



UNIVERSIDAD de VALLADOLID



ESCUELA de INGENIERÍAS INDUSTRIALES

INGENIERO TÉCNICO INDUSTRIAL, ESPECIALIDAD EN QUÍMICA INDUSTRIAL

PROYECTO FIN DE CARRERA

**DESARROLLO DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS MEDIANTE
LA TÉCNICA DE LANGMUIR-BLODGETT. APLICACIÓN COMO
SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE
ANTIOXIDANTES**

Autor:

González Gutiérrez, José Joaquín

Tutora:

Rodríguez Méndez, María Luz

**Química Física y Química
Inorgánica**

SEPTIEMBRE – 2012

AGRADECIMIENTOS

Tengo mucho que agradecer y a mucha gente. Me gustaría empezar por aquellos que me han ayudado de forma directa a conseguir realizar este proyecto. Quiero dar las gracias a mi tutora MariLuz, en primer lugar por permitirme participar de su grupo de investigación dándome la oportunidad de vivir una nueva experiencia, por su inagotable paciencia incluso cuando no he sido merecedor de ella y por su dedicación extra que me ha permitido defender mi proyecto.

Agradezco especialmente a mi compañera de trabajo Cristina todo lo que me ha enseñado, lo que me ha ayudado, sus consejos, sus apuntes, su amabilidad... Sin ella mi estancia en el laboratorio hubiera sido infinitamente más tediosa y muchísimo más prolongada. Sin ella no hubiera podido realizar este proyecto.

También me gustaría agradecer a Gloria su ayuda, saber que tienes a alguien con quien puedes contar, con quien charlar, alguien que te anime y que te inspire alegría facilita mucho las cosas.

Doy las gracias también a María Jesus, de la cual he recibido clases en otra época, que se ha mostrado amable y totalmente dispuesta a ayudarme cuando así se lo he pedido.

Gracias a aquellos que han pasado por el laboratorio durante mi estancia y con los cuales he compartido buenos y malos ratos, conversaciones y que se llevan un trocito de mi amistad como Pablo y Constantín.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de clase que han estado a mi lado a lo largo de mi vida universitaria, tanto en los buenos ratos de cafetería y como en los malos tragos en época de exámenes. Sobre todo tengo un recuerdo especial para dos verdaderos sufridores como yo, Sergio y Raúl.

Agradezco de todo corazón a mis colegas, al pack, su más fiel y profunda amistad. Otras personas vienen y van, pero sé que con vosotros puedo contar de verdad. Han sido muchos años de idas y venidas, muchas vivencias, la mayoría buenas, y las que nos quedan por vivir, todavía tenemos cuerda para rato.

Pero sobre todo, quiero agradecer a mi familia todo el apoyo y buenos deseos que me han brindado. A mi familia de San Feliz a los que aprecio profundamente, donde he vivido tantas experiencias y donde he disfrutado tantísimo. A mi familia de Villamor para los que también guardo un sincero agradecimiento.

Finalmente, guardo mi agradecimiento más especial para mis padres. No solo es su constante apoyo, su constante cariño, la fuerza que siempre me proporcionan y que me empuja a seguir adelante. Sino todo lo que han hecho por mi a lo largo de toda mi vida, su educación, sus enseñanzas, ellos han hecho de mi todo lo que soy. Les debo la vida.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. OBJETIVOS	13
4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
5. ESTRUCTURA DEL PROYECTO	14
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	17
2.1. INTRODUCCIÓN	20
2.2. SENSORES	21
2.2.1. Introducción	21
2.2.2. Concepto de sensor	21
2.2.3. Sensores electroquímicos	23
2.2.3.1. Sensores conductimétricos	24
2.2.3.2. Sensores potenciométricos	24
2.2.3.3. Sensores amperométricos	24
2.3. VOLTAMPEROMETRÍA	25
2.3.1. Introducción	25
2.3.2. Clasificación	26
2.3.2.1. Voltametría de barrido lineal	26
2.3.2.2. Voltametría de barrido en escalón.....	28
2.3.2.3. Voltametría de salto potencial.....	28
2.3.2.4. Voltametría cíclica	29
2.4. MÉTODO DE LANGMUIR-BLODGETT.....	33
2.4.1. Introducción.....	33
2.4.2. Funcionamiento de la técnica.....	33
2.5. FTALOCIANINA	37
2.5.1. Introducción.....	37
2.5.2. Tipos de ftalocianinas.....	37
2.5.3. Propiedades	38
2.5.3.1. Propiedades eléctricas.....	38
2.5.3.2. Propiedades ópticas.....	39
2.5.3.3. Propiedades electroquímicas.....	39
2.6. ÁCIDO ARAQUÍDICO	40
2.7. ENZIMA.....	41
2.7.1. Introducción.....	41

2.7.2. Tirosinasa	43
2.7.3. Lacasa.....	45
2.8. ANTIOXIDANTE.....	47
2.8.1. Introducción.....	47
2.8.2. Monofenoles.....	49
2.8.2.1. Ácido vanílico	49
2.8.3. Difenoles.....	50
2.8.3.1. Ácido cafeico.....	50
2.8.3.2. Catecol.....	51
2.8.3.3. Hidroquinona.....	52
2.8.4. Trifenoles.....	53
2.8.4.1. Pirogalol.....	53
2.8.4.2. Ácido gálico.....	53
2.9. GLUTARALDEHÍDO.....	54
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	57
3.1. INTRODUCCIÓN.....	59
3.2. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN.....	59
3.2.1. Materiales.....	59
3.2.1.1. Sustrato sólido.....	59
3.2.1.2. Fase acuosa.....	59
3.2.1.3. Disolvente.....	60
3.2.1.4. Agentes modificadores.....	60
3.2.1.5. Antioxidantes.....	60
3.2.1.6. Otros reactivos.....	61
3.2.2. Instrumentación.....	61
3.2.2.1. Balanza de Langmuir-Blodgett.....	61
3.2.2.2. Potenciostato-Galvanostato.....	62
3.2.2.3. Celda electroquímica.....	62
3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	63
3.3.1. Introducción.....	63
3.3.2. Preparación de los soportes de ITO.....	63
3.3.3. Preparación de la balanza para la deposición de ftalocianina.....	65
3.3.4. Deposición de ftalocianina.....	66
3.3.5. Preparación de la balanza para la deposición de enzima.....	67
3.3.6. Deposición del enzima.....	68
3.3.7. Preparación de la celda electroquímica.....	69
3.3.8. Medida de concentraciones.....	71
3.3.9. Medidas del estudio cinético.....	72

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	75
4.1. INTRODUCCIÓN.....	79
4.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	80
DE LOS SENSORES	
4.2.1. Introducción.....	80
4.2.2. Isotermas.....	80
4.2.2.1. Introducción.....	80
4.2.2.2. Isoterma ácido araquídico.....	82
4.2.2.3. Isoterma bisftalocianina de lutecio.....	83
4.2.2.4. Isoterma tirosinasa.....	85
4.2.2.5. Isoterma lacasa.....	86
4.2.2.6. Comparativa isotermas.....	87
4.3. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y	
CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LOS SENSORES.....	88
4.3.1. Introducción.....	88
4.3.2. Comparativa del comportamiento electroquímico	
de los biosensores nanoestructurados.....	89
4.3.2.1. Introducción.....	89
4.3.2.2. Electrodo de bisftalocianina de lutecio.	89
4.3.2.3. Electrodo de tirosinasa.....	91
4.3.2.4. Electrodo de lacasa.....	92
4.3.2.5. Comparativa entre electrodos.....	93
4.3.3. Respuesta de los biosensores nanoestructurados	
frente a antioxidantes.....	94
4.3.3.1. Introducción.....	94
4.3.3.2. Estudio de concentraciones.....	95
4.3.3.2.1. Introducción.....	95
4.3.3.2.2. Monofenoles.....	96
A) Ácido vanílico.....	96
4.3.3.2.3. Difenoles.....	102
B) Ácido cafeico.....	102
C) Catecol.....	110
D) Hidroquinona.....	119
4.3.3.2.4. Trifenoles.....	127
E) Pirogalol.....	127
F) Ácido gálico.....	134
4.3.3.2.5. Comparativa.....	141
4.3.3.3. Límites de detección.....	145

4.3.3.3.1. Introducción.....	145
4.3.3.3.2. Monofenoles.....	146
A) Ácido vanílico.....	146
4.3.3.3.3. Difenoles.....	155
B) Ácido cafeico.....	155
C) Catecol.....	159
D) Hidroquinona.....	163
4.3.3.3.4. Trifenoles.....	167
E) Pirogalol.....	167
F) Ácido gálico.....	171
4.3.3.4. Estudio de la cinética.....	172
4.3.3.4.1. Introducción.....	172
4.3.3.4.2. Monofenoles.....	173
A) Ácido vanílico.....	173
4.3.3.4.3. Difenoles.....	182
B) Ácido cafeico.....	182
C) Catecol.....	190
D) Hidroquinona.....	197
4.3.3.4.4. Trifenoles.....	205
E) Pirogalol.....	205
F) Ácido gálico.....	212
4.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	217
4.4.1. Introducción.....	217
4.4.2. Lutecio y tirosinasa.....	219
4.4.3. Lutecio y lacasa.....	221
4.4.4. Tirosinasa y lacasa.....	223
4.4.5. Lutecio, tirosinasa y lacasa.....	225
5. CONCLUSIONES FINALES.....	229
6. ESTUDIO ECONÓMICO.....	235
6.1. INTRODUCCIÓN.....	237
6.2. COSTES DIRECTOS.....	238
6.2.1. Costes de material.....	238
6.2.2. Costes de amortización.....	239
6.2.3. Costes de personal.....	241
6.3. COSTES INDIRECTOS.....	242
6.4. RESUMEN DE COSTES.....	242
7. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA.....	243

INTRODUCCIÓN

1

Capítulo

ÍNDICE

1.1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.2. JUSTIFICACIÓN	13
1.3. OBJETIVOS	13
1.4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
1.5. ESTRUCTURA DEL PROYECTO	14

1.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo en primer lugar se procederá a justificar la necesidad del proyecto, se resumirán de forma breve y concisa los objetivos globales, se describirá a grandes rasgos el proyecto, y finalmente se expondrá la estructura general del presente proyecto.

1.2. JUSTIFICACIÓN

El Departamento de Química Inorgánica y Física Química de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid (UVA), en el cual se ha realizado el presente proyecto, está llevando a cabo una serie de investigaciones orientadas a la creación de una red de sensores capaces de analizar y diferenciar muestras complejas. Estas redes de sensores constituyen lo que se conoce como lenguas electrónicas, que disponen un amplio número de campos de aplicación entre los cuales cabe destacar el análisis de vinos.

De acuerdo a estas necesidades en el presente proyecto se ha buscado diseñar biosensores electroquímicos que sean capaces de analizar los antioxidantes presentes en los vinos y de interés industrial.

1.3. OBJETIVOS

El diseño de los sensores para el análisis de antioxidantes presenta una serie de dificultades, ya que los antioxidantes se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas, con lo cual en primer lugar se necesitan sensores que sean muy sensibles.

Además, el objetivo global del proyecto consiste en poder diferenciar distintos antioxidantes entre sí, con lo cual necesitamos sensores capaces de proporcionar distintas respuestas al analizar diversos antioxidantes, de tal forma que al analizar una muestra desconocida se pueda determinar qué tipo de antioxidante está presente en dicha muestra.

También se necesita poder determinar en qué cantidad se encuentran los antioxidantes en la muestra. Es decir, los sensores deben de ser capaces de proporcionar distintas respuestas en relación a la concentración en la que se encuentran presentes los antioxidantes.

Finalmente, y no por ello menos importante, resulta necesario obtener sensores capaces de obtener medidas y resultados reproducibles.

En este proyecto, además de centrarnos en el análisis de antioxidantes, también se pretende obtener y analizar el comportamiento de enzimas como biosensores, comparando dicho comportamiento con el de electrodos electroquímicos que han sido estudiados previamente.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Como ya se ha comentado anteriormente, el presente proyecto persigue el objetivo de diseñar sensores capaces de detectar y diferenciar distintos tipos de antioxidantes.

Los sensores se obtendrán mediante la técnica de Langmuir-Blodgett (LB). Se parte de cristales de ITO rectangulares sobre los cuales se depositan, empleando dicha técnica, ftalocianinas y distintas enzimas (lacasa y tirosinasa), dando lugar a biosensores.

Estos biosensores son capaces de detectar y diferenciar distintos antioxidantes mediante medidas electroquímicas, concretamente se trabaja con una técnica conocida como voltametría cíclica.

En el presente proyecto se analiza un total de seis antioxidantes: ácido vanílico, ácido cafeico, catecol, hidroquinona, pirogalol y ácido gálico. Un monofenol, tres difenoles y dos trifenoles.

Para analizar estos antioxidantes se realizan sensores depositando únicamente bisftalocianina de lutecio en proporción 1 a 10 con ácido araquírico, sensores de bisftalocianina de lutecio 1 a 10 con araquírico y enzima tirosinasa, y finalmente sensores de bisftalocianina de lutecio 1 a 10 con araquírico y enzima lacasa.

A lo largo del proyecto se analizan las respuestas obtenidas para cada uno de estos sensores frente a cada uno de los antioxidantes.

1.5. ESTRUCTURA DEL PROYECTO

Tras el presente capítulo de introducción general al proyecto se procederá a explicar los fundamentos por los que se rige el presente proyecto, describiendo tanto las técnicas de obtención de sensores y de medida de los mismos, así como los materiales de trabajo, sus características y propiedades.

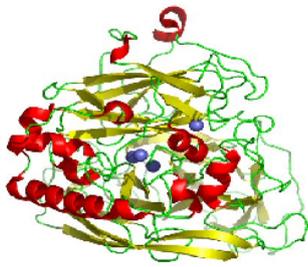
Posteriormente se procederá a explicar la metodología experimental que ha regido el presente proyecto y se describirá a su vez el equipo y el material usado a lo largo del mismo, explicando de forma detallada los distintos pasos seguidos para realizar el montaje y las medidas.

A continuación, en el capítulo de resultados se encuentra grueso del proyecto. En este capítulo se expondrán de forma detallada los resultados obtenidos para la deposición de capas de moléculas ordenadas mediante un estudio de las isothermas, los resultados del estudio a distintas concentraciones de antioxidantes, el cálculo de los límites de detección, el estudio cinético que nos permite determinar los mecanismos predominantes de las reacciones que tienen lugar y finalmente se realizará un análisis de componentes principales que nos ayude a determinar si se ha tenido éxito a la hora de diseñar una red de sensores.

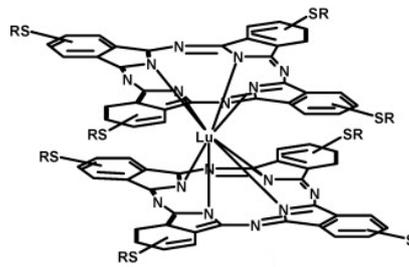
Una vez comentados y explicados los resultados obtenidos se procederá a realizar una visión de conjunto de los mismos, obteniendo una serie de conclusiones generales en relación a dichos resultados.

Finalmente, se realizará un estudio económico del proyecto que permita estimar los costes asociados al mismo.

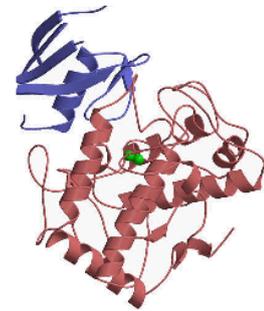
FUNDAMENTO TEÓRICO



LACASA



BISFTALOCIANINA DE LUTECIO



TIROSINASA

2

Capítulo

ÍNDICE

2.1. INTRODUCCIÓN	20
2.2. SENSORES	21
2.2.1. Introducción	21
2.2.2. Concepto de sensor	21
2.2.3. Sensores electroquímicos	23
2.2.3.1. Sensores conductimétricos	24
2.2.3.2. Sensores potenciométricos	24
2.2.3.3. Sensores amperométricos	24
2.3. VOLTAMPEROMETRÍA	25
2.3.1. Introducción	25
2.3.2. Clasificación	26
2.3.2.1. Voltametría de barrido lineal	26
2.3.2.2. Voltametría de barrido en escalón.....	28
2.3.2.3. Voltametría de salto potencial.....	28
2.3.2.4. Voltametría cíclica	29
2.4. MÉTODO DE LANGMUIR-BLODGETT.....	33
2.4.1. Introducción.....	33
2.4.2. Funcionamiento de la técnica.....	33
2.5. FTALOCIANINA	37
2.5.1. Introducción.....	37
2.5.2. Tipos de ftalocianinas.....	37
2.5.3. Propiedades	38
2.5.3.1. Propiedades eléctricas.....	38
2.5.3.2. Propiedades ópticas.....	39
2.5.3.3. Propiedades electroquímicas.....	39
2.6. ÁCIDO ARAQUÍDICO	40

2.7. ENZIMA.....	41
2.7.1. Introducción.....	41
2.7.2. Tirosinasa	43
2.7.3. Lacasa.....	45
2.8. ANTIOXIDANTE.....	47
2.8.1. Introducción.....	47
2.8.2. Monofenoles.....	49
2.8.2.1. Ácido vanílico	49
2.8.3. Difenoles.....	50
2.8.3.1. Ácido cafeico.....	50
2.8.3.2. Catecol.....	51
2.8.3.3. Hidroquinona.....	52
2.8.4. Trifenoles.....	53
2.8.4.1. Pirogalol.....	53
2.8.4.2. Ácido gálico.....	53
2.9. GLUTARALDEHÍDO.....	54

2.1. INTRODUCCIÓN

En este segundo capítulo se realizará una descripción somera y concisa de los fundamentos teóricos que rigen los elementos básicos que constituyen el proyecto.

Se comenzará dando una idea general de lo que es una lengua electrónica, objetivo global que persigue el grupo de investigación del Departamento de Química Física y Química Inorgánica. Posteriormente, se describirán los sensores, sus funciones y los tipos de sensores con los que nos podemos encontrar, que son los elementos que constituyen la lengua electrónica, poniendo un énfasis especial en los sensores electroquímicos.

A continuación enlazando con la parte de sensores, dado que se va a trabajar con sensores voltamétricos (pertenecen al grupo de sensores electroquímicos), se describe la voltamperometría, técnica electroquímica analítica empleada para realizar las experiencias en el presente proyecto. Concretamente se trabajará y se describirá con mayor detalle la voltametría cíclica, que consiste en medir la intensidad respuesta a barridos cíclicos de potencial.

Después de describir esta técnica se continúa explicando el funcionamiento de la técnica de Langmuir-Blodgett, técnica de deposición de capas moleculares ordenadas, que nos permite obtener los sensores modificados con los que se realizan las medidas experimentales. Esta técnica permite obtener sensores nanoestructurados con una relación alta relación/superficie volumen. Además, dado que pretendemos obtener biosensores enzimáticos, esta técnica resulta especialmente interesante ya que permite preparar bicapas lipídicas semejantes a membranas celulares, con lo cual el enzima se encuentra en un entorno biomimético.

Finalmente, se realiza una descripción de las sustancias involucradas en el grueso del proyecto. Se describirán las ftalocianinas que actúan como mediadores electrónicos para la transferencia de electrones, el ácido araquídico que actúa como molécula anfifílica y evita la rigidez de la estructura de la monocapa y los enzimas que son las sustancias clave de nuestros biosensores y que se depositan mediante la ya mencionada técnica de Langmuir-Blodgett.

Luego se describen los antioxidantes que son las sustancias que vamos a analizar a lo largo del proyecto, destinando unos párrafos a la descripción de cada uno de los seis antioxidantes que son objeto del análisis. Por último se destaca brevemente el glutaraldehído empleado como inmovilizador de los enzimas.

2.2. SENSORES

2.2.1. Introducción

El objetivo del proyecto es la obtención de una red de sensores que actúe como lengua electrónica en el análisis de muestras en disolución.

Una **lengua electrónica** es un sistema multisensor constituido por varios sensores no selectivos combinados con herramientas quimiométricas multivariantes [1, 2].

Se denominan lenguas electrónicas porque proporcionan información de muestras en fase líquida actuando de la misma forma que haría nuestra lengua, mientras que se conoce como nariz electrónica a los sistemas que se encargan de obtener información de muestras gaseosas de la misma forma que actúa nuestra nariz, captando y discriminando los distintos olores.

Para entender lo que representa una lengua electrónica en primer lugar conviene entender y definir de forma general qué es un sensor, qué tipos de sensores nos podemos encontrar y cuales son las bases de su funcionamiento.

2.2.2. Concepto de sensor

Un **sensor** es un dispositivo que es capaz de detectar variaciones en magnitudes físicas o químicas y transformarlas en señales eléctricas medibles y útiles desde el punto de vista analítico [3].

Según esto podemos encontrarnos con dos tipos de sensores:

- **Sensores físicos:** responden ante variaciones de magnitudes físicas tales como la temperatura, velocidad, presión, etc.
- **Sensores químicos:** responden selectivamente ante variaciones de un analito generando una respuesta química.

En el presente proyecto se trabaja con sensores químicos los cuales se dividen en dos partes fundamentales:

- Un **receptor (R)** o elemento de reconocimiento selectivo molecular o iónico que produce una señal primaria de tipo electroquímico, másico, etc.
- Y un **transductor (T)** que es un elemento instrumental que traduce la señal primaria producida en una señal procesable del dominio eléctrico.

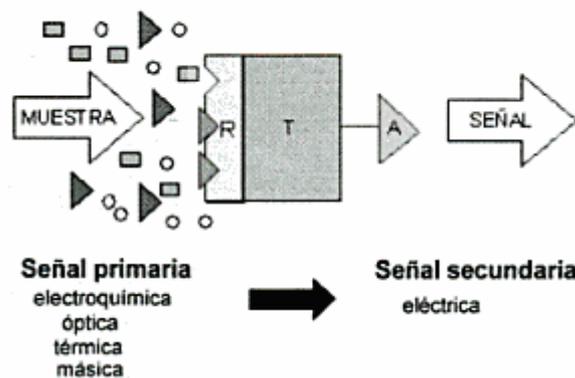


Fig. 2.1. Esquema de funcionamiento de un sensor.

Además existe un tercer elemento, externo al sensor en sí, los **componentes electrónicos asociados** o procesadores de señales, que no pertenecen al sensor como tal pero que resultan fundamentales para el empleo del mismo. Estos dispositivos se encargan de mostrar los resultados obtenidos en forma de señal eléctrica de forma accesible al usuario. Por ejemplo, a modo de datos mostrados por pantalla o en forma gráfica.

El funcionamiento básico consiste en que el **analito** es reconocido por el sistema receptor o sensible dando lugar a una señal primaria como consecuencia de esto. Dicha señal primaria es convertida al dominio eléctrico por el transductor, dando lugar a una señal secundaria, que posteriormente es amplificada, acondicionada y finalmente procesada en forma de dato en un entorno informático.

El **elemento sensible** es el responsable de la etapa de reconocimiento del analito, y es el que va a determinar las características de selectividad del dispositivo. Su acción sobre el analito, como consecuencia de una reacción química o de una interacción selectiva, debe de permitir la generación de una señal primaria. Algunos de los fenómenos químicos asociados pueden consistir en un cambio de color, en un cambio del potencial eléctrico en la superficie, etc.

El **transductor** es el encargado de traducir, es decir, de transformar la señal generada en la etapa de reconocimiento a otro dominio más fácilmente medible y cuantificable, conformando lo que se conoce como señal secundaria. La información transmitida por esta señal es de tipo cuantitativa ya que la magnitud de esta debe de poder ser relacionada posteriormente con la concentración o actividad de la especie reconocida en la etapa previa [4, 5, 6].

ELEMENTO SENSIBLE	TRANSDUCTOR
QUIMIOSENSORES	ELECTROQUÍMICOS
Reactivos selectivos	Membranas
Reactivos macromoleculares	Conductores: Pt, Cu, Au
Reactivos ionóforos	
BIOSENSORES	ÓPTICOS
Enzimas	Dispositivos fotoeléctricos
Tejidos	
Material genético	GRAVIMÉTRICOS
	Cuarzo piezoeléctrico
	TÉRMICOS
	MAGNÉTICOS
	OTROS
	Radiactivos

Tabla 2.1. Clasificación de los sensores.

De la combinación de los estos diferentes elementos sensibles y transductores se puede obtener una amplia gama de posibles para los sensores químicos.

En el presente proyecto se ha trabajado con sensores que emplean un transductor de tipo electroquímico, por ello a continuación se expondrán con mayor detalle las bases y el funcionamiento de los mismos.

2.2.3. Sensores electroquímicos

Un **sensor electroquímico** es un conductor eléctrico que se incorpora en el seno de un medio a estudiar y donde se establece una transferencia de cargas entre las sustancias presentes en la solución y el sensor, de forma que la variación de energía libre en la interfase queda recogida por el sensor y es transmitida mediante la cadena de medida bajo la forma de una señal eléctrica de corriente o tensión [7].

Los sensores electroquímicos presentan una serie de ventajas frente a otro tipo de sensores sensores. En primer lugar no precisan de equipo de medida muy sofisticados, sino que emplean potenciómetros o potenciostatos que son equipos muy comunes en los laboratorios. La señal transducida es una señal eléctrica y por lo tanto es fácilmente procesable por dispositivos electrónicos. Además los dispositivos empleados son fácilmente minaturizables, lo cual permite operar con volúmenes de muestra

pequeños. Presentan unos límites de detección bajos y tienen un tiempo de respuesta más amplio que otros sensores químicos que se fundamentan en otros principios [8].

En relación al principio de su principio de operación los sensores electroquímicos se pueden dividir en tres clases:

- Sensores potenciométricos
- Sensores conductimétricos
- Sensores amperométricos

2.2.3.1. Sensores potenciométricos

Los **sensores potenciométricos** se fundamentan en la determinación de los potenciales eléctricos que se establecen entre los electrodos de medida y los de referencia, siendo estos últimos electrodos constituidos por materiales que tienen un potencial constante y reproductivo independiente del medio en el cual se encuentra sumergido. El potencial establecido dependerá de la actividad iónica existente en el electrolito donde se encuentra sumergido el sensor.

