ocho clases de vinos es muy parecida, presentando todos el tipo de pico, que como ya se ha comentado son correspondientes fundamentalmente a fenoles y ácidos. Las diferencia más significativa es la intensidad que se alcanza en estos picos. Observamos que las intensidades correspondientes al pico de oxidación de los fenoles son máximas para la respuesta del sensor en la variedad de Garnacha mientras que en el pico de

oxidación de los ácidos y en el barrido de reducción es la variedad de Prieto Picudo la que muestra señales más intensas.

TRATAMIENTO DE DATOS

Como acabamos de ver los datos obtenidos en la voltametría cíclica, es decir, en el voltamograma, suponen demasiada información para poder ser analizados. Por esto, debemos aplicar técnicas de análisis de datos multivariantes para poder evaluar la información obtenida.

Hemos realizado dos operaciones: la primera, que consistió en el pretratamiento de las señales voltamétricas, y la segunda, la implantación de técnicas de análisis de datos multivariantes, mediante un método matemático de carácter integral, el cual permite reducir el número de datos contenidos en los voltamogramas, a unos pocos datos. Se basa en la integración de la curva mediante la aplicación de una función matemática denominada “kernel”, la cual se encarga de recorrer toda la curva voltamétrica, de forma que va operando y extrayendo unos pocos valores representativos de ella. Por tanto, gracias a este método, se obtuvieron 10 variables a partir de cada voltamograma.

Se ha de tener en cuenta la información que nos dan los voltamogramas, es decir, los valores de intensidad de corriente y los valores de voltaje. Los valores de potencial registrados son magnitudes termodinámicas de tales especies, específicas y exclusivas, siempre dadas para unas condiciones experimentales determinadas. La intensidad de corriente, por una parte, está ligada a las características de tipo cinético de los procesos REDOX, y también posee una relación directa con la concentración de la especie electroactiva responsable del pico.

Una vez que se ha aplicado la función de Kernel, el siguiente paso es la normalización de los valores obtenidos mediante la aplicación auto-escalado. Este paso consiste en un centrado de datos, es decir, sustracción a cada valor de la media de la totalidad de los valores de intensidad de las señales, seguido de una división por la desviación estándar, de tal forma que se consigue que todos los valores tengan media igual a cero y varianza igual a uno.

Ahora ya se puede llevar a cabo los análisis de datos multivariantes, en este caso se han realizado mediante Principal Component Analysis, PCA, (en español: ACP, Análisis de Componentes Principales), la cual sirve para

analizar y explorar la estructura de los datos, y encontrar las relaciones o clases entre ellos, estudiar la influencia de cada sensor en la distribución de clases, e incluso depurar la matriz de datos por detección y eliminación de espurios (valores con excesiva varianza residual o influencia anómala dentro del conjunto), ya sean variables u objetos. [21]

Como se puede ver a continuación, todos los biosensores utilizados en el estudio tienen aproximadamente el mismo peso sin destacar excesivamente, uno sobre los otros.

Se muestran los resultados gráficos obtenidos en los tres tipos de redes, empezando por la red de sensores con enzima lacasa, a continuación con enzima de tirosinasa y finalmente de modo conjunto con las dos enzimas. El análisis se ha realizado utilizando la rama de oxidación, la rama de reducción y finalmente utilizando de forma conjunta los barridos anódicos y catódicos. En las gráficas se representa la componente principal PC1 frente a PC2 y frente al PC3.

Enzima LACASA

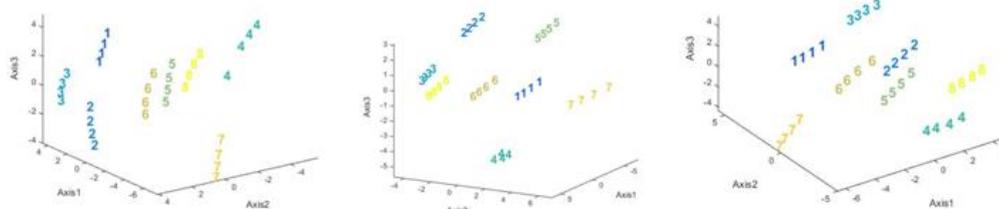


Figura 4.32, PCA en 3D obtenido con los biosensores de Lacasa. De izquierda a derecha está la gráfica de oxidación, reducción, y en la derecha mezcla oxidación-reducción. La numeración de los vinos es 1-PP, 2-JG; 3-C; 4-G; 5-T; 6-MR; 7-MS; 8- R.