2.2.3.2. Sensores conductimétricos

Los **sensores conductimétricos** se fundamentan en la imposición de una tensión o de una corriente alterna fija entre dos electrodos no atacables que se encuentran sumergidos en la célula o cámara de medida. Con la aplicación de una corriente alterna se logra minimizar o al menos limitar los efectos de polarización de electrodos, como resultado del contenido de la especie disuelta de forma que se modifica la resistencia eléctrica o la conductividad en los extremos de la célula de medida que se comporta como un elemento resistivo.

2.2.3.3. Sensores amperométricos

Los **sensores amperométricos** operan en condiciones de circulación eléctrica a través del circuito de medida, aplicando para ello un potencial externo entre los electrodos de medida y de referencia, de tal forma que la concentración problema de la especie a determinar, es proporcional y modula la intensidad de la corriente que circula entre los electrodos [9].

Dentro de los sensores amperométricos nos podemos encontrar con una rama particular de sensores que reciben el nombre de **sensores voltamétricos**.

Los **sensores voltamétricos** recaban información del analito a partir de los valores de intensidad de corriente obtenidos al aplicar un potencial variable con respecto del tiempo.

Estos sensores voltamétricos pueden ser empleados siguiendo distintos modos de medición: barrido lineal, cíclica, de onda cuadrada, de pulsos, etc. En función de estas señales de excitación podemos encontrar distintos tipos voltamétricas.

Los sensores voltamétricos son dispositivos que ofrecen ventajas importantes para el análisis multicomponente como son su alta selectividad y sensibilidad, alta relación señal-ruido, bajo límite de detección y además que con ellos se pueden utilizar varios modos de medición (onda cuadrada, cíclica, pulsos, etc.).

Una vez descritos los sensores voltamétricos, se procede a describir el conjunto de técnicas empleadas para medir con dichos sensores.

2.3. VOLTAMPEROMETRÍA

2.3.1. Introducción

La **voltamperometría o voltametría** engloba un amplio grupo de técnicas electroquímicas que proporcionan información sobre el analito a partir de la medida de la corriente en función del potencial aplicado. Estas técnicas se pueden emplear por lo tanto para el estudio de la composición de una solución, mediante las relaciones corriente-potencial obtenidas de una celda electroquímica, y con la respuesta corriente-tiempo a potencial controlado de un electrodo.

La señal de excitación aplicada sobre la celda electroquímica es por lo tanto un potencial variable. Esta señal de excitación origina una respuesta en forma de corriente.

La voltamperometría se encuentra entre las técnicas analíticas más sensibles disponibles, se emplea de forma rutinaria para determinar sustancias electroactivas a niveles de concentración por debajo incluso de partes por millón. Otra característica que convierte las voltamperometrías en técnicas de gran valor analítico es que son muy rápidas, ya que los tiempos de análisis son de apenas unos segundos.

Los resultados expresados a través de la intensidad de la corriente obtenida en función del potencial aplicado, representado como curvas corriente-potencial, nos proporcionan la información acerca de la reacción que tiene lugar en el electrodo. El

alejamiento del potencial de electrodo de su valor de equilibrio (reversible o nersntiano) hasta observar un paso de corriente se denomina polarización.

Un sistema voltamétrico está constituido por una celda que consta de **tres electrodos** sumergidos en la disolución que contiene el analito y además un exceso de un electrolito no reactivo que recibe el nombre de electrolito soporte.

El primer electrodo es el **electrodo de trabajo** que es el electrodo donde tiene lugar la reacción analítica y cuyo potencial se le puede mantener en un valor fijo controlado, o bien se le hace variar linealmente con el tiempo. Resulta interesante que este electrodo sea de dimensiones pequeñas para aumentar el efecto de la polarización.

El segundo electrodo es el **electrodo de referencia** que se emplea para medir el potencial del electrodo de trabajo y cuyo potencial permanece constante a lo largo del experimento.

El tercer y último electrodo es el **contraelectrodo o electrodo auxiliar** cuya función consiste únicamente en hacer pasar la corriente que procede de la fuente de señal al electrodo de trabajo a través de la disolución. La fuente de señal es una fuente de alimentación de corriente continua variable [10].

2.3.2. Clasificación de técnicas voltamétricas

Los distintos tipos de voltametría más comunes que nos podemos encontrar son los siguientes:

- Voltametría de barrido lineal
- Voltametría de barrido en escalón
- Voltametría de salto potencial
- Voltametría cíclica

2.3.2.1. Voltametría de barrido lineal

La **voltametría de barrido lineal** se constituye como el primer y más sencillo de los métodos voltamétricos, y consiste en el aumento o disminución del potencial del electrodo de trabajo de forma lineal.

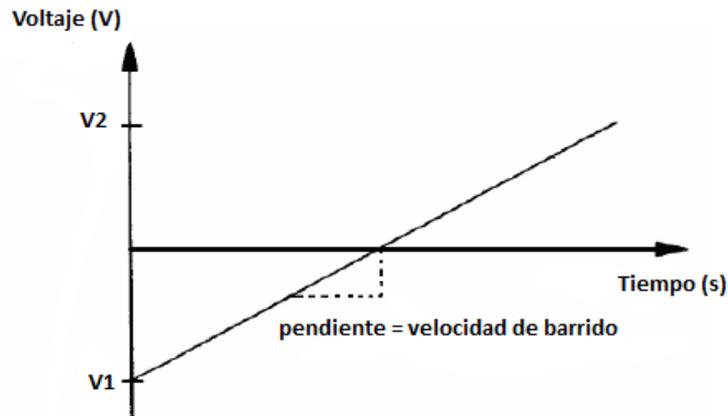


Fig. 2.2. Evolución del voltaje frente al tiempo en una voltametría de barrido lineal.

En el caso mostrado por la figura 2.2 el potencial aumenta con una velocidad de barrido constante, que viene dada por la pendiente de la recta, desde un potencial inicial V_1 hasta un potencial final V_2 .

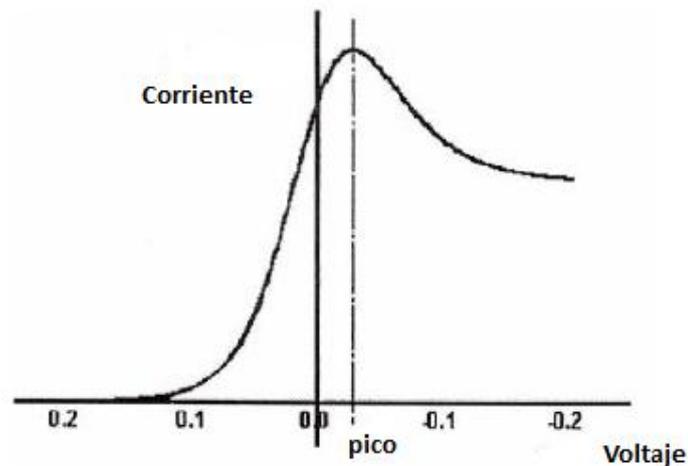


Fig. 2.3. Ejemplo de pico de intensidad de corriente obtenido en una voltametría de barrido lineal.

Tal y como se aprecia en la figura superior inicialmente la corriente es nula y a medida que el voltaje alcanza valores más reactivos la intensidad de la corriente comienza a subir hasta que alcanza un pico a un determinado valor del voltaje. Una vez sobrepasado dicho valor de voltaje para el cual se obtiene el pico de intensidad, la corriente comienza a disminuir.

El valor del pico de intensidad marca el potencial de reacción máximo, es decir, marca el valor para el cual la superficie del electrodo se ha oxidado o reducido en su totalidad y por lo tanto ya no existe más flujo de electrones.

2.3.2.2. Voltametría de barrido en escalón

En la **voltametría de barrido en escalón** o **voltametría diferencial de impulsos** el potencial base no permanece constante sino que sufre modificaciones en forma de impulsos. La amplitud de dichos impulsos se mantiene constante respecto del potencial base.

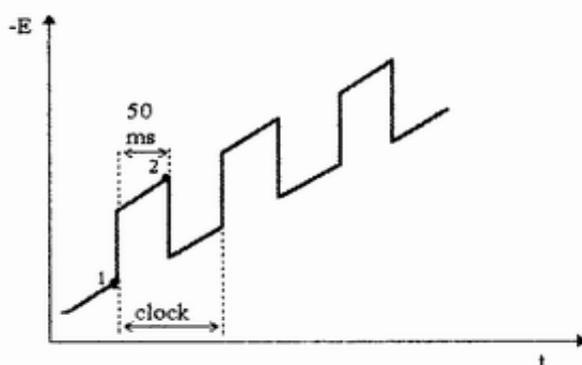


Fig. 2.4. Evolución del voltaje frente al tiempo en una voltametría diferencial de impulsos.

2.3.2.3. Voltametría de salto potencial

La **voltametría de salto potencial** consiste en la aplicación de un potencial el cual se mantiene constante a lo largo del tiempo.

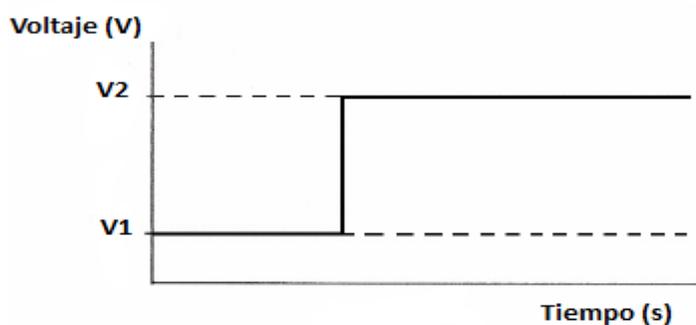


Fig. 2.5. Evolución del voltaje frente al tiempo en una voltametría de salto potencial.

2.3.2.4. Voltametría cíclica

La **voltametría cíclica** consiste en variar de forma cíclica el potencial de un electrodo estacionario inmerso en una solución en reposo, midiendo la corriente resultante. Es decir, se realiza un barrido de potencial entre dos potenciales a una velocidad de barrido constante, el cual una vez finalizado se invierte retornando al potencial inicial [11].

La señal de excitación es un barrido de potencial lineal que da lugar a una onda de forma triangular.

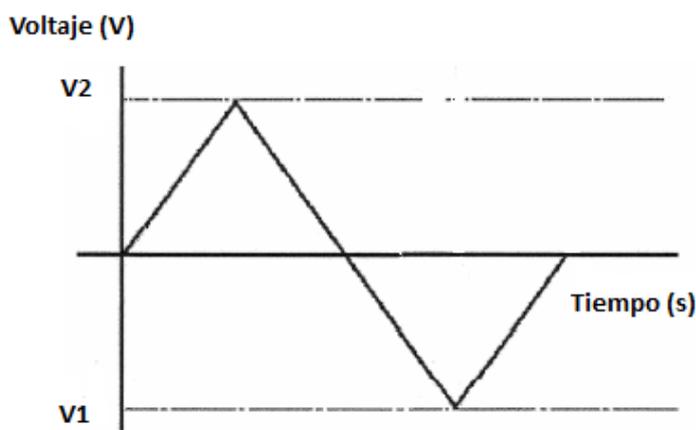


Fig. 2.6. Evolución del voltaje frente a tiempo en una voltametría cíclica.

Tal y como se aprecia en la figura 2.6 se inicia desde un potencial de partida y se realiza un barrido creciente de potencial, con una velocidad de barrido constante, hasta un potencial V_2 , que se conoce como potencial de corte anódico. Una vez llegado a ese potencial se invierte el barrido de tal forma que se hace un barrido decreciente de potencial desde el potencial V_2 hasta el potencial V_1 , denominado potencial de corte catódico. Finalmente se vuelve a hacer un barrido creciente hasta alcanzar el potencial de partida.

Las velocidades de barrido simétricas triangulares pueden variar desde unos cuantos milivolts por segundo hasta cientos de volts por segundo. En el presente proyecto las velocidades de barrido con las que se trabaja se encuentran entre los 25 mV/s y los 200 mV/s.

En la voltametría cíclica se pueden encadenar varios ciclos como los mencionados anteriormente.

Se dice que un proceso redox es **reversible** si un sistema redox se mantiene en equilibrio al ser sometido a un barrido de potencial, es decir, los valores de la concentración en las superficies tanto de oxidación como de reducción cumplen la **ecuación de Nernst**.

La reversibilidad de un proceso se debe a que la transferencia de electrones es más rápida que el resto de procesos que tienen lugar, como por ejemplo la difusión, la separación de los potenciales de pico deben de cumplir con la siguiente relación [12]:

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

Donde:

E_{pa} = potencial de pico anódico.

E_{pc} = potencial de pico catódico.

Según esta expresión se obtiene que a 25°C la separación entre los picos ha de ser de aproximadamente 60 mV por cada electrón intercambiado. Cuanto mayor sea esta separación entre los picos catódico y anódico, más irreversible será el proceso. En todo caso, sea esta mayor o menor, existirá siempre una histéresis asociada al sobrepotencial de polarización que surge de una combinación de tasas de difusión de analito y la barrera de activación intrínseca de la transferencia de electrones desde un electrodo al analito y cuya descripción viene dada por la expresión anterior.

Además de cumplir la relación anterior, en un proceso reversible las corrientes de los picos anódico y catódico tienen la misma magnitud. Mientras que en una reacción irreversible los picos están desplazados, más separados entre sí teniendo las corrientes de los picos distintas magnitudes. De tal forma que en el límite de irreversibilidad el pico asociado al proceso del barrido inverso no se observa.

El potencial formal de reducción para un proceso reversible viene dado por la relación:

$$E^o = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2}$$

Las desviaciones del comportamiento reversible se pueden deber a varias causas:

- Caídas óhmicas y efectos capacitivos en la celda electroquímica.
- Cinética "lenta" en la transferencia electrónica a través de la interfase electrodo/electrolito.
- Presencia de reacciones químicas acopladas que preceden o siguen al proceso de transferencia electrónica.

- Efectos de adsorción en la superficie del electrodo, debidos a la deposición de impurezas y otro tipo de sustancias que pueden interferir.

La corriente de pico, I_p , se describe mediante la **ecuación de Randles-Sevcik**:

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2}$$

Donde “n” es el número de moles de electrones transferidos en la reacción, “A” es el área del electrodo, “C” es la concentración de analito (en moles/cm³), “D” es el coeficiente de difusión, y “v” es la velocidad de barrido del potencial aplicado [13].

A medida que se incrementa el voltaje, el compuesto que está reducido empieza a recibir electrones, provocando que la especie que reacciona se consuma en la superficie del electrodo oxidándose, como si de un barrido lineal se tratase, hasta llegar al valor en el que la dirección del barrido cambia, haciendo que la superficie oxidada vuelva a ser reducida, hasta llegar al punto inicial.

En este proceso se obtiene una **gráfica de intensidad de corriente frente al potencial aplicado** que presenta una forma similar a la que aparece en la siguiente figura.

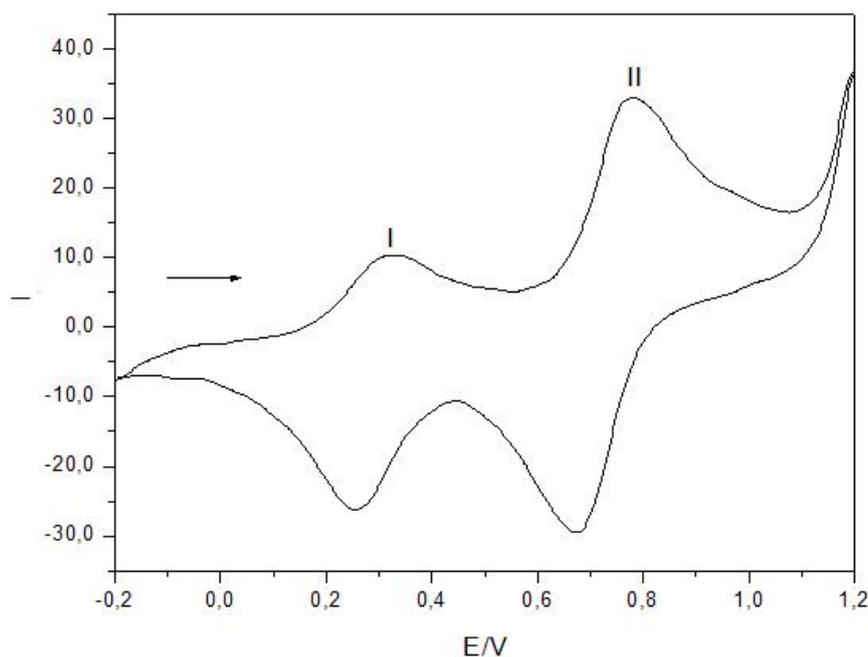


Fig. 2.7. Ejemplo de voltamperograma cíclico.

Los parámetros de importancia que se pueden observar en un voltamperograma cíclico son: las magnitudes de la corriente anódica en los picos anódicos (picos I y II) y de la corriente catódica en los picos catódicos (picos cuasi-simétricos a los picos I y II), los potenciales de los picos catódicos, los potenciales de los picos anódicos y los

potenciales de semipico que son los potenciales para los cuales la corriente es la mitad de la corriente del pico correspondiente.

En la figura 2.7 se puede observar como en el barrido de potencial creciente se obtienen picos de intensidad anódicos que corresponden a los procesos de oxidación. Una vez que se alcanza el potencial final V_2 (1,2 en el gráfico) se realiza un barrido inverso hasta V_1 (-0,2 en el gráfico) en el cual se obtienen los picos de intensidad catódicos correspondientes a los procesos de reducción.

La especie que reacciona parte de un estado reducido y el potencial de partida es menor que el potencial de oxidación con lo cual al principio no hay corriente anódica asociada a la conversión del estado reducido al oxidado. A medida que se incrementa el potencial la intensidad de dicha corriente anódica sube hasta alcanzar un pico anódico, un máximo. Este máximo se produce una vez que se ha oxidado la totalidad de la especie reactante sobre la superficie del electrodo. Una vez superado dicho potencial la corriente disminuye, ya que se ha consumido toda la especie que reacciona.

En función de las sustancias presentes en la celda electroquímica pueden tener lugar uno o varios procesos de redox que dan lugar a uno o varios picos.

En el barrido inverso la especie o especies que se encuentran oxidadas son reducidas obteniendo picos catódicos, de reducción, simétricos a los obtenidos en el barrido de potenciales creciente, pero con un desplazamiento de potenciales respecto a los picos anódicos.

La intensidad de la corriente de los picos es proporcional a la cantidad de especie electroactiva presente en la disolución de la celda electroquímica. Por lo tanto, la voltametría es una técnica que puede ser usada para realizar análisis cuantitativos y cualitativos. Ya que en función de la situación de los picos podremos distinguir entre distintas especies electroactivas y en función de la magnitud de dichos picos podremos determinar si hay una mayor o menor cantidad de dicha especie.

Una vez descritos los sensores y las técnicas voltamétricas de análisis que se realizan con dichos sensores, se procederá a describir el método de obtención de dichos sensores.

2.4. MÉTODO DE LANGMUIR-BLODGETT

2.4.1. Introducción

La **técnica de deposición Langmuir-Blodgett** permite obtener películas delgadas homogéneas, de un determinado orden y espesor a nivel molecular, lo cual implica que se obtienen películas en las cuales se puede controlar su estructura a una escala de nanómetros [14, 15].

La técnica consiste en la deposición de monocapas ordenadas de un material orgánico formadas en la superficie de una subfase líquida sobre un soporte sólido, dando lugar a una multicapa de moléculas perfectamente ordenadas.

Tal y como se irá descubriendo a medida que se comente de forma más detallada el funcionamiento de esta técnica, esta técnica resulta ideal para la realización del presente proyecto. Se logra en primer lugar, obtener sensores nanoestructurados, formados por moléculas perfectamente dispuestas y ordenadas en capas, logrando una relación superficie/volumen muy alta. Pero además, el hecho de trabajar con enzimas con el objetivo de obtener biosensores presenta una serie de problemas que se logran resolver empleando esta técnica. Los enzimas necesitan de una serie de condiciones para poder vivir, de lo contrario, mueren o se agotan y se vuelven inservibles. Por ello, se trabaja a pH neutro y se crea un entorno que simule el entorno de trabajo habitual de los enzimas. La técnica de Langmuir-Blodgett permite obtener bicapas lipídicas que se mimetizan las membranas celulares en las cuales puede introducirse un enzima, de tal forma que el enzima se encuentra en un entorno biomimético en el que su función se ve mejorada notablemente. Además la deposición de ftalocianinas como mediadores electrónicos, mejora la transferencia electrónica desde y hacia el enzima.

2.4.2. Funcionamiento de la técnica

Para ello se dispone de una fase acuosa dispuesta en una **balanza** (cubeta rectangular construida en un material hidrofóbico) en cuya superficie se deposita una disolución de una sustancia orgánica **anfifílica** en un disolvente orgánico volátil. Las moléculas de la sustancia anfifílica presentan grupos polares que se encuentran inmersos en la superficie de la fase acuosa y tienen colas hidrofóbicas que estarán fuera de dicha superficie dispuestas de forma aleatoria.

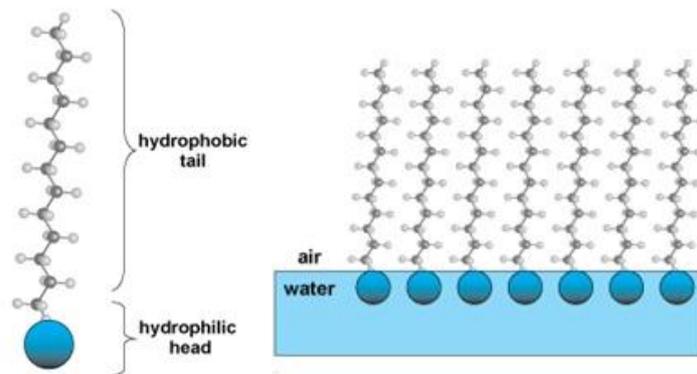


Figura 2.8. Representación esquemática de una molécula anfifílica y su monocapa ordenada en la interfase aire-agua.

El disolvente se evapora y la sustancia orgánica se dispersa por toda la superficie de la fase acuosa, dando lugar a lo que se conoce como **“gas bidimensional”** debido a que las interacciones entre las moléculas son muy pequeñas y se puede considerar que cada molécula está aislada con respecto al resto.

La balanza dispone en sus extremos de unas barreras que al cerrarse sobre la superficie de la fase acuosa comprimen las moléculas que se encuentran dispersas, de tal forma que se van ordenando dando lugar a lo que se conoce como **monocapa de Langmuir**. Al reducirse el área de la superficie disponible por la monocapa, las moléculas se aproximan unas a otras de tal forma que empiezan a aparecer interacciones entre ellas. Estas interacciones intermoleculares laterales de tipo Van der Waals permiten que las moléculas se ordenen en la interfase aire-agua dando lugar a la monocapa de Langmuir. Cuando aparecen interacciones entre las colas hidrofóbicas, se produce un cambio en la pendiente de la isoterma, y se dice que se forma un **“líquido bidimensional”**.

Si las barreras continúan cerrándose, la presión superficial sigue aumentando llegando un momento en el cual se produce un nuevo cambio de pendiente de la recta de la isoterma (figura 2.9) dando lugar a un estado conocido como **“sólido bidimensional”**.

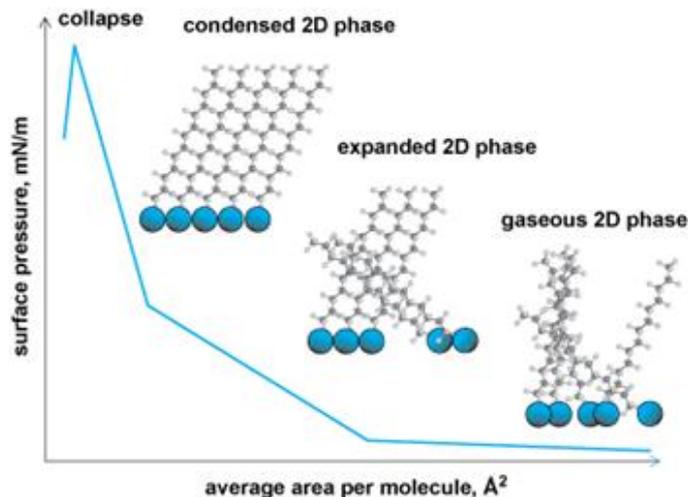


Fig. 2.9. Gráfico de una isoterma que representa la evolución de la presión superficial con respecto al área media ocupada por cada molécula.

Si se continúa cerrando las barreras de la balanza se llega a un momento en el cual la compresibilidad se hace infinita, dicho fenómeno se conoce como **colapso molecular**. En esta fase de colapso las capas de moléculas se solapan, montándose unas encima de otras y dando lugar a capas desordenadas.

Cuando se ha formado la monocapa y se mantiene la presión dentro del rango de valores para los cuales la monocapa se encuentra en estado de sólido bidimensional, en la superficie de la fase acuosa se introduce perpendicularmente un **sustrato sólido**, de tal forma que se produce una transferencia de moléculas ordenadas desde la superficie de la fase acuosa a al sustrato sólido, manteniendo el orden. Realizando sucesivas inmersiones del sustrato sólido se obtienen multicapas ordenadas del espesor deseado. En el presente proyecto se emplea como sustrato sólido cristal de ITO.

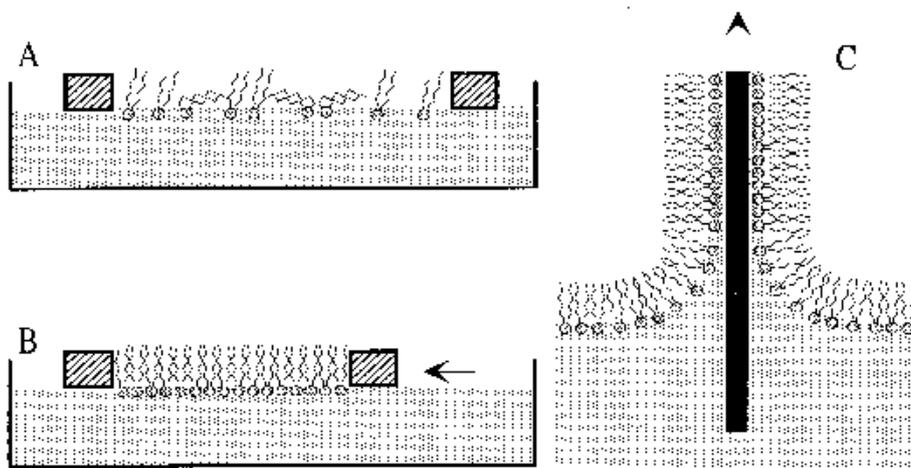


Fig. 2.10. Esquema general de la preparación de monocapas de Langmuir-Blodgett (a) Dispersión de las moléculas y evaporación del disolvente (b) Compresión de las barreras (c) Transferencia sobre un sustrato sólido.

Hay que tener en cuenta que dependiendo del carácter hidrofílico o hidrofóbico del material que constituye el sustrato la transferencia tiene lugar de una u otra forma. Si la superficie del soporte es hidrofílica, la fase acuosa moja la superficie sólida y se forma un menisco hacia arriba. Al sumergirse el soporte no se produce deposición, pero cuando sube, el menisco se va secando, dejando detrás una monocapa en la cual los grupos hidrofílicos están colocados de cara a la superficie hidrofílica. Al volver a sumergirse, el soporte será ahora hidrofóbico, con lo cual el menisco aparece hacia abajo y la segunda monocapa se depositará con las cadenas hidrofóbicas en contacto con las cadenas hidrofóbicas que se habían depositado en el sustrato, de tal forma que la cabeza hidrofílica queda hacia fuera [16, 17].

El ácido araquídico realiza esta función de molécula anfifílica y por ello se emplea en proporción 10 a 1 (10 partes de araquídico por cada una de ftalocianina) con la bisftalocianina de lutecio, la cual se emplea como mediador electrónico debido a sus excelentes propiedades electroquímicas.

Se depositan en primer lugar, varias capas de esta combinación de ácido araquídico y de bisftalocianina de lutecio y sobre ellas se deposita una nueva serie de capas del enzima en combinación también de ácido araquídico y bisftalocianina de lutecio. Con esto lo que se logra es que el enzima esté en un entorno biomimético, lo cual hace que sus funciones y su durabilidad sean mucho mejores que si se realizase una deposición directa sobre el sustrato sólido de cristal de ITO.

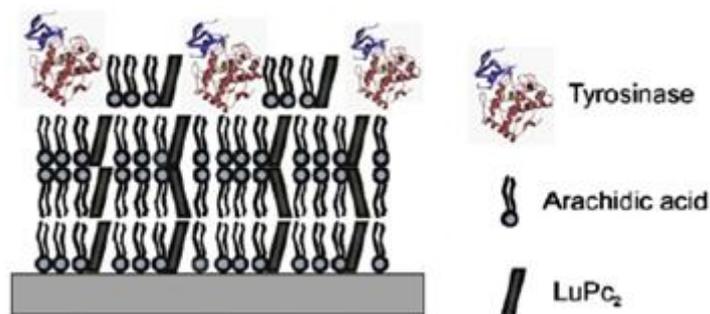


Fig. 2.11. Esquema de la deposición de las capas del enzima sobre las capas que constituyen el entorno biomimético.

2.5. FTALOCIANINA

2.5.1. Introducción

El compuesto conocido como **ftalocianina (Pc)** es un macrociclo simétrico formado por cuatro grupos isoindol, los cuales se encuentran unidos mediante la sustitución por nitrógeno de los hidrógenos en el anillo de pirrol. La figura 2.11. ilustra la estructura de una ftalocianina, donde además se puede apreciar la cavidad central donde se puede coordinarse un ión metálico. Las ftalocianinas tienen un sistema electrónico bidimensional de carácter aromático con 18 electrones π , sobre el cual pueden llevarse a cabo múltiples modificaciones, tanto en el propio macrociclo, introduciendo como ya se ha comentado átomos metálicos o incluso no metálicos así como en la periferia sustituyendo grupos funcionales [18].

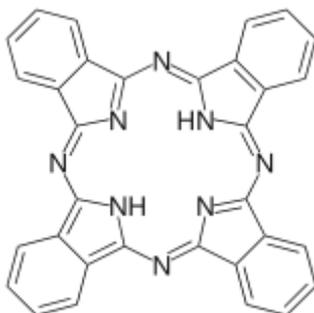


Fig. 2.12. Estructura química de una molécula de ftalocianina.

Las ftalocianinas presentan una serie de propiedades electroquímicas que las convierten en excelentes mediadores o catalizadores electrónicos, facilitando el proceso de transferencia electrónica entre el enzima y el electrodo, pudiendo mejorar de esta forma, la sensibilidad del sensor electroquímico. Además, son compuestos biocompatibles con los enzimas, lo cual, convierte a las ftalocianinas en un material clave para la realización el presente proyecto. A continuación se describirán los distintos tipos de ftalocianinas y sus particularidades y se comentarán sus interesantísimas propiedades.

2.5.2. Tipos de ftalocianinas

El término ftalocianina hace referencia a una gran familia de compuestos. La ftalocianina más simple es la ftalocianina libre de metal (H_2Pc). Las monoftalocianinas o **metalofthalocianinas (MPc)** consisten en un anillo de ftalocianina coordinado con un metal que se encuentra situado en el centro de la cavidad. En la figura 2.12 se puede ver como ejemplo una ftalocianina de cobre.

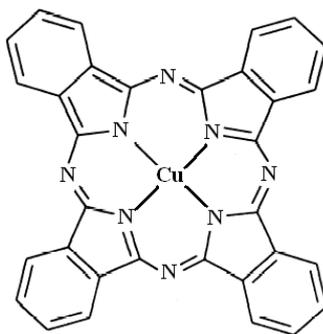


Fig. 2.13. Estructura química de una molécula de metaloftalocianina.

También se pueden constituir ftalocianinas que formen complejos con forma de sándwich con tierras raras, conocidas como bisftalocianinas [19, 20, 21]. En estos complejos de doble capa un ión de un lantánido se coordina con dos anillos de ftalocianina (LnPc_2). Estos complejos son radicales neutrales en los cuales el estado de oxidación del ión (+3) y la neutralidad electrónica global implica que al menos uno de los anillos de ftalocianina no se encuentra en su estado de oxidación habitual (Pc^{-2}). El radical se encuentra esencialmente como Pc^- en uno de los anillos.

En el presente proyecto se trabaja con estas ftalocianinas de tipo sándwich en las cuales el ion metal coordinado es un lantánido, concretamente el lutecio (LuPc_2).

De forma similar se pueden constituir complejos de triple capa que consisten en la asociación de dos iones de lantánidos con tres anillos de ftalocianina [22].

Las ftalocianinas de doble o de triple capa presentan fuertes interacciones de tipo π - π que dan lugar a una serie de propiedades ópticas y electrónicas muy características.

2.5.3. Propiedades de las ftalocianinas

Las ftalocianinas de metales o metaloftalocianinas presentan una serie de propiedades eléctricas, ópticas y electroquímicas que las convierten en materiales muy valiosos para su empleo en la obtención de sensores.

2.5.3.1. Propiedades eléctricas

Las metaloftalocianinas (MPc) son semiconductores de tipo p, que cuando son dopados con oxígeno tienen conductividades de entre 10^{-10} y 10^{-12} S/cm a una temperatura de 300K [23]. Las ftalocianinas de lantánidos (LnPc_2) representan un caso especialmente interesante desde el punto de vista eléctrico, ya que poseen conductividades intrínsecas muy altas del orden de 10^{-6} y 10^{-3} S/cm a una temperatura

de 300K [24]. Este comportamiento es debido a su estado radical neutro y a la fuerte interacción electrónica entre los dos anillos de ftalocianina fuertemente unidos.

2.5.3.2. Propiedades ópticas

Las ftalocianinas presentan colores intensos de tonalidades verde o azul. El sistema π conjugado da lugar a bandas de absorción intensa en la región situada entre 400 y 700 nm con coeficientes de extinción en el rango de $2 \times 10^5 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ en disolución. Algunos derivados también presentan bandas en la región del infrarrojo cercano, coincidiendo con las longitudes de onda empleadas en telecomunicaciones. La interacción entre los compuestos aceptores y dadores de electrones conduce a grandes cambios, y además reversibles, en el espectro de absorción electrónico.

2.5.3.3. Propiedades electroquímicas

Las ftalocianinas son complejos capaces de añadir o restar electrones manteniendo la estructura molecular y la estabilidad. Por ejemplo, en las ftalocianinas es muy común que presenten un comportamiento redox reversible.

Los procesos redox que se observan en los complejos de ftalocianinas metálicas pueden deberse al anillo de ftalocianina o al átomo metálico central. El anillo de ftalocianina en estado neutral tiene dos cargas negativas (Pc^{-2}), de tal forma que puede ser oxidado por uno o dos electrones formando $\text{Pc}(-1)$ o $\text{Pc}(0)$. Además puede ser reducido por entre uno y cuatro electrones para dar lugar a $\text{Pc}(-3)$, $\text{Pc}(-4)$, $\text{Pc}(-5)$ y $\text{Pc}(-6)$. Los procesos redox que involucran al átomo metálico central pueden ser observados cuando el metal sufre oxidación o reducción a potenciales comparables a los de los anillos de ftalocianina.

Los potenciales electroquímicos de las moléculas de ftalocianina están relacionados con el átomo metálico central y con la presencia de sustituyentes en el anillo de la ftalocianina, también depende del tipo de ftalocianina frente al que nos encontramos.

De acuerdo a lo que nos indican los potenciales redox se puede concluir que la oxidación de las bisftalocianinas de lantánidos es más sencilla que la de las ftalocianinas de metales. Además las bisftalocianinas de lantánidos presentan un rico comportamiento electroquímico y redox debido a la accesibilidad de un rango de estados de oxidación centrados en el ligando. Los cambios en el estado de oxidación también suelen estar acompañados por cambios en el espectro de absorción electrónico, de hecho las bisftalocianinas de lantánidos son buenos materiales electrocrómicos.

Las bisftalocianinas de lutecio empleadas en el presente proyecto presentan procesos de oxidación y reducción monoelectrónicos y totalmente reversibles, separados por 0,38V [25, 26].

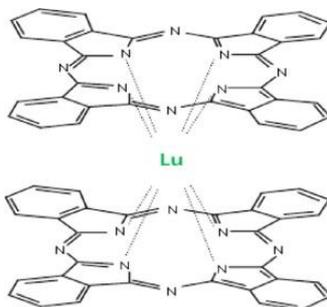


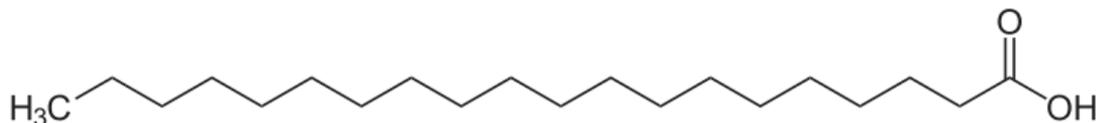
Fig 2.14. Esquema de la estructura química de la bisftalocianina de lutecio.

Este comportamiento electroquímico convierte a las bisftalocianinas de lutecio en materiales ideales para la construcción de sensores electroquímicos destinados al análisis de muestras líquidas, objetivo del presente proyecto.

Además de estas propiedades las ftalocianinas son materiales muy estables desde los puntos de vista térmico y químico, además se pueden depositar formando películas delgadas mediante diversas técnicas. Entre estas técnicas se encuentra la empleada en el presente proyecto, la técnica de Langmuir-Blodgett.

2.6. ÁCIDO ARAQUÍDICO

El **ácido araquídico** ($C_{20}H_{40}O_2$) también conocido como ácido icosanoico o eicosanoico es un ácido graso saturado constituido por una cadena de 20 átomos de carbono. Este ácido se puede encontrar de forma natural como un constituyente minoritario del aceite de maíz y de cacahuete.



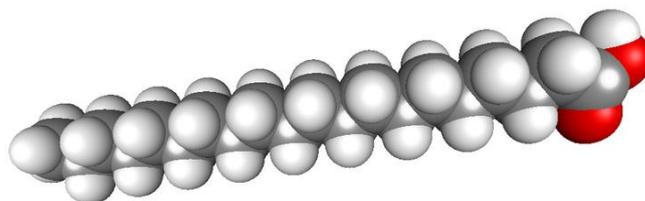


Fig. 2.15. Estructura química (arriba) y estructura 3D (abajo) del ácido araquídico.

La ftalocianina se combina en una dilución 1:10 con ácido araquídico de tal forma que se logra reducir la rigidez de las monocapas de Langmuir [27, 28]. Además presenta una estructura que lo convierte en una sustancia anfifílica, ya que presenta una “cabeza” polar y por lo tanto hidrofílica y una cola apolar y por lo tanto hidrofóbica. De tal forma, que se constituye como el material clave que rige la deposición sobre el sustrato, estando la ftalocianina acoplada a la estructura de la monocapa y depositándose en el soporte junto con las moléculas de araquídico.

2.7. ENZIMA

2.7.1. Introducción

Un **enzima** es una molécula proteica que combinada con uno o más compuestos da lugar a reacciones específicas que transcurren con una velocidad mucho mayor de la que lo harían en ausencia de dicha enzima [29, 30].

Las enzimas, al igual que el resto de proteínas, presentan una estructura primaria y se pliegan en una conformación particular de manera que sus grupos reactivos están dispuestos del modo apropiado para dar al conjunto actividad biológica.

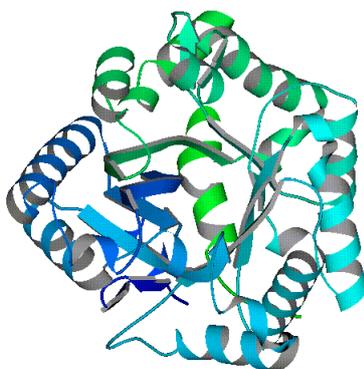
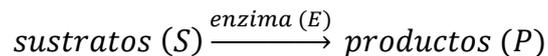


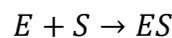
Fig. 2.16. Esquema de la estructura de un enzima.

Básicamente actúan como catalizadores de las reacciones químicas, y como tales actúan bajando la energía de activación de la reacción dando lugar a un considerable incremento de la velocidad de reacción. Esto permite que se alcance el equilibrio de la reacción mucho antes, sin que dicho equilibrio se altere, ya que las enzimas no se consumen en las reacciones que catalizan.

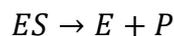
Los compuestos cuyas reacciones se catalizan por enzimas reciben el nombre de sustratos del enzima.



La catálisis enzimática comienza con la formación de enlaces entre el sustrato y el enzima.



A continuación el complejo enzima-sustrato sufre una transformación de la cual se obtiene como resultado un producto (P) y la enzima (E) que se recupera, de tal forma que no se consume en el proceso.



Para una determinada concentración de enzima, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de **Michaelis-Menten**:

$$v = \frac{[E_0]V_{max}}{k_M + [S]}$$

Donde V_{max} es la máxima velocidad de reacción y k_M es la constante de Michaelis, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima.

Debido a que los grupos reactivos de la enzima en los cuales se forman los enlaces están fijados en el espacio, resulta que el enzima debe estar construido para reaccionar con sustratos particulares, de tal forma que su especificidad geométrica determina la especificidad de sustrato [31]. Y según su forma podrán encajar unos u otros compuestos. Esto obedece al modelo de llave y cerradura propuesto por el premio Nobel Emil Fischer en 1894 según el cual la enzima y el sustrato poseen formas geométricas específicas y complementarias entre sí que permiten que encajen entre sí perfectamente [32]. Este modelo que explicaba a la perfección la especificidad enzimática fue adaptado por Daniel Koshland en 1958 para poder explicar la estabilización del estado de transición que alcanzan las enzimas. Esta modificación se fundamenta en que las enzimas presentan estructuras bastante flexibles, de tal forma que el sitio activo es continuamente reformado por la interacción con el sustrato al

interactuar este con el enzima [33]. Como resultado, el sustrato no se une simplemente a un sitio activo rígido, sino que las cadenas laterales de aminoácidos que forman el sitio activo son moldeadas en las posiciones precisas permitiendo a la enzima desarrollar su actividad catalítica. El sitio activo continúa cambiando hasta que el sustrato está completamente unido, siendo en este punto es donde la forma final y la carga se determinan [34]. En algunos casos, como por ejemplo las glucosidasas, es la molécula del sustrato la que cambia ligeramente de forma a medida que entra en el sitio activo [35].

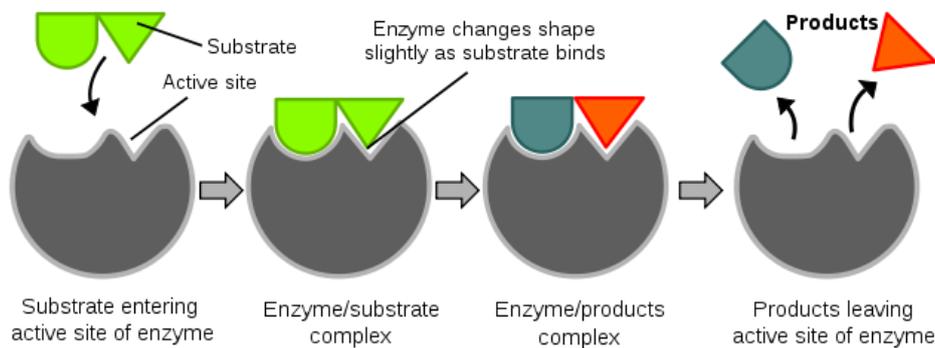


Fig. 2.17. Esquema del proceso catalítico de una enzima.

Según esto, se puede afirmar que la diferencia fundamental entre una enzima y un catalizador común es su alta especificidad [31]. Las enzimas son muy específicas en cuanto a las reacciones que catalizan y los sustratos implicados en dichas reacciones, donde la forma, carga, carácter hidrófilo o hidrófobo de las enzimas y de los sustratos los responsables principales de esta selectividad.

También conviene reseñar que la actividad enzimática depende de las condiciones del medio; pH, fuerza iónica, temperatura...

En el presente proyecto se ha trabajado con dos enzimas para desarrollar los biosensores; la tirosinasa y la lacasa, de las cuales vamos a hablar brevemente a continuación.

2.7.2. Tirosinasa

2.7.2.1. Introducción

La **tirosinasa** o monofenol monooxigenasa es una oxidasa que actúa como enzima que controla la producción de melanina en el organismo [36]. Una oxidasa es una enzima que cataliza reacciones de oxidación-reducción que involucran al oxígeno molecular

como aceptor electrónico. En dichas reacciones el oxígeno es reducido a agua (H_2O) o a peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

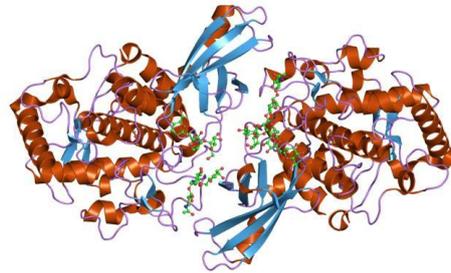


Fig. 2.18. Esquema de la estructura de la tirosinasa.

2.7.2.2. Estructura

Las tirosinasas se han extraído y aislado de diversas fuentes. Pueden ser extraídas de diversos tipos de plantas, animales y hongos y en función del tipo de especie las tirosinasas presentan una serie de propiedades estructurales, distribución y tejido celular que difieren entre unas y otras [37]. Fundamentalmente, estas diferencias se establecen en relación a la estructura primaria, el tamaño, las características de activación y en cuanto al patrón de glicosilación.

Los átomos de cobre que se encuentran en el interior del sitio activo de la tirosinasa interactúan con el oxígeno para dar lugar a un producto intermedio altamente reactivo que oxida el sustrato. La reacción se describirá en el apartado de catálisis.

2.7.2.3. Catálisis

La tirosinasa cataliza la oxidación de fenoles tales como la tirosina, la dopamina o el catecol empleando oxígeno molecular. En presencia de catecol, se forma benzoquinona, en una reacción según la cual dos átomos de hidrógeno son tomados del catecol y se combinan con el oxígeno para dar lugar a agua.

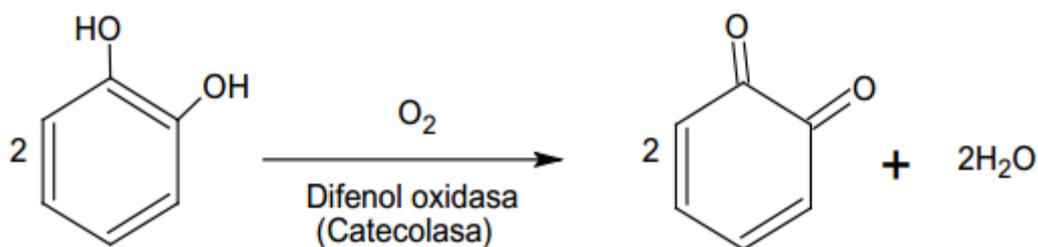


Fig. 2.19. Reacción de oxidación de un difenol (catecol).

Esta característica es de especial interés para el trabajo realizado en el presente proyecto, ya que los antioxidantes son esencialmente fenoles. De hecho, el catecol, al que hace referencia la reacción anterior, es uno de los antioxidantes empleados en el proyecto. Por lo tanto la tirosinasa actuará como catalizador de los procesos redox que tienen lugar en la celda electroquímica.

2.7.3. Lacasa

2.7.3.1. Introducción

La **lacasa** es una enzima oxidasa, cataliza reacciones redox que involucran al oxígeno molecular, que contiene varios átomos de cobre en su estructura. La lacasa está presente en multitud de plantas, hongos [38], bacterias e incluso en algunos insectos. Donde más extendida está su presencia es entre las plantas, en las cuales se encarga de sintetizar la lignina, que se constituye como el componente estructural de la pared celular de las plantas [39]. De hecho, la lacasa fue descubierta en una planta japonesa llamada *Rhus Vernicifera* [40], hace más de un siglo. Sin embargo, la mayor parte de las lacasas se han obtenido por extracción de hongos.

Grosso modo se puede afirmar que la molécula de lacasa presenta tres subunidades diferentes (que aparecen en diferentes colores en la imagen 2.19). La enzima contiene cuatro átomos de cobre los cuales están unidos a las interfaces entre las subunidades (dominios) [41].

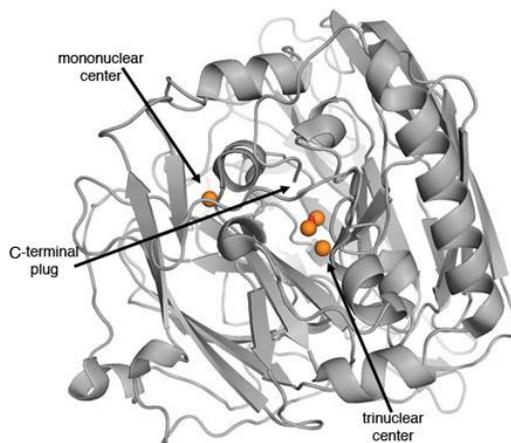


Fig.2.20. Estructura 3D de la lacasa.

La lacasa es capaz de oxidar fenoles, polifenoles, anilinas e incluso algunos compuestos inorgánicos a través de un mecanismo de transferencia de un electrón [42, 43, 44, 45].

2.7.3.2. Estructura

La molécula de lacasa, en su forma de holoenzima activa, es una glicoproteína dimérica o tetramérica, que contiene por monómero cuatro átomos de cobre unidos a tres sitios redox (tipo 1, tipo 2 y tipo 3). Para que la lacasa presente actividad catalítica tiene que haber un mínimo de cuatro átomos de cobre por cada unidad proteica activa. El cobre de tipo 1 en su estado de reposo está oxidado y es el responsable del color azul de la proteína. Los átomos de cobre de tipo 3 consisten en un par de átomos de cobre que presentan una conformación binuclear. Las posiciones de los cobres de tipo 2 y de tipo 3 es próximas en el espacio y forman centro trinuclear que participa del mecanismo catalítico de la enzima [46].

2.7.3.3. Catálisis

Para realizar su función, la lacasa depende de los átomos de cobre distribuidos entre los tres sitios de unión. Los átomos de cobre juegan un papel fundamental en el mecanismo catalítico de la enzima. Dicho mecanismo catalítico consta de tres etapas principales. En primer lugar, el cobre de tipo 1 es reducido por un sustrato reductor, el cual por lo tanto es oxidado. El electrón es por lo tanto transferido internamente desde el átomo de cobre de tipo 1 a un grupo trinuclear formado por los átomos de cobre de tipo 2 y de tipo 3. Esto se puede apreciar en la figura 2.20 [47]. El oxígeno molecular (O_2) se reduce a agua en el grupo trinuclear.

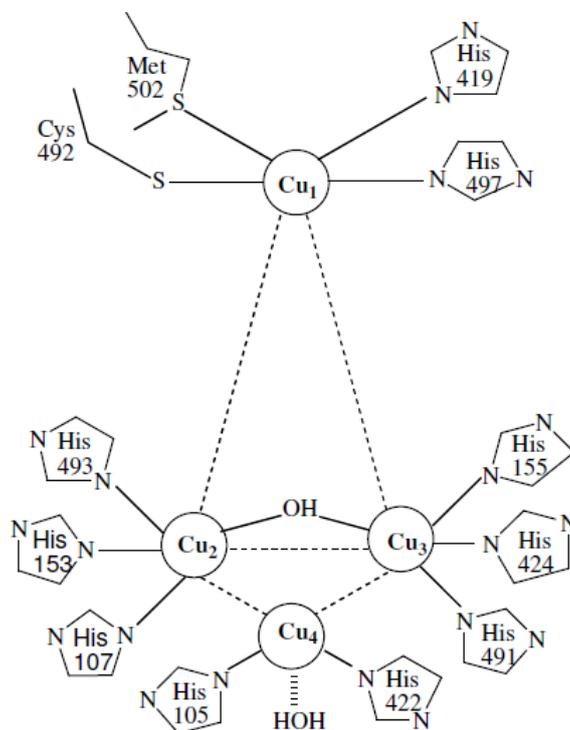


Fig. 2.21. Imagen de un sitio activo de la lacasa que muestra la orientación y posición relativa de los átomos de cobre entre sí.

La molécula de O₂ se une al grupo trinuclear para la activación asimétrica. No se encuentra presente H₂O₂ fuera de la lacasa durante el estado estacionario de la catálisis de la lacasa, indicando que tiene lugar una reducción de cuatro electrones de O₂ a agua [48]. La oxidación de un sustrato que implica a un único electrón acompaña al proceso de reducción de oxígeno de cuatro electrones, de tal forma que no nos encontramos frente a un mecanismo de reacción simple. Así pues, la lacasa debe de funcionar a modo de batería, almacenando electrones de la oxidación individual del sustrato para reducir el oxígeno molecular.