Como se puede observar en las tres graficas los aglomerados se encuentran ocupando las diferentes regiones del diagrama, esto lo que nos indica es que tiene la capacidad de discriminar entre las ocho variedades de vino, ya que los clusters aparecen suficientemente separados unos de otros. Si observamos cada uno de los aglomerados podemos ver que en los tres

casos existe una dispersión en todos los vinos entre las cuatro repeticiones realizadas.

Centrándonos en las diferencias entre los barridos anódicos y catódicos, en el gráfico de oxidación podemos ver que las señales correspondientes a los vinos, Tempranillo, Mencía Regadio y Rufete se encuentran más cercanos dentro de la gráfica, lo que podría ser indicativo de un similar contenido polifenólico. Considerando la dispersión encontrada en cada uno de los vinos, se observa que el vino Garnacha es el que aparece más disperso, y por tanto el que en principio tendría un contenido en antioxidantes diferente del resto.

Si observamos el gráfico de reducción, se ve que los vinos que aparecen más próximos entre sí son el Mencía Regadio y el Rufete, siendo la variedad Tempranillo la que aparece más diferenciada. En el resto se observa una buena discriminación. En este caso, se observa en general menor dispersión entre las diferentes repeticiones que en el caso de la oxidación, siendo el que mayor dispersión presenta el Mencía Secano.

Para el caso de análisis de forma conjunta el de oxidación-reducción, se observa que a pesar de que la varianza fuera más baja que en los casos anteriores, como se verá a continuación, la figura muestra que existe muy buena discriminación, incluso mejor que en los casos anteriores. En los tres análisis la variedad de Mencía Secano es la que aparece claramente más separada del resto.

Enzima TIROSINASA.

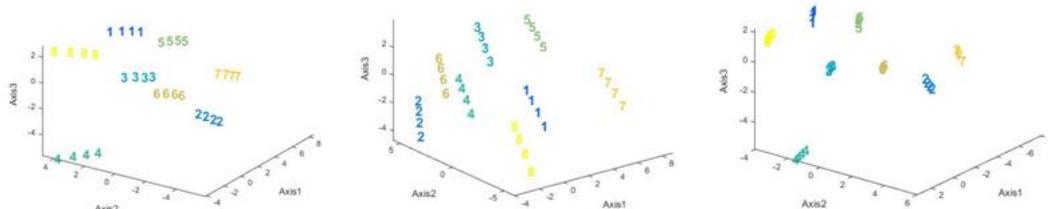


Figura 4.33, PCA en 3D obtenido con los biosensores de tiroxinasa. De izquierda a derecha está la gráfica de oxidación, reducción, y en la derecha mezcla oxidación-reducción.

Al igual que se ha observado en los biosensores modificados con la enzima Lacasa, se ve que en todas las gráficas, los diferentes aglomerados se encuentran situados ocupando todas las regiones del gráfico, lo cual nos

indica que de nuevo la red tiene una buena capacidad de discriminar entre las diferentes variedades de vino.

Como se puede observar, en el caso de utilizar en el análisis, la rama de oxidación, los aglomerados presentan menor dispersión si los comparamos con el resultado del análisis en la rama de reducción. Considerando la rama de oxidación, se observa que el vino Garnacha está más alejado del resto de vinos y que por tanto se diferencia más claramente del resto.