2.8. ANTIOXIDANTE

2.8.1. Introducción

Los **antioxidantes** son moléculas que inhiben la oxidación de otras moléculas, es decir, evitan la reacción química según la cual se produce transferencia de electrones o hidrógeno desde una sustancia hacia un agente oxidante. Estas reacciones dan lugar a radicales libres, los cuales pueden actuar como sustancias iniciadores de reacciones en

cadena, según las cuales, en caso de desencadenarse en una célula, pueden producir daños o la muerte de dicha célula [49].

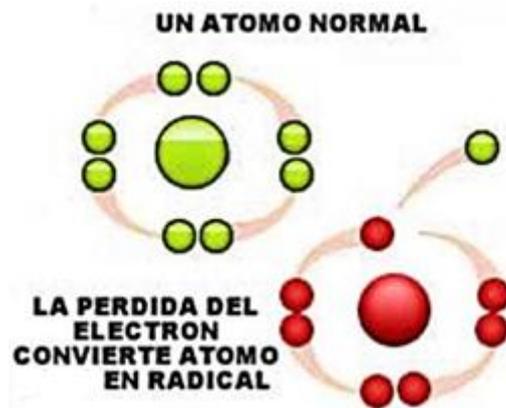


Fig 2.22. Esquema de la formación de un radical libre.

Los antioxidantes se encargan de romper estas reacciones en cadena al eliminar los radicales libres intermedio, inhibiendo otras reacciones de oxidación. Son capaces de realizar esta función oxidándose a si mismos, es decir, los antioxidantes son por norma general agentes reductores como por ejemplo **polifenoles**, algunos de los cuales serán objeto de estudio en el presente proyecto [50].

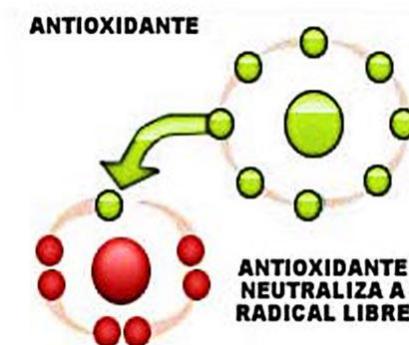


Fig. 2.23. Esquema de un antioxidante neutralizando un radical libre evitando una reacción en cadena en el proceso.

Dado que las reacciones de oxidación pueden causar daños o incluso la muerte de células la presencia de los antioxidantes es fundamental en los seres vivos, tanto en plantas como animales. Por ello los seres vivos mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como la vitamina C, vitamina E [51], varios tipos de enzimas, etc. Cuando los niveles de dichos antioxidantes son bajos, o cuando se inhiben las enzimas antioxidantes, se puede producir lo que se conoce como **estrés oxidativo** que como ya se ha comentado desemboca en daños o incluso la muerte de la célula.

El **estrés oxidativo** es un desequilibrio entre la manifestación sistémica de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico para detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Las perturbaciones en el estado redox de las células normales pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Además, algunas especies oxidativas reactivas actúan como mensajeros celulares de señalización redox. Así, el estrés oxidativo puede causar interrupciones en los mecanismos normales de la señalización celular.

La presencia de los antioxidantes en la alimentación es fundamental, ya que la ingesta de los mismos contribuye a mantener sus niveles en el organismo en un estado adecuado. La ingesta de polifenoles, entre otros beneficios para la salud, ayuda disminuir los riesgos de sufrir cáncer y cardiopatías coronarias en humanos [52], además de influir en las cualidades organolépticas de los propios alimentos [53]. Por ello resulta de especial interés la detección de los mismos.

2.8.2. Monofenoles

2.8.2.1. Ácido vanílico

El **ácido vanílico** (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) es un compuesto orgánico aromático derivado de un ácido dihidroxibenzoico empleado como agente saborizante. Es un monofenol y su fórmula molecular es $C_8H_8O_3$.

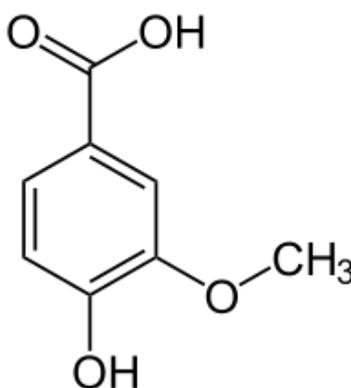


Fig 2.24. Estructura química del ácido vanílico.

El ácido vanílico es un intermediario en la producción de vainillina desde el ácido ferúlico. Se puede encontrar en la naturaleza, concretamente en algunas plantas como por ejemplo la *Angelica sinensis*, también conocida como ginseng femenino muy empleada en la medicina tradicional china [54]. También se encuentra presente en el

vino [55], en el vinagre [56] y en el aceite de argán [57]. Se emplea en forma de éster como conservante en la industria alimentaria.

2.8.3. Difenoles

2.8.3.1. Ácido cafeico

El **ácido cafeico** es un compuesto orgánico aromático clasificado como un ácido hidroxicinámico, es decir, pertenece a los polifenoles que poseen un esqueleto C6-C3. El ácido cafeico consta de grupos funcionales fenólicos y acrílicos.

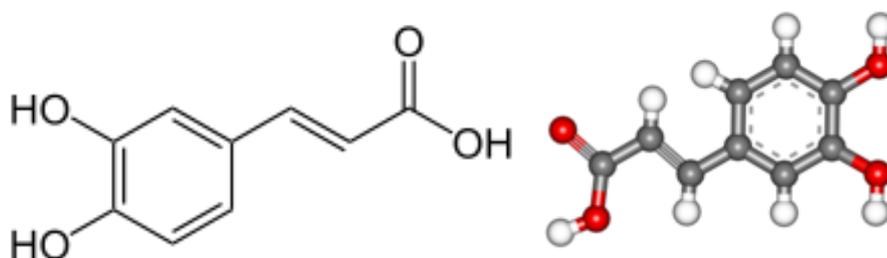


Fig 2.25. Estructura química (izquierda) y estructura 3D (derecha) del ácido cafeico.

Presenta el aspecto de sólido amarillo y puede encontrarse en todas las plantas porque es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, una de las principales fuentes de biomasa [58]. Además se encuentra presente en el hongo *Phellinus linteus* [59], es uno de los fenoles principales que constituyen el aceite de argán [60] y también puede encontrarse en frutas y otros alimentos.

El ácido cafeico es biosintetizado por la hidroxilación del ácido hidroxicinámico. Esta hidroxilación produce el éster de ácido cafeico de ácido siquímico, que se convierte en ácido clorogénico. Es el precursor de ácido ferúlico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, todos los cuales son importantes bloques de construcción de la lignina [61]. La transformación de ácido ferúlico es catalizada por la enzima ácido cafeico-O-metiltransferasa.

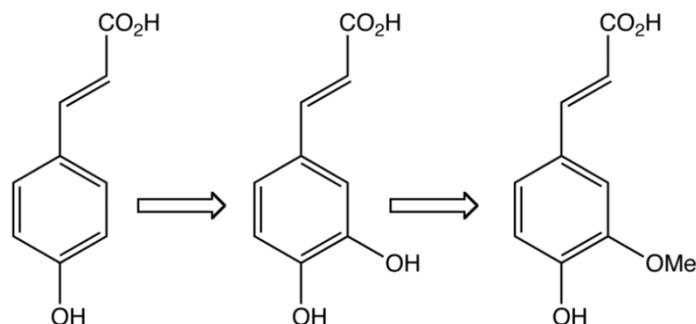


Fig. 2.26. En las plantas, el ácido cafeico (parte central) se forma a partir de 4-hidroxicinámico (izquierda) y se transforma en ácido ferúlico.

2.8.3.2. Catecol

El **catecol**, también conocido como pirocatecol o 1,2-dihidroxibenceno, es un compuesto orgánico aromático cuya fórmula molecular es $C_6H_4(OH)_2$. Es el isómero orto de los tres benzenodiolos isoméricos [62].

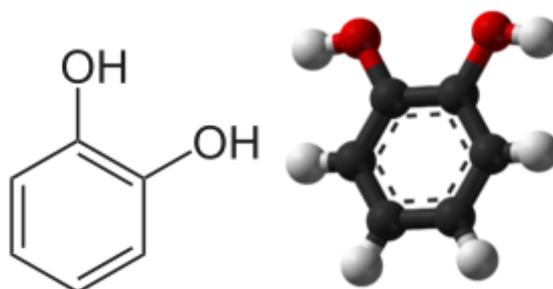


Fig. 2.27. Estructura química (izquierda) y estructura 3D del catecol.

El catecol es un compuesto sólido de color blanco que se encuentra presente en cantidades del orden de trazas de forma natural en frutas y vegetales. Fue aislado por primera vez en 1839 por H. Reinsch a través de la destilación de la catequina del extracto de acacia conocido como catechu. Al calentar el catechu por encima de su punto de descomposición se forma el pirocatecol o catecol.

Se puede obtener catecol a través de la reacción de reducción reversible de la benzoquinona.

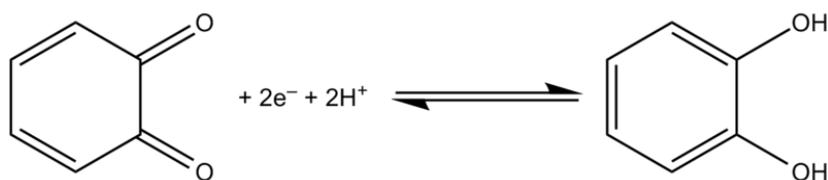
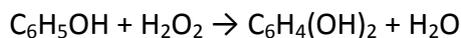


Fig. 2.28. Reducción de la 1,2-benzoquinona para dar lugar a catecol.

La producción industrial del catecol se lleva a cabo por la hidroxilación de fenol mediante peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción:



El catecol producido a nivel industrial se utiliza principalmente como antioxidante en las industrias del caucho, química, fotografía, colorantes, grasas y aceites, así como en cosméticos y en algunos productos farmacéuticos.

2.8.3.3. Hidroquinona

La **hidroquinona**, también conocida como 1,4-benzenodiol o quinol, es un compuesto orgánico aromático cuya fórmula química, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$, es igual que la del catecol con la diferencia de que los grupos hidroxilo están dispuestos en posiciones diferentes. El catecol es un ortodifenol, mientras que la hidroquinona es un paradifenol.

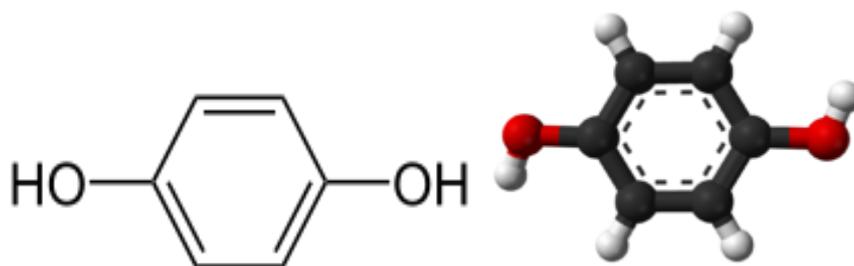


Fig. 2.29. Estructura química (izquierda) y estructura 3D (derecha) de la hidroquinona.

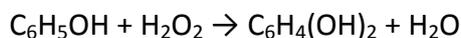
La hidroquinona presenta el aspecto de sólido cristalino de color blanco.

La hidroquinona se oxida fácilmente para dar benzoquinona en un proceso reversible. Algunos derivados de la hidroquinona de origen natural presentan este tipo de reactividad, siendo la coenzima Q un ejemplo de este comportamiento.

En relación a la reactividad de sus grupos hidroxilo el comportamiento de la hidroquinona se asemeja al de otros fenoles, presentando un carácter ligeramente ácido.

La hidroquinona se produce industrialmente por tres rutas, dos de las cuales son dominantes en la actualidad [63]. Similar al proceso de cumeno en el mecanismo de reacción, la ruta más ampliamente utilizada implica la dialquilación de benceno con propeno para dar 1,4-diisopropilbenceno. Este compuesto reacciona con el aire para dar el bis(hidroperóxido), que es estructuralmente similar al hidroperóxido de cumeno

y se reorganiza para dar acetona e hidroquinona en ácido. Una segunda vía consiste en la hidroxilación de fenol. La conversión utiliza peróxido de hidrógeno y proporciona una mezcla de hidroquinona y catecol, dando lugar a la misma reacción que la vista previamente para el catecol:



El tercer método, utilizado solamente en China, es la oxidación de anilina por dióxido de manganeso, seguido de reducción de la resultante 1,4-benzoquinona. El proceso se lleva a cabo por lotes y genera una corriente de desecho sustancial.

2.8.4. Trifenoles

2.8.4.1. Pirogalol

El **pirogalol**, también conocido como 1,2,3-benzenotriol, es compuesto orgánico aromático trifenólico.

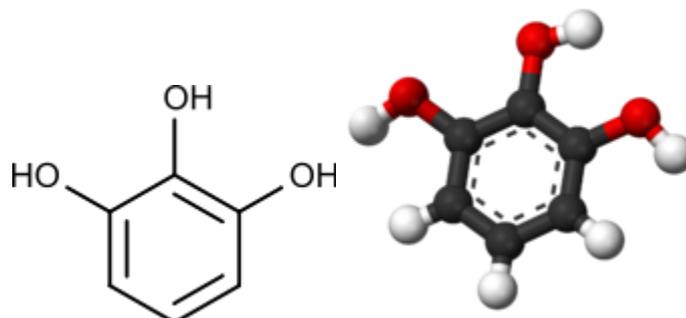


Fig. 2.30. Estructura química (izquierda) y estructura 3D (derecha) del pirogalol.

Tiene aspecto de polvo cristalino de color blanco y es un agente reductor muy fuerte. Fue obtenido por primera vez por Scheele en 1786 mediante el calentamiento de ácido gálico.

2.8.4.2. Ácido gálico

El **ácido gálico**, también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico es un compuesto orgánico aromático con fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$. Es un ácido fenólico, concretamente un ácido trihidroxibenzoico.

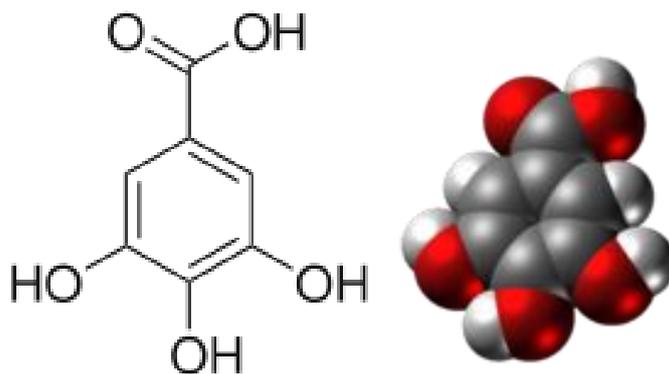


Fig. 2.31. Estructura química (izquierda) y estructura 3D (derecha) del ácido gálico.

Tiene aspecto de cristales sólidos de color blanco. El ácido gálico se estudió por primera vez por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele en 1786 [64]. Sin embargo, se ha empleado como uno de los componentes de la tinta de hierro biliar que se ha empleado como tinta estándar a nivel Europeo entre los siglos XII y XIX.

El ácido gálico se puede encontrar principalmente en las plantas, como por ejemplo en las hojas de té [65]. También se encuentra presente en el vinagre, en el vino, en frutas como el mango o las moras. Se puede encontrar en el cacao y por lo tanto en el chocolate [66].

2.9. GLUTARALDEHÍDO

El **glutaraldehído** es un compuesto orgánico cuya fórmula molecular es $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$. Es un compuesto líquido a temperatura ambiente, incoloro, aceitoso y untuoso, de fuerte olor acre. Se emplea principalmente para la desinfección de equipos médicos, dentales o incluso de laboratorio. También se le utiliza como conservante químico en el tratamiento de aguas industriales [67].

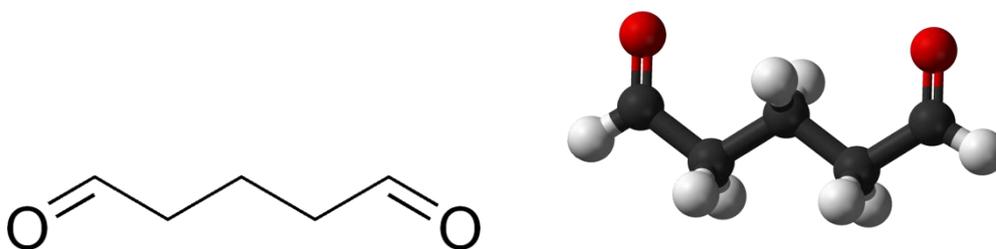


Fig. 2.32. Estructura química (izquierda) y estructura 3D (derecha) del glutaraldehído.

El glutaraldehído es producido industrialmente por oxidación del ciclopenteno y a través de la reacción de Diels-Alder de la acroleína y del metil vinil éter seguido de una hidrólisis [67].

La función del glutaraldehído en la obtención de electrodos modificados a través de la técnica de Langmuir-Blodgett es la de inmovilizar la enzima una vez que se ha depositado sobre el soporte de ITO [68]. Esto se debe a la formación de un **azometino**, también conocido como base de Schiff, entre los grupos C=O del glutaraldehído y las aminas de la enzima [69, 70, 71, 72].

Un azometino es un grupo funcional que contiene un doble enlace carbono-nitrógeno, estando el átomo de nitrógeno conectado a un grupo arilo o alquilo, pero sin hidrógeno. De tal forma, que la fórmula general obtenida es $R_1R_2C=N-R_3$, donde R_3 es un grupo arilo o alquilo que convierte al azometino en una imina ($RR'C=NR''$) estable.

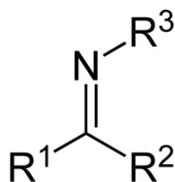
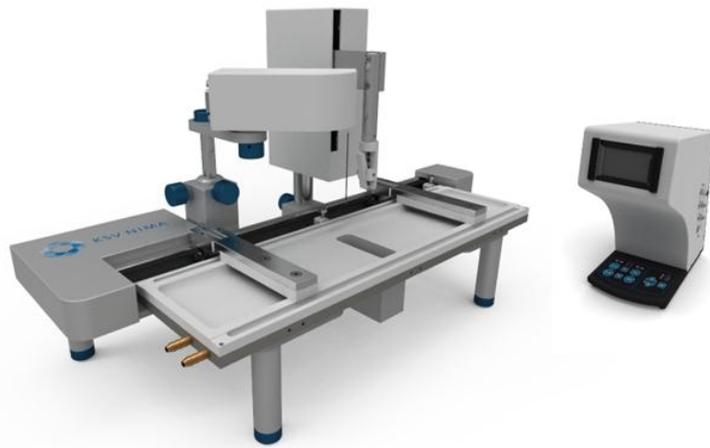


Fig. 2.33. Estructura de un azometino o base de Schiff.

MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



3

Capítulo

ÍNDICE

3.1. INTRODUCCIÓN.....	59
3.2. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN.....	59
3.2.1. Materiales.....	59
3.2.1.1. Sustrato sólido.....	59
3.2.1.2. Fase acuosa.....	59
3.2.1.3. Disolvente.....	60
3.2.1.4. Agentes modificadores.....	60
3.2.1.5. Antioxidantes.....	60
3.2.1.6. Otros reactivos.....	61
3.2.2. Instrumentación.....	61
3.2.2.1. Balanza de Langmuir-Blodgett.....	61
3.2.2.2. Potenciostato-Galvanostato.....	62
3.2.2.3. Celda electroquímica.....	62
3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	63
3.3.1. Introducción.....	63
3.3.2. Preparación de los soportes de ITO.....	63
3.3.3. Preparación de la balanza para la deposición de ftalocianina.....	65
3.3.4. Deposición de ftalocianina.....	66
3.3.5. Preparación de la balanza para la deposición de enzima.....	67
3.3.6. Deposición del enzima.....	68
3.3.7. Preparación de la celda electroquímica.....	69
3.3.8. Medida de concentraciones.....	71
3.3.9. Medidas del estudio cinético.....	72

3.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se enunciarán y describirán los materiales, el instrumental y los pasos seguidos para la obtención de los biosensores y para la realización de las mediciones experimentales. Se empezará hablando de los materiales, se continuará por el instrumental para finalmente entrar de lleno en la metodología experimental.

3.2. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.2.1. Materiales

A continuación se realiza un compendio de los materiales empleados a lo largo del proyecto para realizar las experiencias.

3.2.1.1. Sustrato sólido:

- **Cristal de ITO.**

El sustrato sólido sobre el cual se depositan monocapas de moléculas ordenadas mediante la técnica de Langmuir-Blodgett, y que a la postre será empleado como electrodo de trabajo para analizar los antioxidantes, consiste en un rectángulo de 25x10x1 mm construido en vidrio y con una capa conductora de óxido indio dopado con dióxido de estaño (ITO) en una de sus caras.

3.2.1.2. Fase acuosa:

- **Agua ultrapura – Millipore MilliQ.**
- **Disolución buffer de fosfato 0,01M + NaCl 0,1M, pH=7.**

Para depositar las monocapas de moléculas ordenadas sobre el sustrato sólido hay que disponer de una fase acuosa en la balanza en cuya superficie se disponen las moléculas. Para depositar la bisftalocianina de lutecio se emplea como fase acuosa agua ultrapura (Milli-Q). A la hora de realizar la deposición de las enzimas, tanto la lacasa, como la tirosinasa, se emplea como fase acuosa una disolución buffer de fosfato 0,01M con cloruro de sodio (NaCl, Sigma-Aldrich) 0,1M a pH = 7. El buffer de fosfato se prepara a partir de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) y fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) ambos de Sigma-Aldrich.

3.2.1.3. Disolventes:

- Cloroformo (Sigma-Aldrich).
- Agua ultrapura - Millipore MilliQ.
- Disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7.

Para disolver la bisftalocianina de lutecio se emplea como disolvente cloroformo. Las disoluciones de tirosinasa y lacasa se realizan con buffer fosfato 0,01M a pH = 7.

3.2.1.4. Agentes modificadores:

- Ácido araquídico (AA) (Sigma-Aldrich)
- Bisftalocianina de lutecio (LuPc₂). (Departamento de Química Inorgánica de la Escuela de Ingenierías Industriales de la UVA)
- Tirosinasa (Tyr) (Sigma-Aldrich)
- Lacasa (Lac) (Sigma-Aldrich)

3.2.1.5. Antioxidantes:

- Ácido vanílico. (Fluka)
- Ácido cafeíco. (Sigma-Aldrich)
- Catecol. (Panreac)
- Hidroquinona (Sigma-Aldrich)
- Pirogalol. (Sigma-Aldrich)
- Ácido gálico. (Sigma-Aldrich)

3.2.1.6. Otros reactivos:

- Glutaraldehído (Sigma-Aldrich)
- Cloruro potásico al 99% (KCl) (Sigma-Aldrich)

El glutaraldehído se emplea para inmovilizar la enzima al sustrato. El cloruro potásico se emplea para preparar la disolución empleada para llevar el interior del electrodo de referencia.

3.2.2. Instrumentación

3.2.2.1. Balanza Langmuir-Blodgett

La balanza de Langmuir-Blodgett modelo **KSV 2000-1** está constituido por dos instrumentos y un software de control. Los dos instrumentos son en primer lugar la balanza de Langmuir-Blodgett propiamente dicha y el indicador de presión superficial que aparece a la derecha. El software de control es el **KSV Layer Builder**.

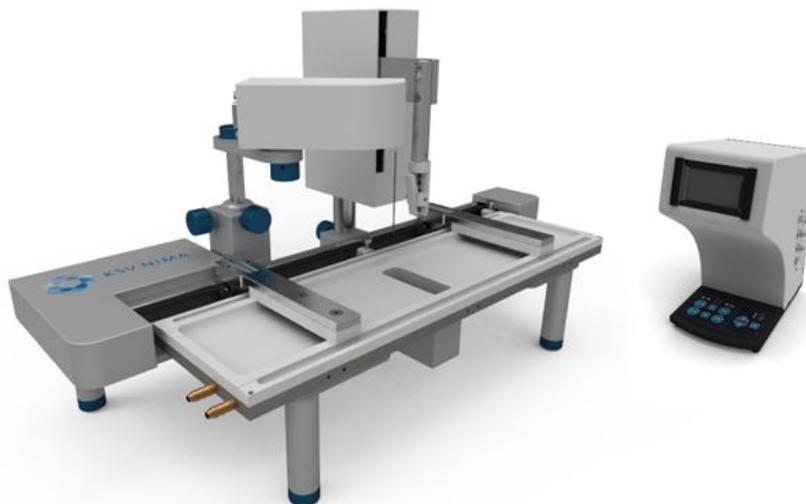


Fig. 3.1. Balanza de Langmuir-Blodgett KSV 2000-1.

3.2.2.2. Potenciostato-Galvanostato.

El potenciostato-galvanostato modelo **PARSTAT 2273** es el instrumento empleado para realizar las medidas voltamétricas. Este instrumento se encuentra controlado por un software llamado **POWERSUITE** a través del cual se selecciona el tipo de experiencia, las condiciones del experimento y se controla el inicio y el final del mismo.



Fig. 3.2. Potenciostato PARSTAT 2273.

3.2.2.3. Celda electroquímica

La celda electroquímica está constituida por tres electrodos: el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el contraelectrodo.

Los electrodos modificados obtenidos a partir de la deposición de capas ordenadas de moléculas sobre un sustrato de cristal de ITO empleando la técnica de Langmuir-Blodgett constituyen el electrodo de trabajo.

El electrodo de referencia es un electrodo de Ag/AgCl/KCl (3M).

El contraelectrodo es un electrodo de hilo de platino.

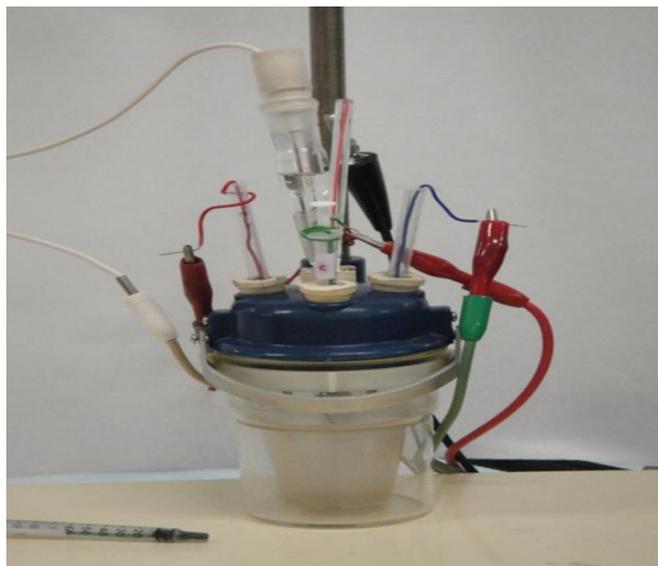


Fig. 3.3. Celda electroquímica.

3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.3.1. Introducción

En este apartado se procederá a describir, paso a paso, cual es el procedimiento experimental seguido para, en primer lugar, obtener los electrodos modificados mediante la deposición sobre los soportes de ITO y también para realizar las mediciones que permiten obtener los resultados que se expondrán a lo largo del siguiente capítulo.

3.3.2. Preparación de los soportes de ITO

Para empezar hay que limpiar tanto la balanza de Langmuir-Blodgett como los soportes de ITO. La limpieza de los soportes de ITO se realiza en tres etapas; en primer lugar se limpian con agua destilada, luego con acetona y finalmente con cloroformo, empleando para ello una bañera de ultrasonidos y empleando 10 minutos en cada etapa.



Fig. 3.4. Sustrato de cristal de ITO.

Una vez nos hemos asegurado de que están limpios se deja evaporar los restos de cloroformo que quedan en la superficie del soporte.

Los soportes de ITO tienen un único lado conductor que es obviamente sobre el cual se realiza la deposición. A simple vista se puede apreciar como la cara de ITO, que es conductora, tiene una tonalidad ligeramente más oscura, sin embargo, para comprobar cual es la cara conductora con exactitud se emplea un conductímetro.

Sobre la parte superior de la cara conductora del soporte de ITO se deposita con ayuda de un pincel laca de plata conductora sobre la cual se fijarán los contactos metálicos de las pinzas a la hora de realizar las medidas electroquímicas. El resultado se aprecia en la siguiente figura.



Fig. 3.5. Sustrato de cristal de ITO con laca de plata.

Tras la aplicación de la laca de plata, hay que esperar a que esta se seque sobre la superficie del soporte.

Una vez seca se colocan los soportes en la pinza teniendo en cuenta que para depositar siempre hace falta un número par de soportes. Esto se debe a que como la balanza de Langmuir-Blodgett dispone de barreras en ambos lados la deposición se realiza por ambos lados, de tal forma que hay que colocar dos soportes en la pinza de sujeción con sus caras no conductoras enfrentadas entre sí, es decir, pegadas. De tal forma que se deposite sobre las caras que contienen ITO y sobre las cuales se ha puesto una tira de laca de plata.

La pinza se coloca sujetando los soportes de ITO sobre la laca de plata, ya que hasta ahí es donde se va a depositar.

Una vez dispuestos los soportes de ITO en la pinza, se engancha esta al dipper, que es un brazo móvil situado sobre el centro de la bañera, que permite subir y bajar los soportes para realizar la deposición.

Se calibra el dipper haciendo 0 en el mismo bajándolo hasta que la parte inferior del soporte esté justo encima de la superficie de la fase acuosa. Y posteriormente se sumerge hasta que la superficie del agua esté cerca de alcanzar la parte superior del soporte del ITO donde está la laca de plata, con cuidado de no sumergir ni la laca, ni la pinza.

3.3.3. Preparación de la balanza de Langmuir-Blodgett para depositar la ftalocianina

Para la limpieza de la balanza se emplea acetona. Se limpia tanto la superficie de la balanza como la parte inferior de las barreras, ya que estas también entran en contacto con la superficie de la fase acuosa. Este proceso se realiza antes de depositar y al finalizar la experiencia tras vaciar la balanza.

Una vez limpia la superficie de la bañera se procede a añadir la fase acuosa, que para la deposición de la bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 disueltos en cloroformo en una concentración de **120 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ftalocianina**, se trata de agua ultrapura (Milli-Q). Se llena la bañera con la fase acuosa hasta que por encima del borde se aprecie la superficie del agua y se procede a comprobar que no existe ningún tipo de impureza en la superficie que altere la tensión superficial. Para ello se cierran las barreras y se procede a limpiar la superficie con una trompa de vacío tantas veces como sean precisas para lograr que la medida de la presión que proporciona la instrumentación sea aproximadamente cero, aún con las barreras totalmente cerradas.

Una vez que nos hemos cerciorado de que la superficie está totalmente limpia se abren las barreras por completo y se conecta el termostato que mantiene la temperatura constante a 20°C. Posteriormente se procede a añadir 250 μL de disolución de bisftalocianina de lutecio y ácido araquídico (1:10) (120 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ftalocianina) en cloroformo con ayuda de una microjeringa. Deben distribuirse de forma uniforme por toda la superficie de la bañera dejando caer gota a gota con la punta de la aguja cercana a la superficie de la fase acuosa.

De esta forma, nos aseguramos de que las gotas caen con suavidad sobre la superficie y se distribuyen por difusión a lo largo y ancho de toda la bañera, ya que si se dejan caer desde cierta altura se producen manchas de tonalidad verdosa en la fase acuosa, que indican que la ftalocianina se ha acumulado y no se ha dispersado.

Tras añadir la disolución de la ftalocianina es preciso esperar 15 minutos para que se evapore el cloroformo dejando sobre la superficie de la fase acuosa únicamente las moléculas de bisftalocianina de lutecio y ácido araquídico (1:10).

3.3.4. Deposición de la bisftalocianina de lutecio

Una vez preparada la balanza de Langmuir-Blodgett y los soportes de ITO tal y como se ha indicado anteriormente se procede a depositar la bisftalocianina de lutecio y ácido araquídico (1:10) (120 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ftalocianina).

Con los soportes ya sumergidos, se cierran las barreras hasta alcanzar un valor de la presión óptimo para la deposición que es de 40 mN/m, dicho valor se obtiene a partir de las curvas de la isoterma de las cuales ya se hablará en el apartado de resultados. Se espera a que se estabilice la presión en dicho valor óptimo y se procede a depositar estableciendo para ello las condiciones del proceso. Los parámetros clave del proceso que hay que establecer para la deposición son los siguientes:

- Número de capas: 11 capas.
- Velocidad de subida: 12 mm/min.
- Tiempo de espera arriba: 10 seg.
- Velocidad de bajada: 7 mm/min.
- Tiempo de espera abajo: 2 seg.

El dipper empieza en su posición inferior, es decir, con los soportes de ITO sumergidos. Se dice que se trata de una deposición de tipo Y, ya que antes de esparcir la monocapa el sustrato se encuentra sumergido, y al irlo sacando de la subfase se produce la primera transferencia de la monocapa.

El dipper sube lentamente hasta alcanzar el valor 0 con el que se calibró el dipper a la velocidad de subida indicada. Una vez que alcanza el valor 0, ya se ha transferido la primera transferencia desde la monocapa, y se espera un tiempo igual al tiempo de espera arriba establecido. Transcurrido este tiempo, el dipper comienza a bajar hasta alcanzar el valor tope establecido en la calibración, a una velocidad igual a la velocidad de bajada que se ha establecido. Cuando llega hasta el tope, el dipper se detiene, habiéndose depositado una segunda capa, y espera tanto tiempo como indica el valor del tiempo de espera abajo. A partir de aquí el ciclo se repite hasta completar las 11 capas indicadas, teniendo en cuenta que se depositan una capa en cada subida y una capa en cada bajada.

Empleando estas condiciones de deposición se logra obtener tasas de transferencia de moléculas desde la monocapa hasta el soporte de ITO aproximadamente iguales a la unidad tanto para la subida como para la bajada.

Durante el proceso de deposición las barreras mantienen la presión constante en el valor señalado, para ello las barreras se van cerrando ligeramente conforme las moléculas se van depositando sobre los soporte de ITO.

Una vez que se han depositado todas las capas, se sube el dipper, se retira la pinza y se retiran los soportes de ITO en los cuales ya se aprecia el tono verdoso que corresponde a la bisftalocianina de lutecio.

3.3.5. Preparación de la balanza de Langmuir-Blodgett para depositar la enzima

Tras haber depositado las 11 capas de ftalocianina se depositan sobre ellas 9 capas de enzima, bien tirosinasa o bien lacasa.

Para ello, en primer lugar se vacía con una trompa de vacío y se limpia la balanza de forma análoga a lo indicado con anterioridad para la ftalocianina. Después se llena la balanza con buffer fosfato 0,01M más NaCl 0,1M a pH = 7, ya que constituye el medio adecuado para que la enzima viva. Cuando esté llena la balanza se comprueba tal y como se hacía anteriormente que no hay impurezas en la superficie de la fase acuosa, limpiando la superficie en caso necesario hasta que la presión superficial sea prácticamente nula incluso cuando las barreras están completamente cerradas.

Se toman soportes de ITO sobre los cuales ya se ha depositado previamente la bisftalocianina de lutecio, se colocan en el dipper y se sumergen, calibrando el dipper, de forma análoga a la empleada anteriormente.

Con el termostato ya conectado, los soportes de ITO sumergidos y las barreras ya abiertas se añaden 250 μ L de disolución de bisftalocianina de lutecio y ácido araquídico (1:10) en cloroformo con ayuda de una microjeringa de la misma forma a como lo hicimos con anterioridad. Tras un tiempo de espera de 15 minutos en el cual se evapora el cloroformo se añaden 100 μ L de enzima que se encuentra en una concentración de 70 μ g/mL en buffer fosfato 0,01M a pH=7 (sin NaCl), tanto si se trata de lacasa como si se trata de tirosinasa.

La enzima tiene que ser añadida en la interfase aire-agua, para lo cual hay que añadir cada gota tocando ligeramente con la punta de la microjeringa la superficie de la fase acuosa. Al igual que para la ftalocianina hay que distribuir de forma equitativa la enzima a lo largo de toda la superficie de la balanza.

Tras añadir la enzima hay que esperar 30 minutos en el caso de que estemos depositando tirosinasa y 60 minutos en el caso de que se trate de la lacasa. Este tiempo de espera es necesario para permitir que la enzima se ancle. Para obtener los

tiempos de espera óptimos que permiten que la enzima se ancle se han realizado diversas experiencias en las cuales se ha observado que para tiempos menores la tasa de transferencia de moléculas desde la monocapa hacia el soporte de ITO es prácticamente nula, es decir, no se deposita la enzima.

3.3.6. Deposición del enzima

Una vez transcurrido el tiempo de espera se procede a establecer la presión óptima de transferencia de moléculas desde la monocapa hasta el soporte, dicha presión es al igual que antes de 40 mN/m. Se espera hasta que la presión permanece estable en este valor.

Cuando ya se ha estabilizado la presión se inicia el proceso de deposición introduciendo los siguientes parámetros:

- Número de capas: 9 capas.
- Velocidad de subida: 3 mm/min.
- Tiempo de espera arriba: 900 seg.
- Velocidad de bajada: 2 mm/min.
- Tiempo de espera abajo: 100 seg.

Como se puede apreciar, los valores de las velocidades de subida y de bajada son más bajos que los empleados para depositar la ftalocianina y los tiempos de espera arriba y abajo son mucho más altos. Esto se debe a que de lo contrario las capas de la enzima no se fijarían bien y se obtendrían tasas de transferencias moleculares negativas. Es decir, que tras depositarse una capa (transfer positivo próximo a la unidad) la siguiente da lugar a un transfer negativo que implica que dicha capa se está soltando del soporte de ITO. Por ello, se emplean velocidades bajas y tiempos de espera altos que permiten que cada capa se fije al soporte adecuadamente.

Tras haber depositado las 9 capas de enzima en los soportes de ITO, se levanta el dipper, se retira la pinza y se sumergen los electrodos modificados que hemos obtenido al depositar sobre los soportes de ITO en una solución de glutaraldehído 2,5% (v/v) en buffer fosfato 0,01M, pH=7, durante aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente. Esta solución de glutaraldehído actúa como un inmovilizador de la enzima, prologando la vida útil del electrodo. Esto se debe, como ya se ha comentado, a la formación de un azometino entre los grupos C=O del glutaraldehído y las aminas de la enzima.

Antes de realizar las mediciones simplemente se lava el electrodo con la propia disolución buffer de fosfato y se le deja secar.

3.3.7. Preparación de la celda electroquímica

Para la realización de la voltametría cíclica hay que preparar en primer lugar la celda electroquímica. Para ello habrá que limpiar y preparar cada uno de los electrodos (referencia, contraelectrodo y trabajo), así como la propia celda.

El electrodo de referencia tiene dos secciones una más interna y una externa. La interna se llena con disolución patrón de KCl 0,1M y la parte externa con una disolución preparada en el laboratorio de KCl 0,1M.

Antes de cada uso, hay que limpiar y llenar el electrodo de referencia. La limpieza se realiza con agua destilada, además hay que homogeneizar adecuadamente antes de llenar las dos secciones del electrodo.



Fig. 3.6. Electrodo de referencia.

Para la limpieza del contraelectrodo de hilo de platino se le somete al hilo del electrodo a una llama hasta llegar al rojo. Después se sumerge en una solución de ácido sulfúrico. Se repite este proceso tres veces y se limpia ligeramente con agua destilada.

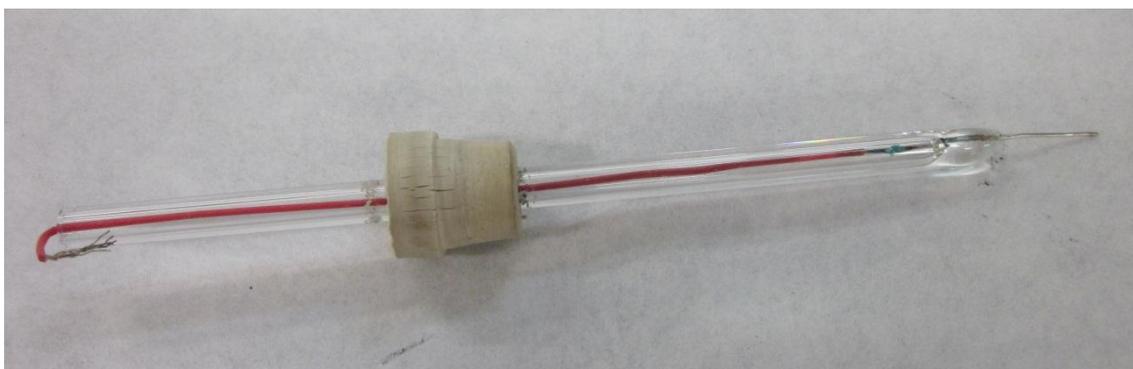


Fig. 3.7. Electrodo auxiliar de hilo de platino.

La celda electroquímica, previa limpieza, se llena con 50 mL de solución buffer de fosfato 0,01M pH=7.

Una vez preparados todos estos elementos ya podemos conectarlos para conformar el conjunto de la celda electroquímica. Para ello se conecta cada electrodo con su pinza de conexión correspondiente y se sitúa en la parte de más a la izquierda el electrodo de trabajo.



Fig. 3.8. Celda electroquímica.

El electrodo de trabajo es el electrodo modificado obtenido por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett. Para la conexión de dicho electrodo hay que poner especial cuidado de colocar la pinza de conexión sobre la laca de plata y de orientar el lado donde se ha depositado hacia la derecha, es decir, de cara a los otros dos electrodos.



Fig. 3.9. Electrodo de trabajo.

En el centro se coloca el electrodo de referencia y en la parte de más a la derecha el contraelectrodo.

Para todos ellos es especialmente importante que estén lo más rectos posible, ya que cualquier modificación en la distancia existente entre ellos o en su orientación (especialmente en el caso del electrodo de trabajo) puede afectar a las medidas. Esto además puede afectar a la reproducibilidad de los experimentos.

Una vez que está preparada la celda con todos sus electrodos conectados a las pinzas del PARSTAT 2273 se enciende dicho aparato. Y una vez encendido se arranca su software de control, el POWERSUITE, desde el sistema informático anexo.

Desde el POWERSUITE se controla el funcionamiento del PARSTAT 2273, pudiendo modificar al gusto los parámetros del experimento, controlando el inicio y fin del mismo, amén de poder ver una representación de los datos obtenidos en tiempo real.

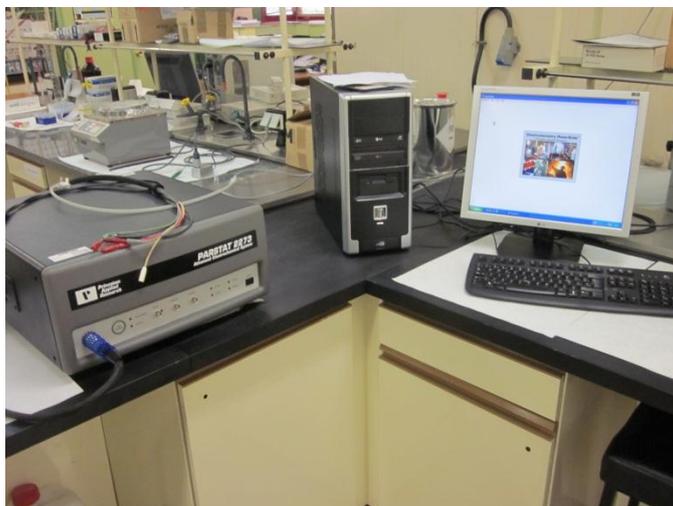


Fig. 3.10. PARSTAT 2273 y software de control POWERSUITE.

3.3.8. Medida de concentraciones

Para la medida de las concentraciones se prepara en primer lugar, con uno de los antioxidantes, una **disolución de antioxidante 10^{-3} M** empleando como disolvente disolución buffer de fosfato 0,01M pH=7. Esta disolución será la disolución madre de la cual se adicionan a la celda electroquímica cantidades crecientes de antioxidante.

Una vez preparada la celda electroquímica tal y como se ha descrito con anterioridad, sin haber añadido antioxidante, y ya dispuesto el PARSTAT 2273 para medir con el POWERSUITE iniciado, se procede a iniciar la experiencia.

Se realiza una primera voltametría cíclica con los 50 ml de solución buffer de fosfato en la celda que constituyen el ensayo en blanco. Se realizan 5 ciclos y se hace un barrido desde -0,5 V hasta +0,7 V, con una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s. Se realizan 5 ciclos porque es lo que tarda en estabilizarse la señal para esta primera experiencia. En las sucesivas experiencias con el electrodo ya ciclado suelen ser necesarios tan solo 3 ciclos para que la señal obtenida se estabilice.

Con una micropipeta se añaden 200 μ L de la disolución de antioxidante a la celda. Al igual que antes se realiza un barrido desde -0,5 V hasta +0,7 V con una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s y se realizan 5 ciclos para permitir que se estabilice la señal.

Posteriormente se añaden 300 μL , que hacen un total de 500 μL añadidos, y se repite el proceso. A partir de aquí la señal suele estabilizarse casi totalmente al tercer ciclo.

Las sucesivas adiciones son de 500 μL hasta llegar al total de 3500 μL añadidos. A partir de los cuales se añade de 1000 μL en 1000 μL hasta llegar a 7500 μL .

En total se realizan 12 adiciones a las cuales hay que sumar la medida del blanco, es decir, en total se realizan 13 medidas para cada antioxidante y cada electrodo modificado.

A continuación se presenta una tabla resumen que ilustra lo expuesto anteriormente.

Nº de ensayo	Volumen total añadido (μL)	Concentración final (M)
1	0	0 (blanco)
2	200	$4,0 \cdot 10^{-6}$
3	500	$1,0 \cdot 10^{-5}$
4	1000	$2,0 \cdot 10^{-5}$
5	1500	$3,0 \cdot 10^{-5}$
6	2000	$4,0 \cdot 10^{-5}$
7	2500	$5,0 \cdot 10^{-5}$
8	3000	$6,0 \cdot 10^{-5}$
9	3500	$7,0 \cdot 10^{-5}$
10	4500	$9,0 \cdot 10^{-5}$
11	5500	$1,1 \cdot 10^{-4}$
12	6500	$1,3 \cdot 10^{-4}$
13	7500	$1,5 \cdot 10^{-4}$

Tabla 3.1. Relación de volúmenes añadidos de disolución de antioxidante 10^{-3}M frente a concentración final de antioxidante presente en la celda electroquímica.

3.3.9. Medidas del estudio cinético

Las medidas del estudio cinético se realizan al igual que en el caso de las concentraciones empleando una celda electroquímica con tres electrodos (electrodo de trabajo, de referencia y contraelectrodo) y el PARSTAT 2273, el cual se controla mediante el software POWERSUITE.

La preparación de la celda electroquímica para realizar medidas ya se ha descrito con anterioridad.

Una vez preparada se añaden a los 50 mL de disolución buffer de fosfato 5000 μL de disolución de antioxidante en buffer, lo cual hace una concentración de antioxidante en la celda de $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$.

Cuando ya se encuentran dispuestos tanto la celda como el PARSTAT 2273 para medir, se realizan 10 ciclos a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s entre -0,5V y +0,7V, con el objetivo de estabilizar la medida del electrodo. Las medidas obtenidas para estos 10 ciclos van a emplearse para la realización del análisis de componentes principales (PCA).

En este punto, se comienza el estudio cinético propiamente dicho, realizando 2 ciclos con barridos de potencial crecientes, empezando por 25 mV/s y llegando hasta 200 mV/s.

RESULTADOS EXPERIMENTALES



4

Capítulo

ÍNDICE

4.1. INTRODUCCIÓN.....	79
4.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	80
DE LOS SENSORES	
4.2.1. Introducción.....	80
4.2.2. Isotermas.....	80
4.2.2.1. Introducción.....	80
4.2.2.2. Isotherma ácido araquídico.....	82
4.2.2.3. Isotherma bisftalocianina de lutecio.....	83
4.2.2.4. Isotherma tirosinasa.....	85
4.2.2.5. Isotherma lacasa.....	86
4.2.2.6. Comparativa isotermas.....	87
4.3. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y	
CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LOS SENSORES.....	88
4.3.1. Introducción.....	88
4.3.2. Comparativa del comportamiento electroquímico	
de los biosensores nanoestructurados.....	89
4.3.2.1. Introducción.....	89
4.3.2.2. Electrodo de bisftalocianina de lutecio.	89
4.3.2.3. Electrodo de tirosinasa.....	91
4.3.2.4. Electrodo de lacasa.....	92
4.3.2.5. Comparativa entre electrodos.....	93
4.3.3. Respuesta de los biosensores nanoestructurados	
frente a antioxidantes.....	94
4.3.3.1. Introducción.....	94
4.3.3.2. Estudio de concentraciones.....	95
4.3.3.2.1. Introducción.....	95
4.3.3.2.2. Monofenoles.....	96
A) Ácido vanílico.....	96
4.3.3.2.3. Difenoles.....	102
B) Ácido cafeico.....	102
C) Catecol.....	110

D) Hidroquinona.....	119
4.3.3.2.4. Trifenoles.....	127
E) Pirogalol.....	127
F) Ácido gálico.....	134
4.3.3.2.5. Comparativa.....	141
4.3.3.3. Límites de detección.....	145
4.3.3.3.1. Introducción.....	145
4.3.3.3.2. Monofenoles.....	146
A) Ácido vanílico.....	146
4.3.3.3.3. Difenoles.....	155
B) Ácido cafeico.....	155
C) Catecol.....	159
D) Hidroquinona.....	163
4.3.3.3.4. Trifenoles.....	167
E) Pirogalol.....	167
F) Ácido gálico.....	171
4.3.3.4. Estudio de la cinética.....	172
4.3.3.4.1. Introducción.....	172
4.3.3.4.2. Monofenoles.....	173
A) Ácido vanílico.....	173
4.3.3.4.3. Difenoles.....	182
B) Ácido cafeico.....	182
C) Catecol.....	190
D) Hidroquinona.....	197
4.3.3.4.4. Trifenoles.....	205
E) Pirogalol.....	205
F) Ácido gálico.....	212
4.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	217
4.4.1. Introducción.....	217
4.4.2. Lutecio y tirosinasa.....	219
4.4.3. Lutecio y lacasa.....	221
4.4.4. Tirosinasa y lacasa.....	223

4.4.5. Lutecio, tirosinasa y lacasa.....225

4.1. INTRODUCCIÓN

Tal y como ya se ha mencionado a lo largo del presente proyecto, el objetivo consiste en desarrollar sensores que permitan obtener distintas respuestas frente a distintos antioxidantes, de tal forma que puedan emplearse de forma conjunta en una red de sensores. En este proyecto además se busca obtener biosensores de enzimas que den mejores respuestas que los sensores de ftalocianinas frente a las muestras que vamos a analizar.

Para ello, vamos a emplear dichos sensores a modo de electrodos voltamétricos, sometiéndolos a una voltametría cíclica.

Por lo tanto, se ha trabajado con 3 electrodos modificados para realizar las experiencias: electrodos de bisftalocianina de lutecio ($\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$), electrodos de tirosinasa ($\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$) y electrodos de lacasa ($\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$). Se han analizado 6 antioxidantes: un monofenol, el ácido vanílico; tres difenoles, catecol, hidroquinona y ácido cafeico y dos trifenoles, pirogalol y ácido gálico.

Para cada antioxidante se han realizado voltametrías cíclicas con los tres electrodos, realizando varias experiencias que persiguen distintos objetivos. Se pretende obtener electrodos capaces de discriminar los distintos antioxidantes, se pretende además que los electrodos sean capaces de distinguir distintas concentraciones de un antioxidante y por finalmente se pretende que los distintos electrodos den distintas respuestas frente a los diversos antioxidantes de estudio.

El capítulo se estructura de la siguiente forma. En primer lugar, se muestran las isotermas que nos permiten determinar si efectivamente se ha logrado depositar el enzima en el sustrato y cuales son las condiciones óptimas de deposición. A continuación, se analiza el comportamiento de los distintos sensores frente a un blanco, una solución buffer de fosfato. Posteriormente, se exponen los resultados del estudio de concentraciones, trabajando con cada antioxidante y mostrando los resultados para dicho antioxidante de los tres tipos electrodos modificados. Los antioxidantes se ordenan empezando por los monofenoles, siguiendo por los bifenoles y finalizando con los trifenoles. Los resultados de los electrodos que se muestran en primer lugar son los de la ftalocianina, en segundo lugar los de la tirosinasa y finalmente los de la lacasa. Mostrando una comparativa de cada sensor respecto al conjunto de los antioxidantes al final de dicho apartado.