En la gráfica de reducción, lo que más llama la atención es como ya se ha comentado una mayor dispersión entre repeticiones siendo esta mayor en la variedad Rufete; también se puede observar como aparecen casi solapados las repeticiones realizadas con las variedades de Garnacha y de Mencia Regadio. En cuanto a las diferencias entre variedades, es en este caso el Mencia Secano el que aparece más alejado del resto.

Al analizar la gráfica de combinación de oxidación-reducción vemos que es la que mejor discrimina de las tres, como ya ocurría en la red con Lacasa, ya que existe una gran dispersión entre todos los vinos y se combina, con la gran concentración que existe entre cada uno de los aglomerados.

Enzima TIROSINASA+ LACASA

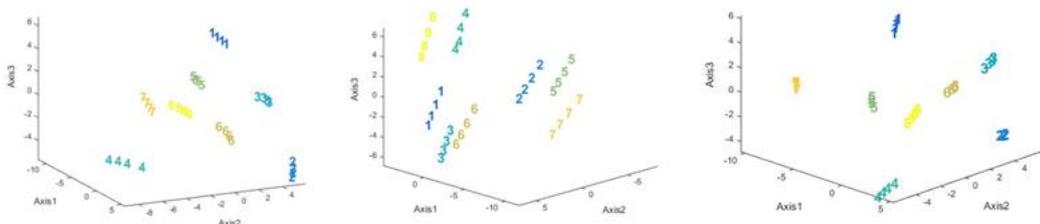


Figura 4.34, PCA en 3D obtenido con los biosensores de Lacasa+tiroxinasa. De izquierda a derecha está la gráfica de oxidación, reducción, y en la derecha mezcla oxidación-reducción

Finalmente analizamos el resultado de la red en la que combinamos los dos enzimas comparando con los casos en que se ha utilizado una enzima sola u otra. Se observa una mayor capacidad de discriminación entre variedades a la vez que existe una menor dispersión dentro de las repeticiones para cada una de las muestras.

Se puede por tanto concluir, que la unión de ambas enzimas hace que se obtenga una mejor red para su uso como lengua bioelectrónica con una muy alta capacidad de discriminación entre las diferentes variedades de vino de la añada de 2014.

Por último podemos ver la tabla adjunta en la que se representa el porcentaje de importancia de las tres componentes principales para cada una de las tres redes en estudio:

	PC1 (%)	PC2 (%)	PC3 (%)	TOTAL (%)
LACASA				
Oxidación	30,4970	23,8847	14,2415	68,6232
Reducción	33,8925	31,2131	15,2270	80,3326
Todo	27,7651	22,6790	16,3389	66,7830
TYROSINASA				
Oxidación	35,5054	20,3655	16,2781	72,1490
Reducción	37,4380	28,2147	13,8553	79,5080
Todo	30,5968	22,7011	13,7949	67,0928
TYR-LAC				
Oxidación	31,3429	20,0127	14,0026	65,3582
Reducción	31,1671	20,1373	17,9657	69,2701
Todo	28,1983	16,3459	14,2223	58,7665

Tabla4.13, Porcentajes de los principales componentes.

Se puede apreciar que las varianzas tienen un rango desde, aproximadamente 58.7 hasta 79.5, siendo en los tres tipos de redes mayor la varianza obtenida en el análisis del barrido de reducción, para los tres casos diferentes, esto es lógico teniendo en cuenta que las enzimas actúan fundamentalmente en el pico catódico. Si se comparan las redes individuales con las de la mezcla de las dos enzimas, se puede apreciar que en cuanto a la varianza es la enzima Lacasa la que obtiene mejores resultados, seguida de la enzima Tirosinasa, y por último tendríamos la unión de ambos. No obstante a pesar de su menor varianza los resultados anteriormente descritos han puesto de manifiesto que es la red combinada la que muestra mayor capacidad de discriminación.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.

Las conclusiones más importantes del trabajo se resumen en los siguientes puntos:

-Se ha diseñado una red de biosensores a partir de PEDOT-PSS como polímero conductor utilizando diferentes tipos de modificadores, ftalocianinas y nanopartículas, a la que se le ha adicionado enzimas, bien sea lacasa o bien tirosinasa, para mejorar su capacidad de discriminar ante ocho variedades diferentes de vinos.