Después se realiza un cálculo de los límites de detección obtenidos para los picos más representativos.

En el siguiente apartado se muestran los resultados de la cinética siguiendo un orden análogo, es decir, se estructura en relación a los antioxidantes y para cada uno de ellos se muestran los resultados obtenidos con los tres electrodos modificados.

Una vez que se han presentado todos los resultados experimentales se procede a tratarlos para obtener los límites de detección de cada electrodo en cada uno de los antioxidantes.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en las experiencias de la cinética y de las concentraciones se realizan los estudios del límite de detección y el análisis de componentes principales (PCA).

4.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS SENSORES

4.2.1. Introducción

En esta sección del capítulo de resultados se describen los resultados de las isotermas que nos permiten realizar una caracterización estructural de los sensores y que son obtenidas en la preparación de los mismos.

4.2.2. Isotermas

4.2.2.1. Introducción

El estudio de las isotermas nos permite observar el comportamiento de la monocapa, pudiendo distinguir cuando y como tienen lugar las distintas fases de formación de la misma.

Como ya se ha comentado en el capítulo de fundamentos teóricos y tal y como podemos observar en la figura 4.1., inicialmente las moléculas de la sustancia anfifílica a depositar ocupan toda la superficie de la subfase acuosa (fase gas), a medida que se cierran las barreras y se comprimen las moléculas empiezan a aparecer pequeñas interacciones entre las colas hidrofóbicas y empiezan a ordenarse las moléculas (fase líquida), cuando se alcanza una determinada presión tiene lugar un cambio en la pendiente de la recta asociado a un nuevo cambio de fase según el cual del estado de líquido bidimensional se pasa al estado de sólido bidimensional que corresponde a un empaquetamiento compacto y ordenado de las moléculas. Finalmente, podemos ver en la figura 4.1. que si continúan cerrándose las barreras, y por lo tanto aumentando la presión superficial, llega un momento en el cual se produce un colapso molecular, en el cual las moléculas se montan unas encima de otras dando lugar a capas desordenadas [73].

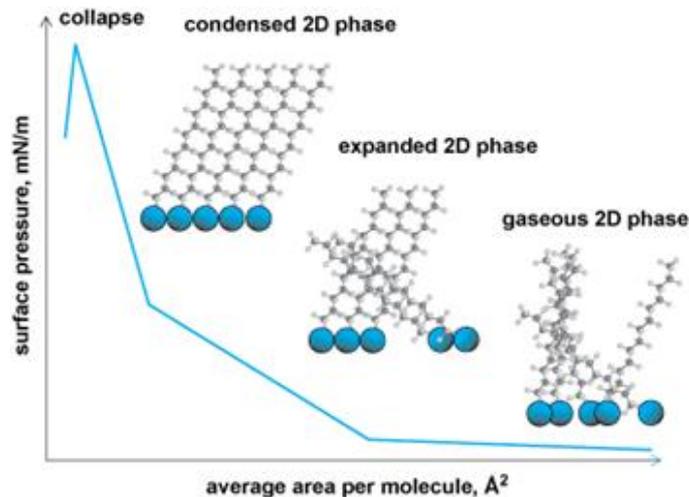


Fig. 4.1. Comportamiento general de las isotermas.

La forma que adoptan las isotermas depende fundamentalmente de dos clases de interacciones: interacciones entre la monocapa de Langmuir y la subfase acuosa, y las interacciones intermoleculares existentes entre las moléculas de la propia monocapa. También depende de las condiciones de experimentación, como por ejemplo, de la temperatura, obteniendo a mayor temperatura un mayor área media por molécula. La fase acuosa que constituye la subfase también influye a la hora de determinar la forma de las mismas. Lógicamente, el tipo de molécula también es un factor que afecta a la forma de las isotermas.

En el presente proyecto, no se trabaja únicamente con moléculas anfifílicas (ácido araquídico), sino que se van a depositar moléculas de bisftalocianina de lutecio y de enzimas (tirosinasa y lacasa).

Las isotermas nos permiten por lo tanto determinar el rango de presiones superficiales óptimo para realizar la deposición sobre el soporte de cristal de ITO. Dicho rango de presiones corresponde a la fase de sólido bidimensional.

Cuando se fija y se estabiliza la presión en ese rango, se forma y se mantiene la monocapa y por sucesivas inmersiones del sustrato o soporte de cristal de ITO se forman las capas de moléculas ordenadas sobre la superficie del mismo.

En la figura 4.2. podemos observar un esquema las posiciones que adoptarían las moléculas depositadas, formando múltiples capas, sobre el soporte de cristal de ITO.

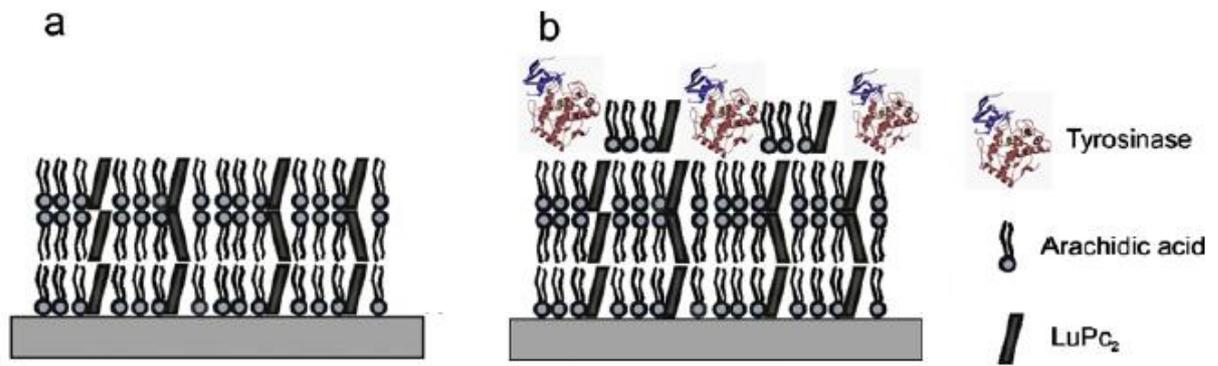


Fig. 4.2. Esquema de los sensores con estructura (a) LuPc2+AA(1:10) y (b) LuPc2+AA(1:10)/Tyr.

A continuación se mostrarán los resultados obtenidos para las isotermas de distintas configuraciones de moléculas, representando los valores de la presión superficial (mN/m) frente al área (A^2) ocupada por molécula.

4.2.2.2. Isoterma ácido araquídico

La isoterma del ácido araquídico sirve como referencia con respecto a la cual comparar. Se ha realizado, al igual que el resto de experiencias, sobre una disolución buffer de fosfato 0,01M (PBS) y NaCl 0,1M, pH=7.

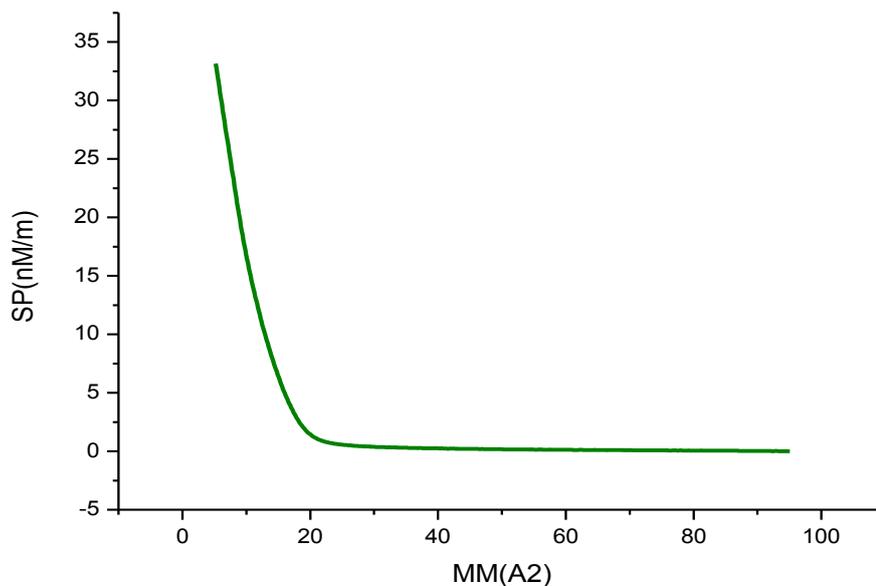


Fig. 4.3. Isoterma correspondiente al ácido araquídico en subfase acuosa de disolución buffer de fosfato 0,01M (PBS) y NaCl 0,1M, pH=7.

En esta isoterma se pueden apreciar las tres fases mencionadas con anterioridad. Inicialmente, las barreras se cierran sin apreciar notables incrementos de la presión superficial mientras que el área por molécula se reduce rápidamente (fase gas). Llega un momento en el cual esa tendencia cambia y se observa una pequeña curva (fase líquida) y finalmente vuelve a producirse una nueva tendencia lineal (fase sólida) en la cual las moléculas están firmemente ordenadas y compactadas y se producen grandes incrementos de la presión superficial sin que se reduzca demasiado el área ocupada por molécula. En esta isoterma no se ha alcanzado la fase de colapso.

4.2.2.3. Isotherma bisftalocianina de lutecio

La figura 4.4. corresponde a la isoterma del electrodo de bisftalocianina de lutecio y ácido araquídico en proporción 1:10 (120 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ftalocianina). Se ha tomado como referencia la masa molecular del ácido araquídico ya que es el que se encuentra en mayor proporción.

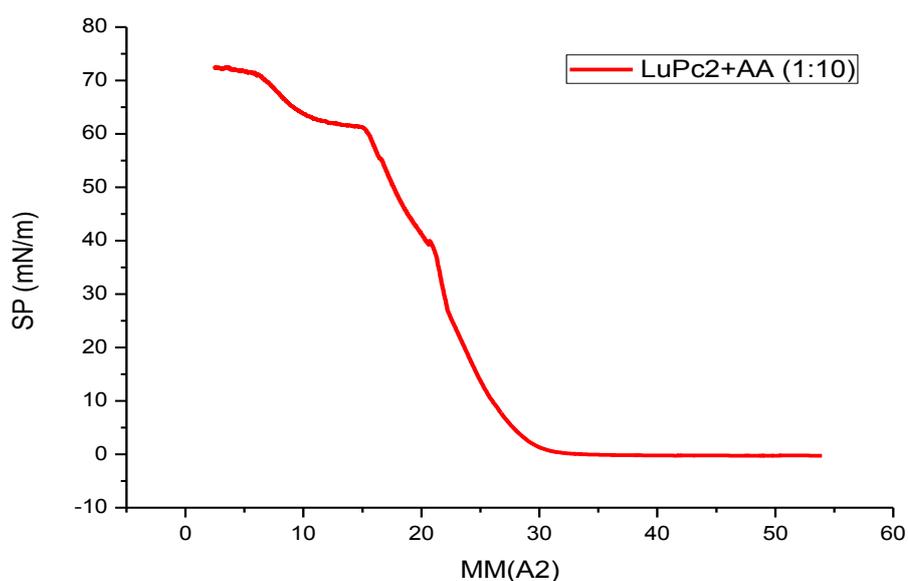


Fig. 4.4. Isotherma correspondiente al LuPc₂+AA (1:10) en subfase acuosa de disolución buffer de fosfato 0,01M (PBS) y NaCl 0,1M, pH=7.

En la figura 4.4. se puede apreciar como la gráfica se ha desplazado hacia la derecha con respecto a la anterior. Esto entra dentro de la lógica, ya que estamos depositando dos sustancias y tomando como referencia la molécula de araquídico, siendo la molécula de ftalocianina de mayor tamaño que la de araquídico. Ya que las moléculas de ftalocianina tienen forma plana, mientras que las de araquídico son lineales y se disponen de forma vertical. Según experiencias previas se ha observado sin embargo

que la molécula de ftalocianina no se dispone de forma totalmente paralela a la superficie, sino que aparece inclinada con un cierto ángulo [74].

En este caso si que se ha alcanzado la fase de colapso. Podemos observar, como a partir de una presión superficial de 60 mN/m la pendiente de la gráfica cae bruscamente volviéndose ésta prácticamente horizontal. Esto indica que, al igual que ocurría en la fase gas, las barreras se cierran sin que haya incremento de presión superficial notable, en relación a la fase sólida, debido a que las moléculas se superponen y se desordenan.

A entre 35 y 40 mN/m de presión se observa una pequeña irregularidad en la gráfica debida probablemente a un ligero movimiento sufrido por la superficie de la fase acuosa de la balanza, la caída de una pequeña impureza o algún otro agente externo que haya podido afectar a la medida de la presión. Ya que, la pendiente antes y después de esta irregularidad es la misma.

Esto demuestra la importancia de mantener perfectamente limpia la balanza y de mantener las condiciones de experimentación lo más estacionarias posible. Ya que incluso una ráfaga de aire puede producir una onda en la superficie de la subfase acuosa y dar lugar a una alteración en las medidas de presión superficial.

A continuación se ilustra como afecta a la isoterma obtenida el tipo de subfase acuosa empleada.

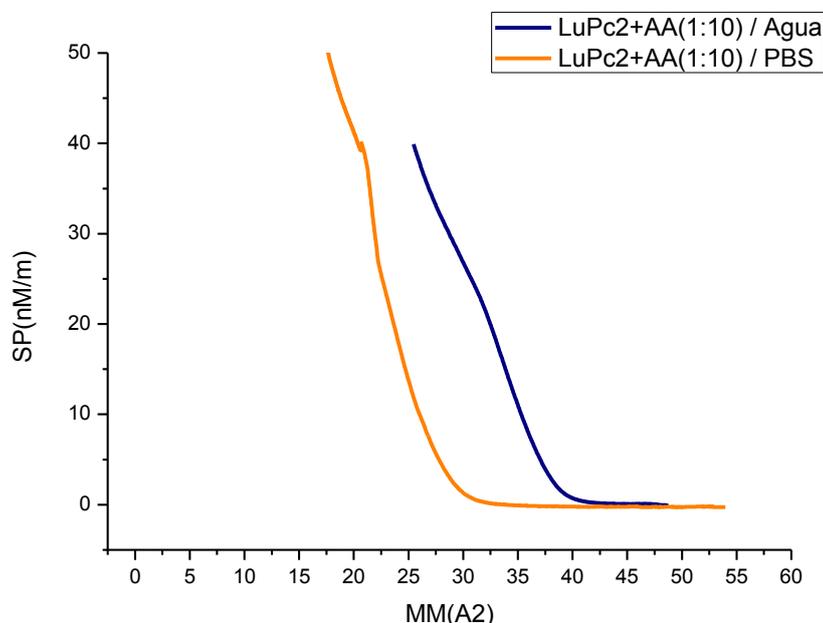


Fig. 4.5. Comparativa de isotermas correspondientes al LuPc₂+AA (1:10) en subfase acuosa de agua ultrapura (azul) y de buffer fosfato 0,01M + NaCl 0,1M (amarillo)

Como se puede apreciar en la figura 4.5. el área por molécula obtenida si se emplea una subfase acuosa de agua ultrapura es mayor que el obtenido para el buffer fosfato.

En la práctica las capas de LuPc₂+AA (1:10) se depositan sobre el sustrato de cristal de ITO empleando subfase acuosa de agua ultrapura. Pero para poder realizar una comparativa lo más fidedigna posible con los resultados obtenidos para las enzimas se han realizado estas experiencias adicionales en buffer fosfato.

4.2.2.4. Isotherma de la tirosinasa

La tirosinasa se deposita empleando como subfase una disolución buffer de fosfato 0,01M y NaCl 0,1M, pH=7, que proporciona el medio adecuado para conservar dicha enzima. Para que se ancle correctamente y pueda acoplarse en la estructura de la monocapa sin que esta se desmorone hay que esperar un cierto tiempo. En el caso de la tirosinasa, el tiempo de espera óptimo es de 30 minutos.

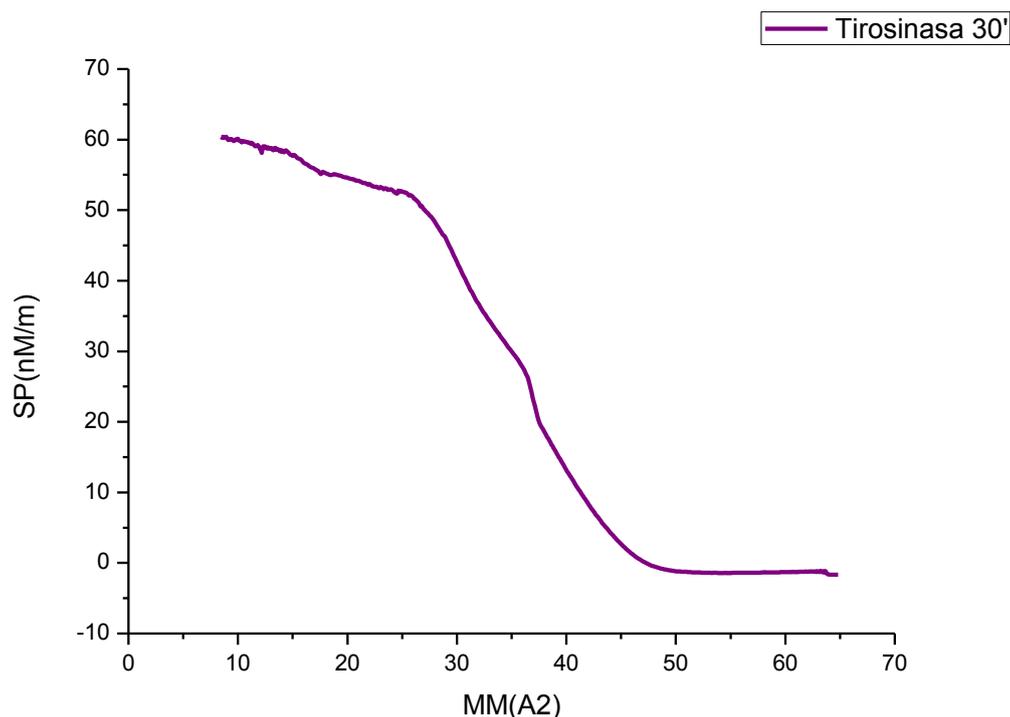


Fig. 4.6. Isotherma correspondiente al LuPc₂+AA (1:10)/Tyr en subfase acuosa de disolución buffer de fosfato 0,01M (PBS) y NaCl 0,1M, pH=7.

Cuando se añade la enzima el área por molécula se incrementa considerablemente con respecto al LuPc₂+AA (1:10), lo cual es indicativo de que la enzima logra anclarse en la estructura ordenada de la monocapa.

4.2.2.5. Isotherma de la lacasa

Al igual que la tirosinasa, la lacasa se deposita empleando como subfase una disolución buffer de fosfato 0,01M y NaCl 0,1M, pH=7, que proporciona el medio adecuado para conservar dicha enzima.

En este caso, el tiempo de espera para que el enzima se ancle correctamente y pueda acoplarse en la estructura de la monocapa sin que esta se desmorone es de 60 minutos.

Este tiempo de espera óptimo, debido a la ausencia de referencias académicas sobre la lacasa ha sido obtenido mediante sucesivas experiencias a distintos tiempos. Inicialmente, se intentó depositar con un tiempo de espera de 30 minutos, pero tal y como se aprecia en la figura 4.7. el área por molécula obtenido es ligeramente superior al del LuPc₂+AA (1:10), lo cual indica que el enzima no se acopla bien a la estructura de la monocapa de Langmuir.

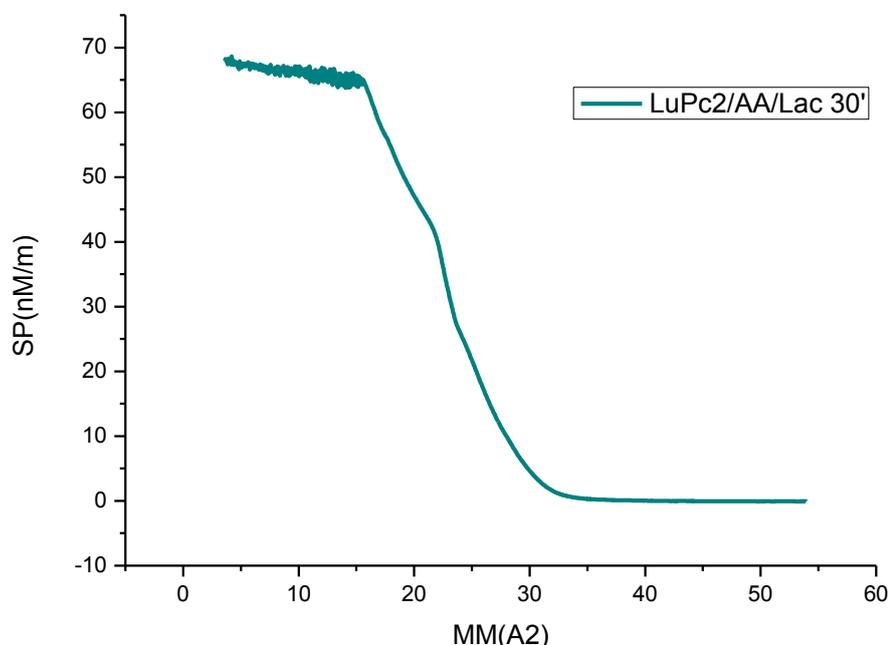


Fig. 4.7. Isotherma correspondiente al LuPc₂+AA (1:10)/Lac en subfase acuosa de disolución buffer de fosfato 0,01M (PBS) y NaCl 0,1M, pH=7.

En la figura 4.8. podemos ver una comparativa entre los resultados obtenidos para un tiempo de espera de 60 minutos, que hemos determinado que es el óptimo, y un tiempo de espera de 30 minutos. Se puede observar que la diferencia entre las áreas por molécula obtenidas para ambas isotermas difieren aproximadamente en 10 \AA^2 si extrapolamos la pendiente de la zona de la gráfica correspondiente a la fase sólida hasta que corte con el eje de abscisas.

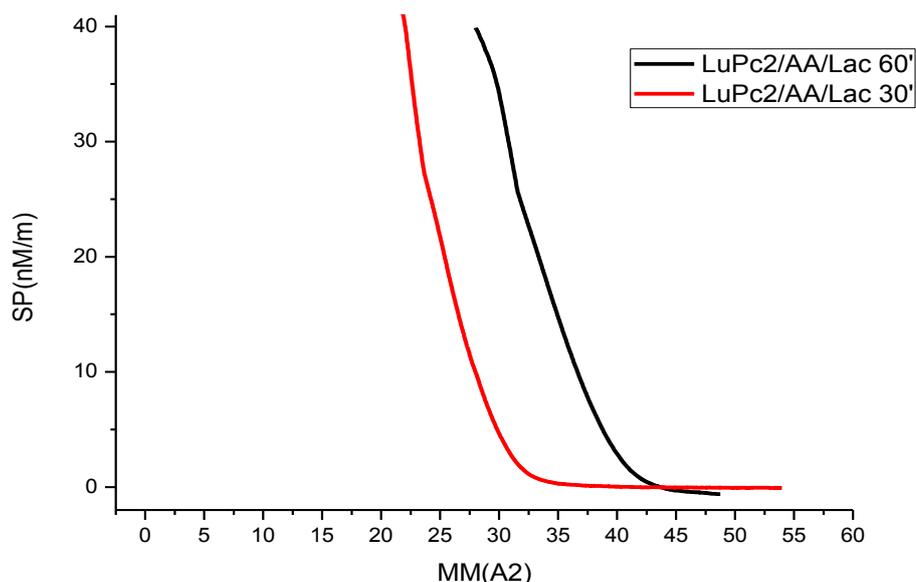


Fig. 4.8. Comparativa de las isotermas de LuPc_2+AA (1:10)/Lac en subfase acuosa de disolución buffer de fosfato 0,01M (PBS) y NaCl 0,1M, pH=7, con tiempos de espera de 30 y 60 minutos.

4.2.2.6. Comparativa isotermas

En el gráfico 4.9. se representa una comparativa de las distintas isotermas que se han presentado a lo largo de este apartado. En él se pueden observar todos los detalles mencionados con anterioridad.

Como base comparativa que muestre el comportamiento de las isotermas empleamos la gráfica del LuPc_2+AA (1:10). Podemos apreciar como la correspondiente al LuPc_2+AA (1:10)/Lac para 30 minutos de tiempo de espera está muy próxima, haciendo indicar que efectivamente la lacasa no se ha anclado en su mayoría a la estructura de la monocapa. La diferencia con respecto a esta última isoterma y respecto a la de LuPc_2+AA (1:10)/Lac para 60 minutos de espera es notable.

También podemos ver como la tirosinasa se ancla a la estructura de la monocapa con mayor facilidad, ya que en la mitad de tiempo que la lacasa se obtiene un área por molécula mayor.

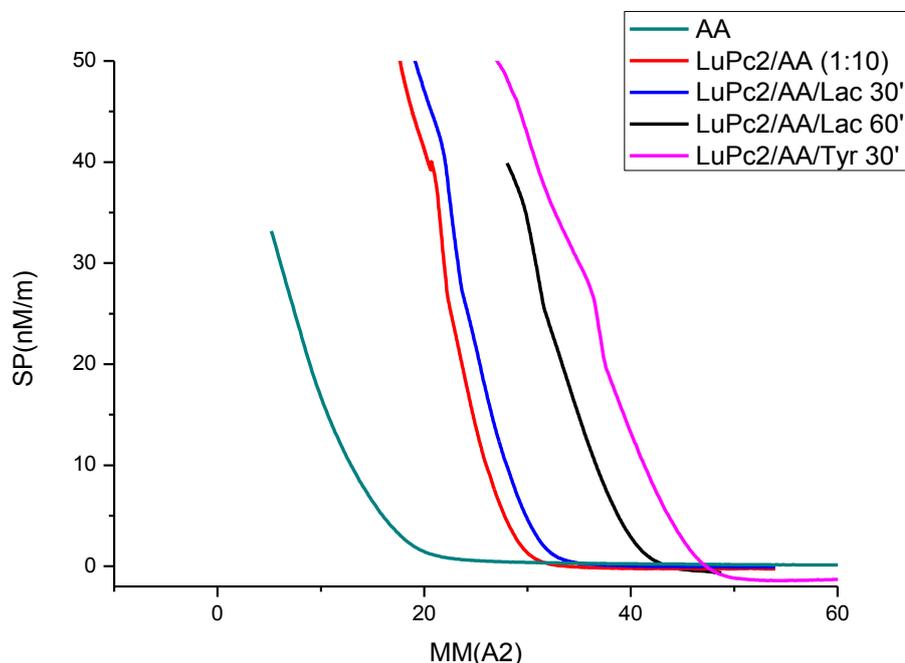


Fig. 4.9. Comparativa de las isoterma.

4.3. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LOS SENSORES

4.3.1. Introducción

Las condiciones de trabajo en las cuales se han realizado los experimentos y las medidas electroquímicas cuyos resultados se exponen en este capítulo, son las siguientes:

- La temperatura de trabajo ha sido de aproximadamente 25°C.
- El electrodo de referencia es un electrodo Ag/AgCl (3M).
- El contraelectrodo es un electrodo de hilo de platino.
- Los electrodos de trabajo son los electrodos modificados, objeto del proyecto, obtenidos a partir de la técnica de Langmuir-Blodgett.

- El electrolito soporte es una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7.
- Las disoluciones de los antioxidantes de estudio se realizan también en buffer fosfato 0,01M, pH=7.
- Los barridos de potencial se realizan desde -0,5 V hasta +0,7 V.
- La velocidad de barrido de potencial es de 100 mV/s para los ensayos de concentraciones y es variable para el ensayo de cinética, en el cual se realizan ciclos desde 25 mV/s hasta 200 mV/s.

4.3.2. Comparativa del comportamiento electroquímico de los biosensores nanoestructurados

4.3.2.1. Introducción

A continuación se van a presentar una serie de resultados que muestran el comportamiento de los distintos electrodos modificados que se han construido. Para ello se ha realizado una voltametría cíclica realizando barridos de potencial entre -0,5V y 0,7V, con una velocidad de 100 mV/s y realizando 5 ciclos.

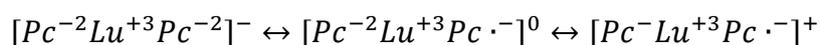
De esos 5 ciclos se han tomado para las representaciones gráficas los valores del quinto y último ciclo por ser los valores más estables y representativos.

Se ha probado cada electrodo empleando como electrolito soporte una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7.

4.3.2.2. Electrodo de bisftalocianina de lutecio

El electrodo con el que se ha realizado esta experiencia es un electrodo modificado de cristal de ITO sobre el cual se han depositado 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc₂) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10.

En la figura 4.10. se pueden apreciar dos picos que corresponden a los procesos de oxidación y reducción que tienen lugar en la bisftalocianina de lutecio.



El segundo pico no aparece completo ya que el barrido de potenciales se lleva hasta 0,7 V y este pico alcanza su máximo a potenciales superiores. Dicho pico corresponde con la oxidación del anillo Lu(III)Pc₂/Lu(III)Pc₂⁺ de la molécula de ftalocianina [75, 76].

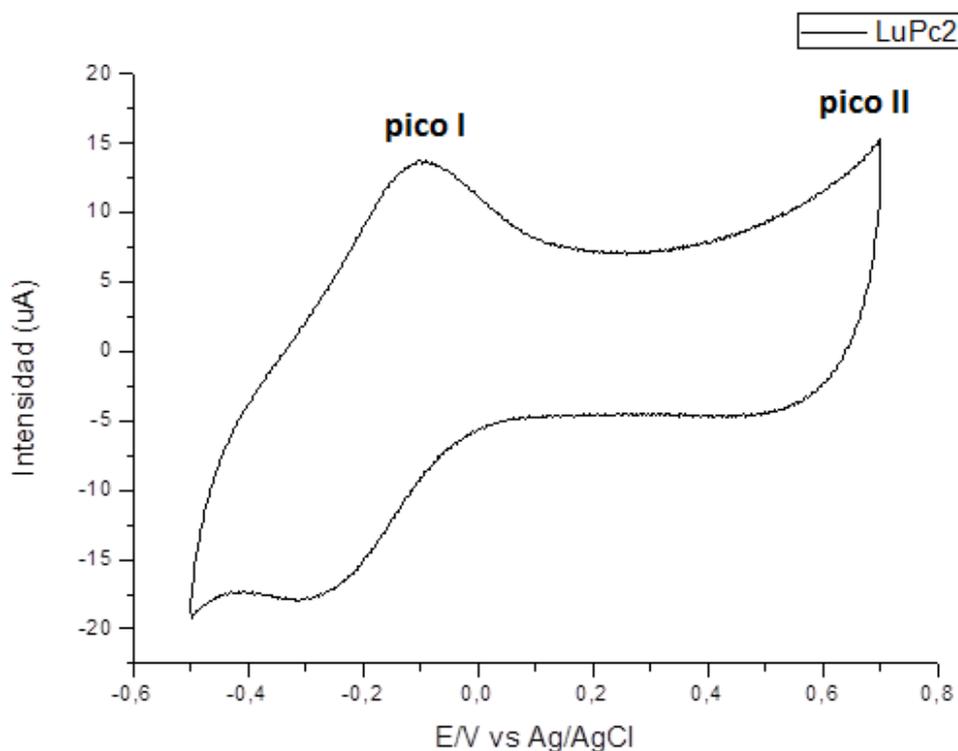


Fig 4.10. Respuesta voltamétrica de un electrodo de cristal de ITO sobre el cual se ha depositado LuPc_2+AA (1:10), en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7 (PBS).

El primer pico si aparece completo se corresponde con la reducción de un electrón del anillo $\text{Lu(III)Pc}_2/\text{Lu(III)Pc}_2^-$ de la molécula de ftalocianina [75, 76]. Este pico aparece a un potencial de -0,091V y su pico catódico asociado aparece a un potencial de -0,318V, lo cual hace una diferencia entre ambos de 0,227V. Según esto se puede concluir que existe un comportamiento irreversible ya que las diferencias entre las ondas catódica y anódica es muy grande. Un proceso reversible, con el número de electrones que se ven involucrados en la reacción redox igual a la unidad, la diferencia teórica de potencial que se podría esperar es de 0,059V a 25°C.

A pesar de que no está completo el pico II, si que se puede observar que no existe un ratio unitario entre los valores de la magnitud de la intensidad de corriente de dicho pico anódico y su pico catódico asociado. Esto no hace más que corroborar la irreversibilidad del proceso.

Aunque los potenciales a los cuales tienen lugar los picos no son iguales debido a que se emplea un electrolito soporte distinto, el comportamiento se ajusta a lo observado en resultados publicados previamente [73, 77, 78].

4.3.2.3. Electrodo de enzima tirosinasa

Este electrodo se ha construido a partir de la deposición sobre cristal de ITO mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc2) y ácido araquídico (AA) en proporción (1:10) y 9 capas de tirosinasa (Tyr).

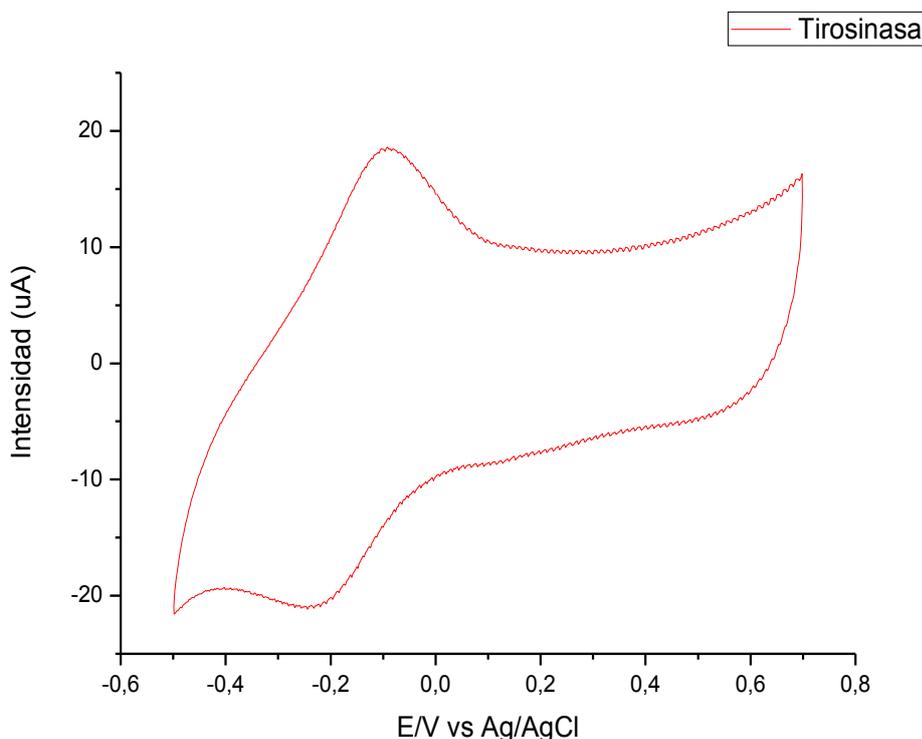


Fig 4.11. Respuesta voltamétrica de un electrodo de cristal de ITO sobre el cual se ha depositado LuPc2+AA(1:10)/Tyr, en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7 (PBS).

Como se puede apreciar en la figura 4.11. la respuesta obtenida presenta la misma forma que para el electrodo sobre el que se ha depositado exclusivamente bisftalocianina de lutecio.

Si nos fijamos en la escala de las intensidades de corriente podemos apreciar como las magnitudes de los picos son mayores en el caso del electrodo del enzima respecto del de bisftalocianina de lutecio. Además los picos aparecen ligeramente desplazados en sus potenciales hacia la derecha, hacia potenciales más positivos.

Este hecho se apreciará con mayor detalle en la figura 4.13. de comparativa de electrodos

4.3.2.4. Electrodo de enzima lacasa

Este electrodo se ha construido a partir de la deposición sobre cristal de ITO mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y 9 capas del enzima lacasa (Lac)

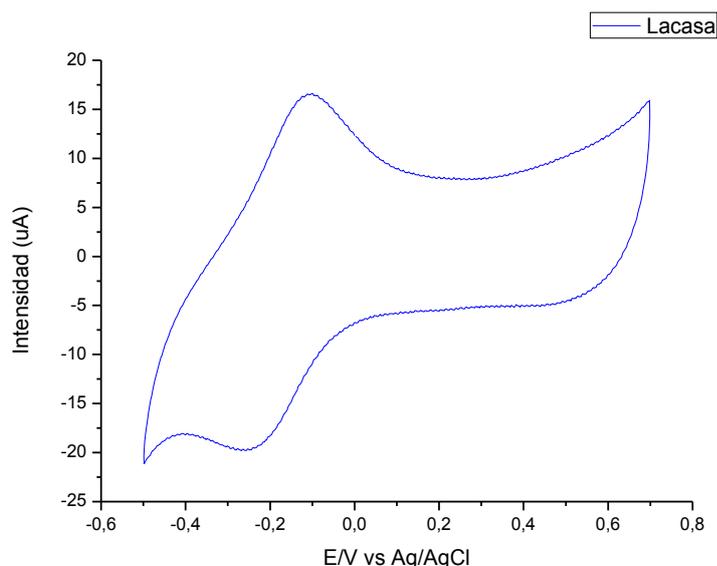


Fig 4.12. Respuesta voltamétrica de un electrodo de cristal de ITO sobre el cual se ha depositado LuPc2+AA(1:10)/Lac, en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7 (PBS).

Al igual que para los dos voltamogramas anteriores la respuesta muestra los dos picos anódicos asociados a los procesos redox siendo el primero el correspondiente a la reducción y el segundo, que aparece cortado, a la oxidación de la ftalocianina. También se pueden observar los picos catódicos asociados a estos, aunque el pico catódico asociado al segundo pico, al pico de oxidación, apenas se distingue como un pequeño abultamiento a 0,55 V.

Todo esto coincide con lo observado para los dos electrodos modificados anteriores.

4.3.2.5. Comparativa entre electrodos

En la figura 4.13. se representa una comparativa de las tres gráficas expuestas anteriormente, referidas a las voltametrías cíclicas correspondientes a los tres tipos de electrodos modificados empleados a lo largo del presente proyecto.

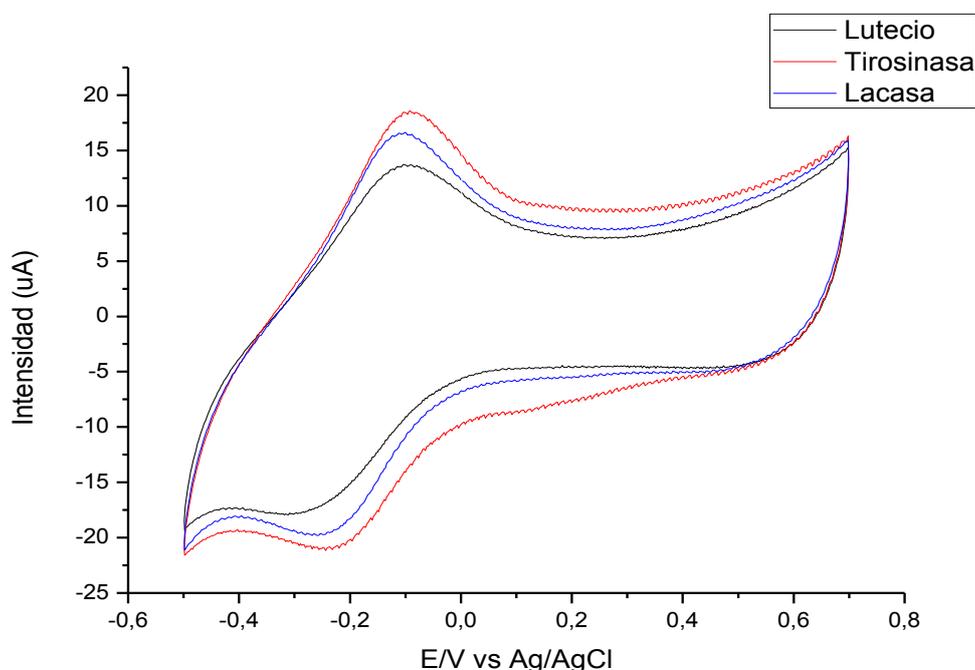


Fig 4.13. Comparativa de las respuestas voltamétricas de los electrodos de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$, $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ y $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$, en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7 (PBS).

Como se puede apreciar, los electrodos sobre los que se ha depositado enzima poseen una mayor corriente de fondo que el electrodo que únicamente tiene depositada bisftalocianina de lutecio. A pesar de que existe un incremento en la corriente de fondo, los picos de intensidad son mucho más notables para estos electrodos de enzima.

Cabe reseñar además que dentro de las enzimas tanto la corriente de fondo como los picos son más notables en el caso de la tirosinasa que en el de la lacasa.

También se puede observar que existe un ligero desplazamiento de potenciales de los electrodos de enzima con respecto al de bisftalocianina de lutecio, este desplazamiento de potenciales se hace patente especialmente en el pico catódico.

En el caso del electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ el potencial del máximo de intensidad de corriente del pico catódico asociado al proceso de reducción es de -0,318 V. El del

electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Tyr es de -0,244 V y el del electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Lac es de -0,268 V.

Según estos valores efectivamente los picos de los electrodos enzimáticos están desplazados hacia potenciales más positivos, siendo esto especialmente notable en el electrodo de tirosinasa.

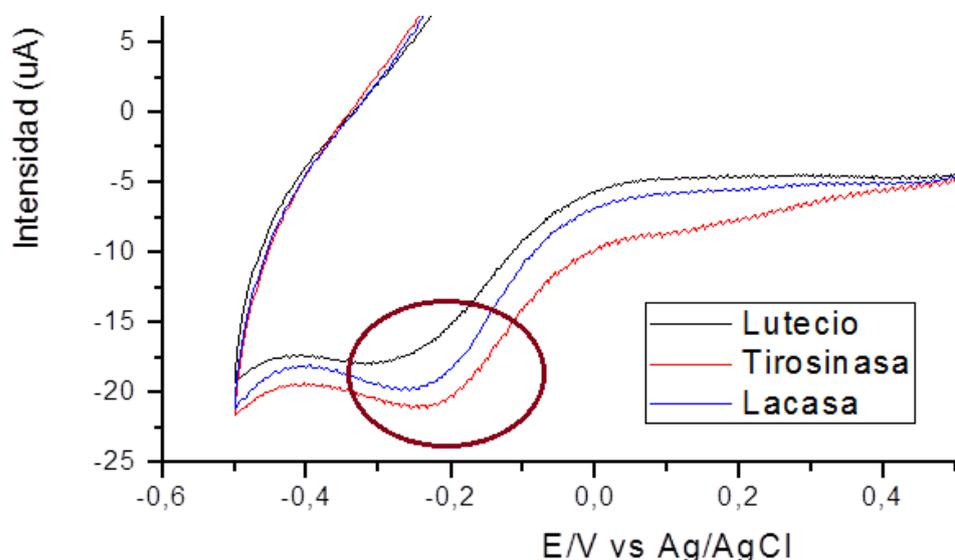


Fig. 4.14. Detalle del pico catódico asociado al pico de reducción del voltamograma comparativo.

En la figura 4.14. se puede apreciar con mayor detalle, señalado dentro del círculo, este desplazamiento de potenciales mencionado anteriormente.

4.3.3. Respuesta de los biosensores nanoestructurados frente a antioxidantes

4.3.3.1. Introducción

En este apartado se describirán los resultados obtenidos para los análisis de antioxidantes realizados con los distintos electrodos modificados constituidos en el presente proyecto, entre los que se encuentran los sensores electroquímicos de bisftalocianina de lutecio y ácido araquídico, y los biosensores enzimáticos.

Este apartado se divide en dos estudios: estudio de concentraciones y estudio cinético. En el estudio de concentraciones se analiza la respuesta de los sensores frente a distintas concentraciones de antioxidante. Mientras que en el estudio cinético se

analiza la respuesta de los sensores frente a distintas velocidades de barrido de potencial para una concentración dada de antioxidante.

Intercalado entre ambos estudios, después del estudio de concentraciones, se analizan los límites de detección.

4.3.3.2. Estudio de concentraciones

4.3.3.2.1. Introducción

El objetivo de estas experiencias es el de observar el comportamiento de los electrodos modificados construidos frente a concentraciones crecientes de los distintos antioxidantes.

Para ello, se realizan sucesivas adiciones de antioxidante a la celda electroquímica y se realizan varios ciclos con cada adición hasta obtener una señal más o menos estable.

Se parte de una disolución madre de antioxidantes de una concentración 10^{-3} M. Teniendo en cuenta además que el volumen de la celda electroquímica es de 50 ml de disolución buffer de fosfato 0,01 M, se obtiene la siguiente tabla que relaciona los volúmenes añadidos con la concentración final de antioxidante presente en la celda:

Volumen total añadido (μL)	Concentración final (M)
200	$4,0 \cdot 10^{-6}$
500	$1,0 \cdot 10^{-5}$
1000	$2,0 \cdot 10^{-5}$
1500	$3,0 \cdot 10^{-5}$
2000	$4,0 \cdot 10^{-5}$
2500	$5,0 \cdot 10^{-5}$
3000	$6,0 \cdot 10^{-5}$
3500	$7,0 \cdot 10^{-5}$
4500	$9,0 \cdot 10^{-5}$
5500	$1,1 \cdot 10^{-4}$
6500	$1,3 \cdot 10^{-4}$
7500	$1,5 \cdot 10^{-4}$

Tabla 4.1. Relación de concentraciones de antioxidante en la celda en relación al volumen de antioxidante 10^{-3} M añadido.

Las gráficas que presentan a continuación están realizadas a partir de los datos obtenidos del último ciclo de cada adición, ya que se considera que los datos del

último ciclo son los más representativos por estar la señal del electrodo ya estabilizada.

4.3.3.2.2. Monofenoles

A) Ácido vanílico

- Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2)

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

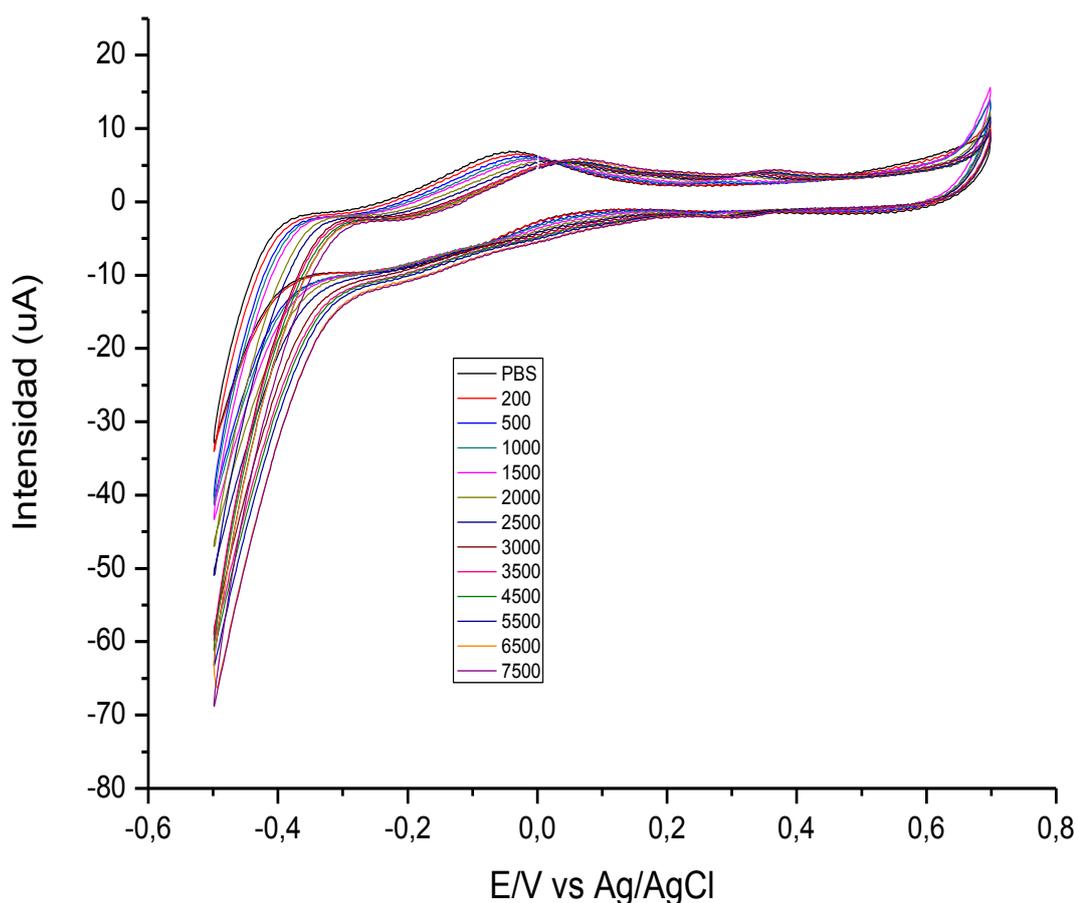


Fig. 4.15. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de ácido vanílico 10^{-3}M en buffer fosfato. disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$.

Se pueden observar con claridad dos picos de intensidad que corresponden a los procesos redox de la ftalocianina. No se puede apreciar el pico que corresponde a la oxidación electroquímica del ácido vanílico ya que esta tiene lugar a potenciales mayores que para otros fenoles y por lo tanto se sale del rango de potenciales de estudio.

- **Electrodo modificado de tirosinasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO. Los resultados obtenidos al realizar la voltametría cíclica se muestran en la figura 4.16.

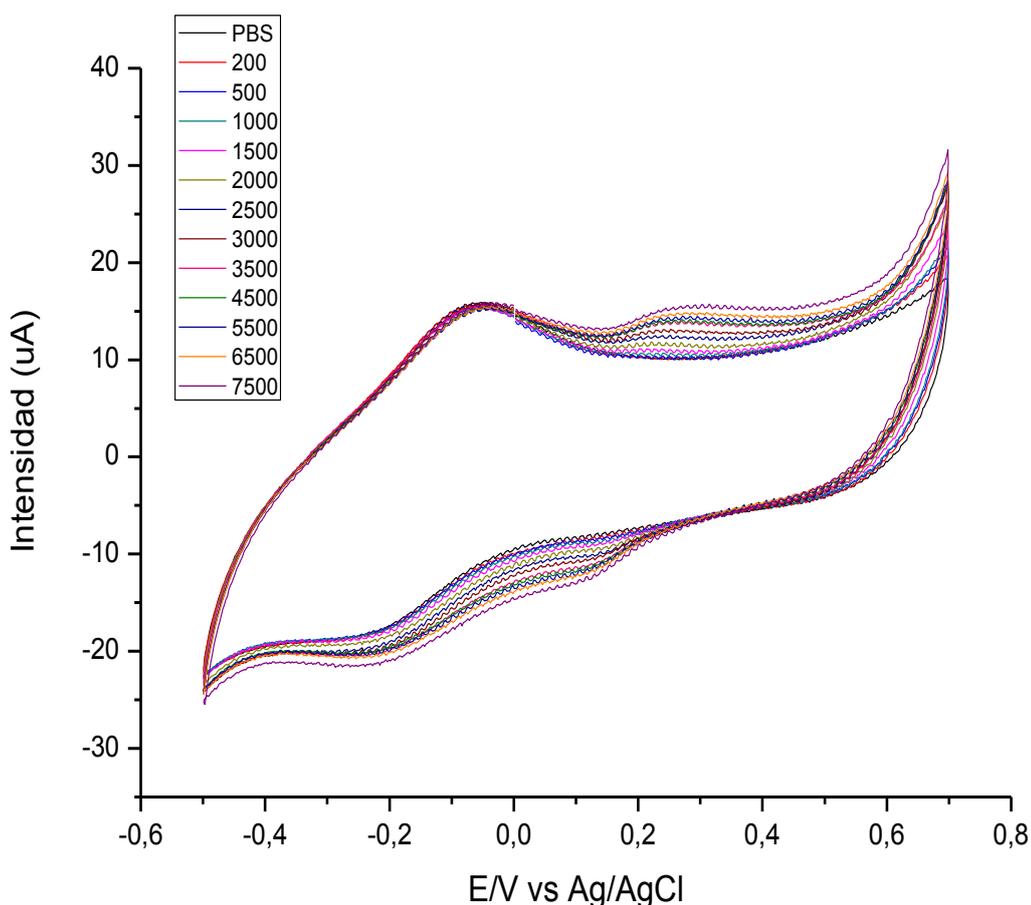


Fig. 4.16. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con distintas adiciones de disolución de ácido vanílico 10^{-3}M en buffer fosfato.