- Se ha estudiado el comportamiento voltamétrico de los diferentes biosensores, con objeto de analizar el efecto del modificador y del enzima en la respuesta de los sensores ante dos antioxidantes clásicos en alimentación como son catecol e hidroquinona.

- El estudio cinético revela que el mecanismo que controla el proceso de oxidación-reducción en el antioxidante es para todos los biosensores la difusión.

- La modificación de los sensores y el uso de enzimas nos ha permitido obtener límites de detección muy bajos, por debajo de micromolar. El uso de ftalocianina de lutecio combinado con lacasa como enzima, permite obtener los menores límites de detección. Se ha observado tendencia a la saturación del enzima para concentraciones elevadas.

- El estudio voltamétrico de los biosensores en vinos indica que las respuestas son específicas para cada uno de los diferentes biosensores y para cada una de las variedades de vino.

- El análisis multivariante mediante PCA permite discriminar claramente entre las ocho variedades de vinos para cualquiera de las tres redes de biosensores utilizadas, si bien, es la red en la que se combinan sensores con tirosinasa y lacasa, y considerando los dos barridos anódicos y catódicos, la que da lugar a mayor capacidad de discriminación.

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA.

1. Naoi, K.; Lien, M.; Smyrl, W. H. J. *Electrochem. Soc.* 138 (1991) 440.
2. <http://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/288>
3. <http://www.uned.es/dpto-fisicoquimica/investigacion/lineas-conductores.htm>
4. <http://www.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/1-2257293308944839432091/028887.pdf>
5. <http://hdl.handle.net/11627/288>, “caracterización óptica y eléctrica de películas de PEDOT-PSS tratados con dopantes secundarios”
6. Pettersson, L.A.A., T. Johansson, F. Carlsson, H. Arwin, O. Inganäs. 1999. *Synth Met.* 101:198.
7. L.Pigani, G. Foca, A. Ulrici, V. Martina, “Classification of red wines by chemometric analysis of voltammetric signals from PEDOT-modified electrodes”.
8. L.Pigani, K.Ionescu, V.Martina, F.Terzi, “Amperometric sensor based on poly (3,4- ethylenedioxythiophene)-modified electrodes: Discrimination of whites wines.
9. A.Legin, A.Rudnitskaya, Y.Vlasov, *sens.updat.*10. 143
10. Hulanicki, A., Głab, S and Ingman, F., (1991), “Chemical Sensors definitions and classification”, *Pure&App/Chern.*, Vol. 63, pp 1247-1250.
11. Cano Luna M,(2008). “Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras”.
12. Immobilized Biocatalysis – from simple to Complex-systems. W. Hartmeiner. *Trends in Biotechnology*, 1985. 3(6):p.149-153.
13. 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.
14. Labrador Montero, R.H., “Diseño y caracterización de sensores químicos en estado sólido. Aplicación de modelos teóricos para el estudio de interferencia”.

15. Richard G. Compton, Craig E. Banks, (2011), "Understanding Voltammetry", London Imperial College, 2ª edición, pp 107-126.
16. V. Carralero, (2009) "*Preparación de biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro*". Universidad Complutense de Madrid.
17. Cabaj, J. and Sołoducho, J., (2014), "Nano-Sized Elements in Electrochemical Biosensors", Materials Sciences and Applications, Vol. 5, pp 752-766.
18. Andrés de la Escosura et al; *J. Am. Chem. Soc.*; 2003; 125; 12300-12308.
19. Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., Di Natale, C., D'Amico, A. (2005). Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 77 (11), 1965-1983.
20. Jimenez, C., Muñoz, F.J., Bratov, A., Domínguez, C., Electronic tongues: chemical sensors applied to flavour measurement and food quality control (2011)
21. Celia García Hernández, "Desarrollo de una lengua electrónica para el análisis de uvas basada en sensores EQCM modificados".