En la figura 4.16. se pueden observar hasta cinco picos de intensidad y habría, de tratarse de un proceso reversible, un sexto pico que teóricamente estaría situado donde abultamiento que se produce en la parte catódica de la curva a un potencial de 0,55V, el cual como se puede observar no existe (pico IV en la figura 4.17.). De tratarse de un proceso reversible ese pico correspondería al pico catódico asociado al anódico que se corta a un potencial 0,7V (pico III figura 4.17.).

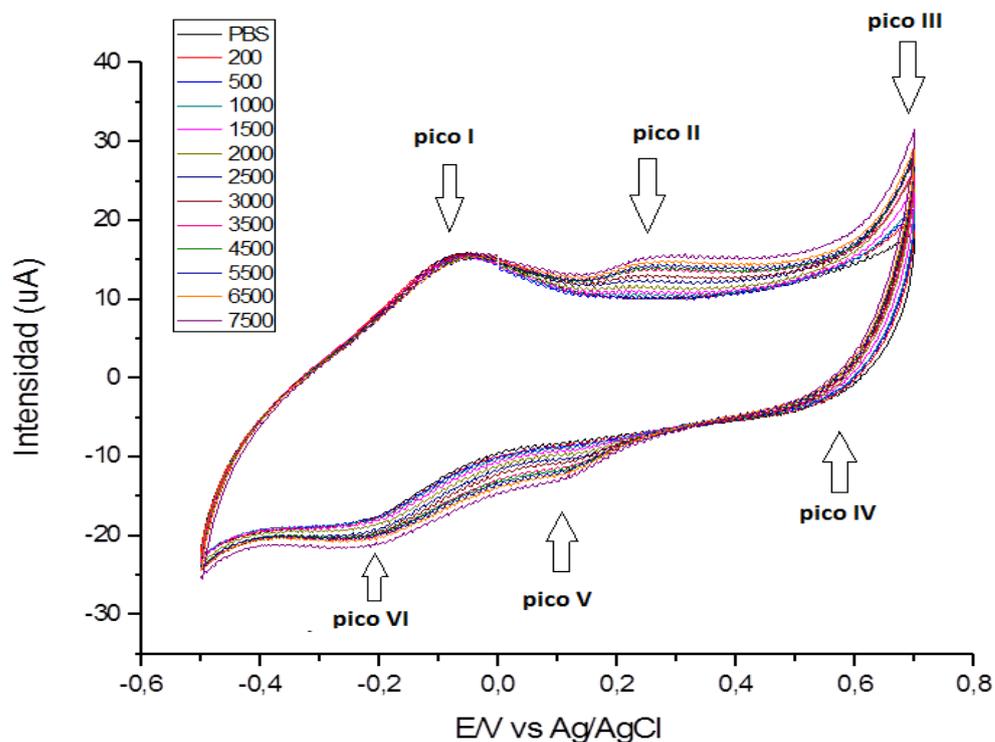


Fig. 4.17. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido vanílico, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Tyr.

Antes de nada conviene señalar los picos de interés para nuestro estudio, para ello en primer lugar hay que identificar los procesos a los que se asocia cada uno de ellos.

Los picos I y VI, y el pico III son los pares de picos asociados a los procesos de reducción y oxidación, respectivamente, de los anillos Lu(III)Pc₂/Lu(III)Pc₂⁻ y Lu(III)Pc₂/Lu(III)Pc₂⁺ de la molécula de ftalocianina [75].

Sin embargo, como se puede apreciar, el pico III aumenta su intensidad a medida que aumenta la concentración añadida de ácido vanílico, lo cual indica que en ese pico se solapan los procesos de oxidación del anillo Lu(III)Pc₂/Lu(III)Pc₂⁺ de la molécula de ftalocianina y del ácido vanílico.

Luego se pueden observar en la figura 4.17. dos picos, los picos II y V, que no están asociados a los procesos redox propios de la ftalocianina y que corresponden a

procesos enzimáticos que resultan de la interacción con la enzima. El pico II es un pico enzimático anódico y el pico V es un pico enzimático catódico.

Con lo cual, tendremos 3 picos de interés para nuestro estudio, estos picos de interés son los asociados a los procesos redox del antioxidante, en este caso del ácido vanílico. Dichos picos son los picos II, III y V.

▪ Electrodo modificado de lacasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

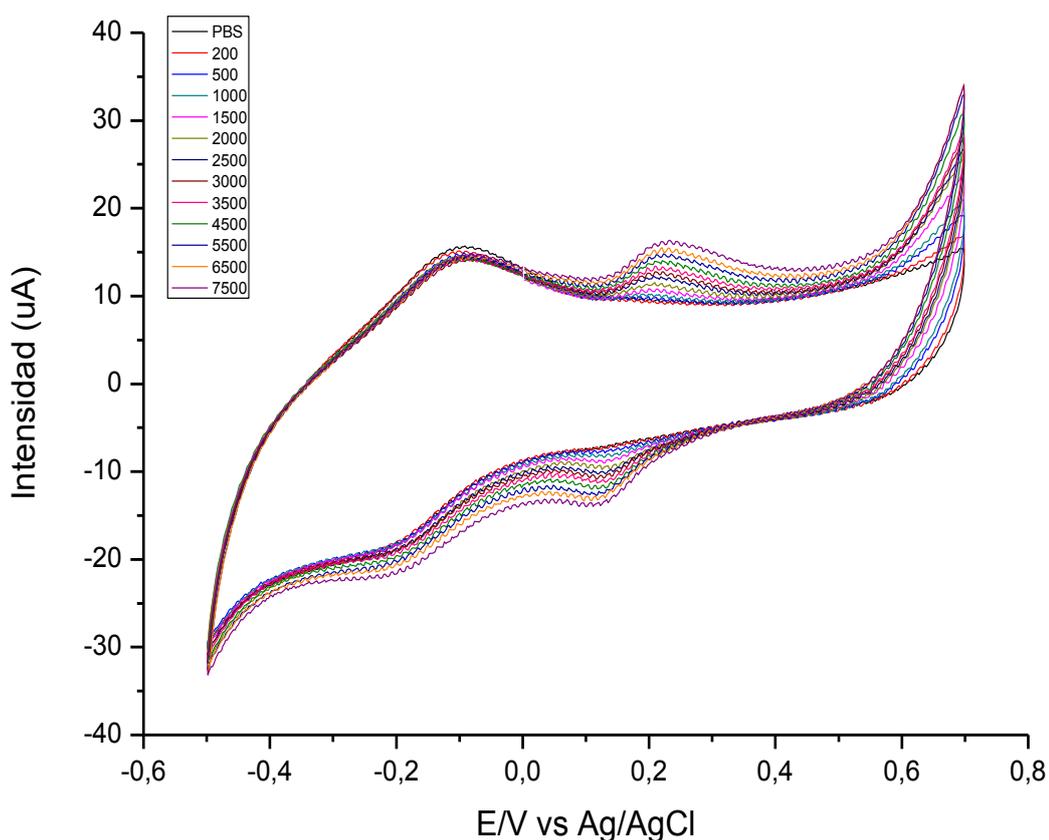


Fig. 4.18. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc_2 +AA(1:10)/Lac en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con distintas adiciones de disolución de ácido vanílico 10^{-3}M en buffer fosfato.

El voltamograma presenta la misma forma que el obtenido para la tirosinasa. Pudiendo distinguir los picos enzimáticos II y IV con mayor claridad.

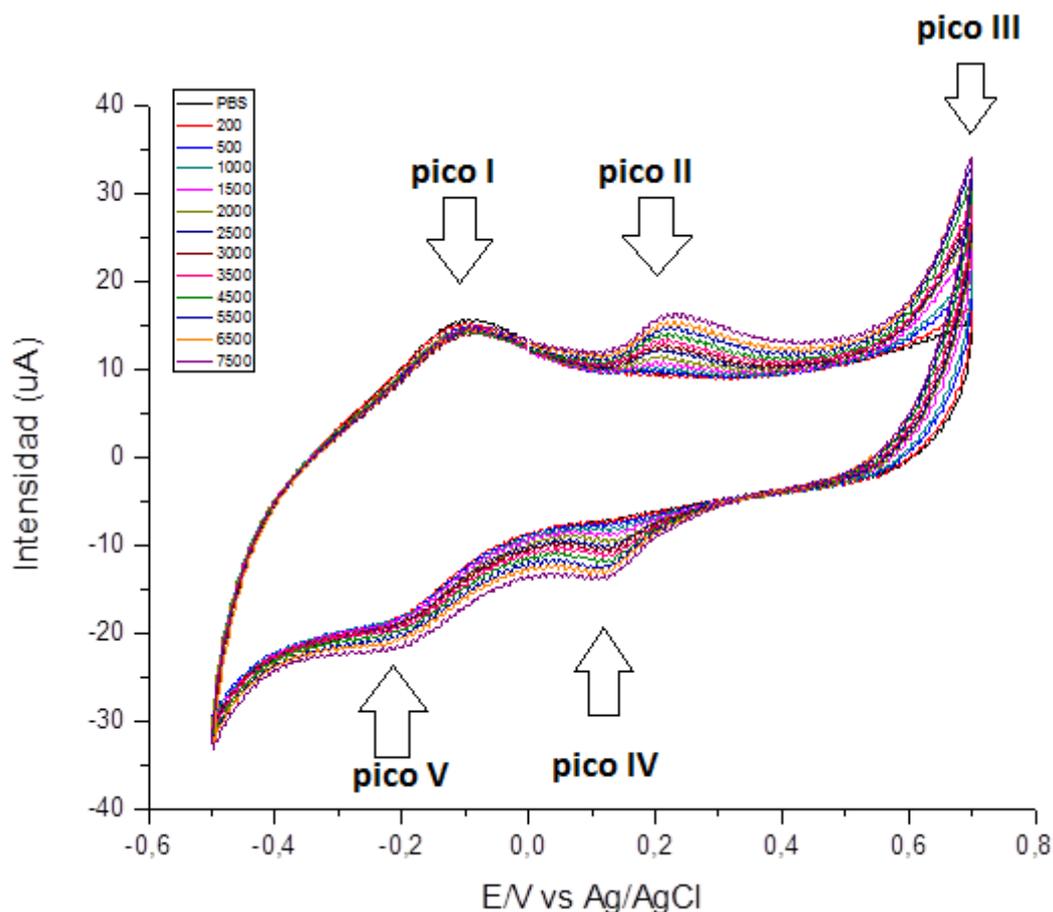


Fig. 4.19. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido vanílico, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Lac.

- **Comparativa entre los distintos electrodos**

En la figura 4.20. se aprecian las diferencias mencionadas anteriormente con mayor claridad. Se puede observar como las diferencias en la señal de fondo son notables entre los electrodos con enzima y el electrodo sin enzima, siendo en los primeros mucho mayor obteniendo un ciclo mucho más ancho.

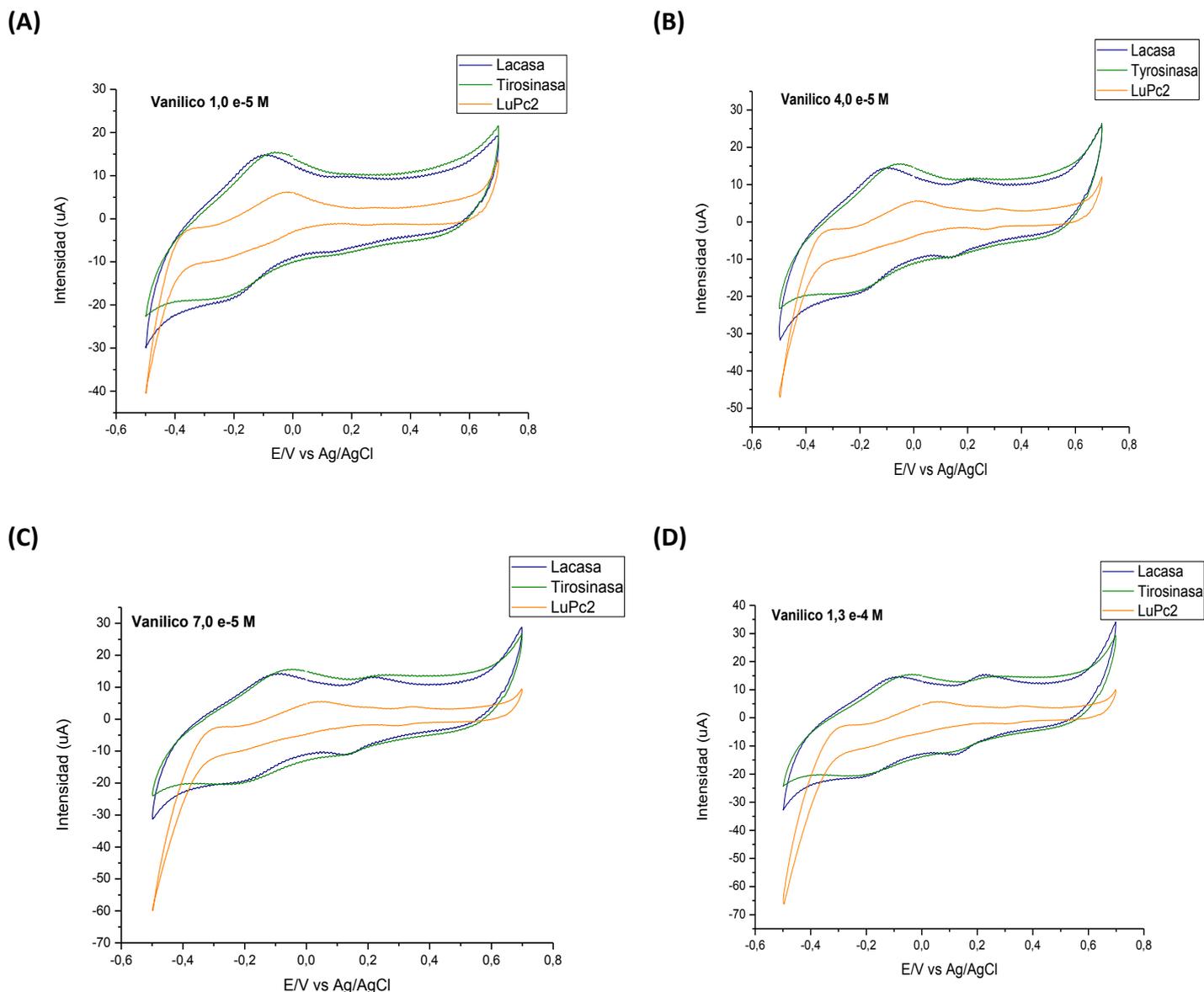


Fig. 4.20. Comparativa de los resultados obtenidos al realizar voltametrías cíclicas con electrodos de: $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$, $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ y $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$, frente a ácido vanílico de concentraciones: (A) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, (B) $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, (C) $7,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ y (D) $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Las señales que proporcionan los electrodos de tirosinasa y de lacasa son bastante similares. Las diferencias que se pueden apreciar es que en el caso de la tirosinasa la señal es ligeramente mayor que para la lacasa, pero también se puede observar como los picos enzimáticos están más atenuados que en la lacasa.

4.3.3.2.3. Difenoles

B) Ácido Cafeico

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

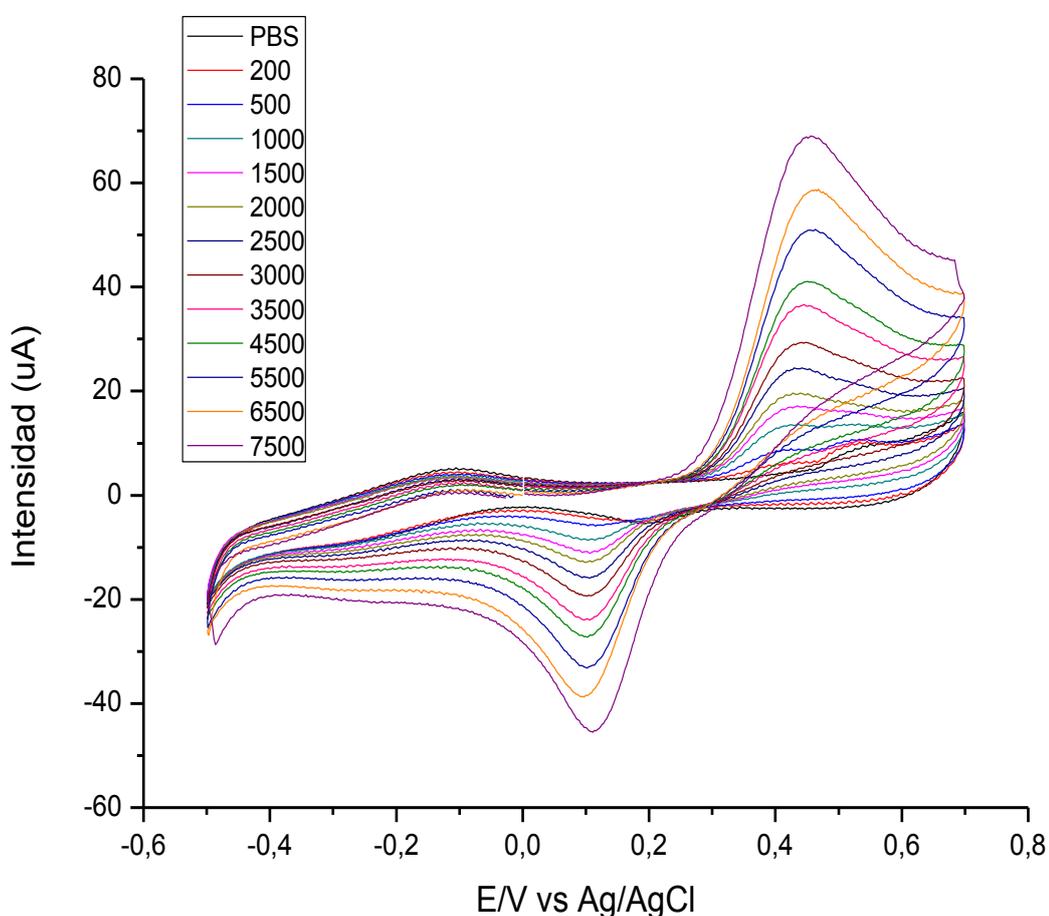


Fig. 4.21. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de ácido cafeico 10^{-3}M en buffer fosfato.

En la figura 4.21. se pueden observar varios picos de intensidad. A un potencial de $-0,16\text{V}$ se encuentra, aunque se aprecie débilmente, el pico asociado a la reducción del anillo de ftalocianina (pico I, figura 4.22.). Su pico complementario (pico VI, figura 4.22.) también se aprecia muy débilmente.

A +0,45V se puede observar el pico que corresponde a la oxidación electroquímica del ácido cafeico (pico II, figura 4.22.) [79]. El pico complementario se observa a +0,12V (pico V, figura 4.22.).

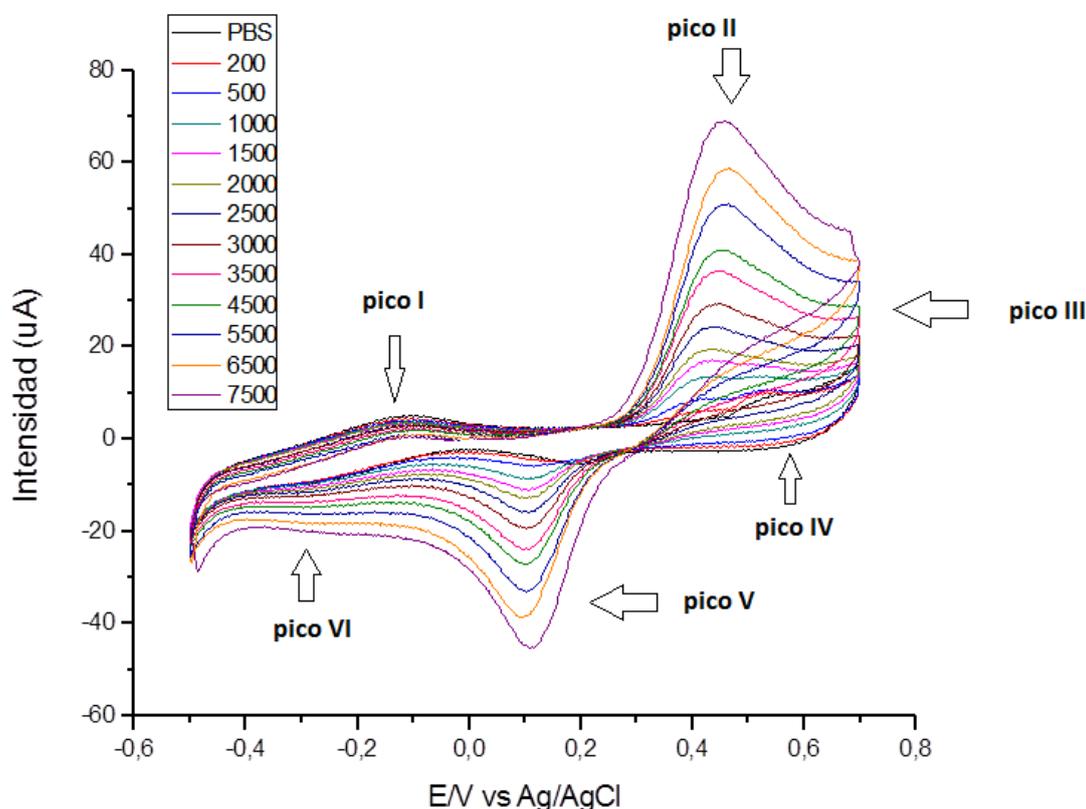


Fig. 4.22. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido cafeico, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10).

Por último podemos destacar también la presencia de el pico cortado que corresponde a la oxidación del anillo de ftalocianina a un potencial de +0,7V (pico III, figura 4.22.) y su pico complementario, apenas notable en pequeño abultamiento que se produce a +0,6V (pico IV).

Como se puede observar en estas imágenes, cuanto más antioxidante se añade, mayor intensidad se obtiene para todos los picos. Siendo especialmente notable, obviamente, en aquellos relacionados con los procesos redox del ácido cafeico (picos II y V). Se pasa de una intensidad de corriente de aproximadamente 10 μA para concentraciones bajas (200 μL añadidos, $4,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) hasta una intensidad de 80 μA para concentraciones más altas (7500 μL añadidos, $1,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$).

- **Electrodo modificado de tirosinasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

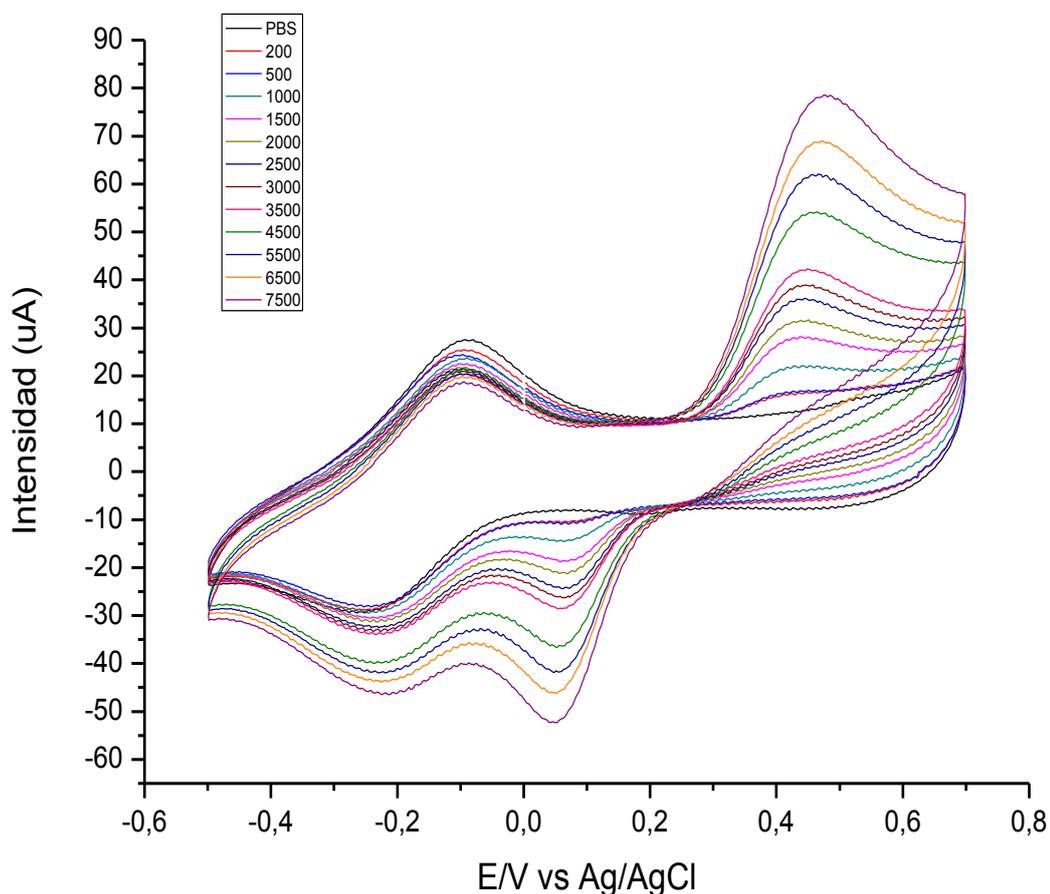


Fig. 4.23. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de ácido cafeico 10^{-3}M en buffer fosfato.

En la figura 4.23. además de apreciar los mismos picos que observábamos para el electrodo de LuPc_2+AA (1:10), se puede observar que el pico VI (figura 4.24.) aparece mucho más marcado que en el caso de dicho electrodo.

Todo hace indicar que este pico catódico (pico VI, figura 4.24.) situado a un potencial de $-0,25\text{V}$ es el pico complementario, del pico I, figura 4.24., que es el pico asociado a la reducción del anillo $\text{Lu(III)Pc}_2/\text{Lu(III)Pc}_2^-$ de molécula de ftalocianina.

El pico V, figura 4.24., se obtiene debido a la reducción de la o-quinona a ácido cafeico. Esto corresponde en un proceso según el cual se produce una oxidación enzimática de

dos electrones del ácido cafeico que da lugar a la quinona la cual es reducida de nuevo para dar ácido cafeico a un potencial aplicado bajo [71, 80].

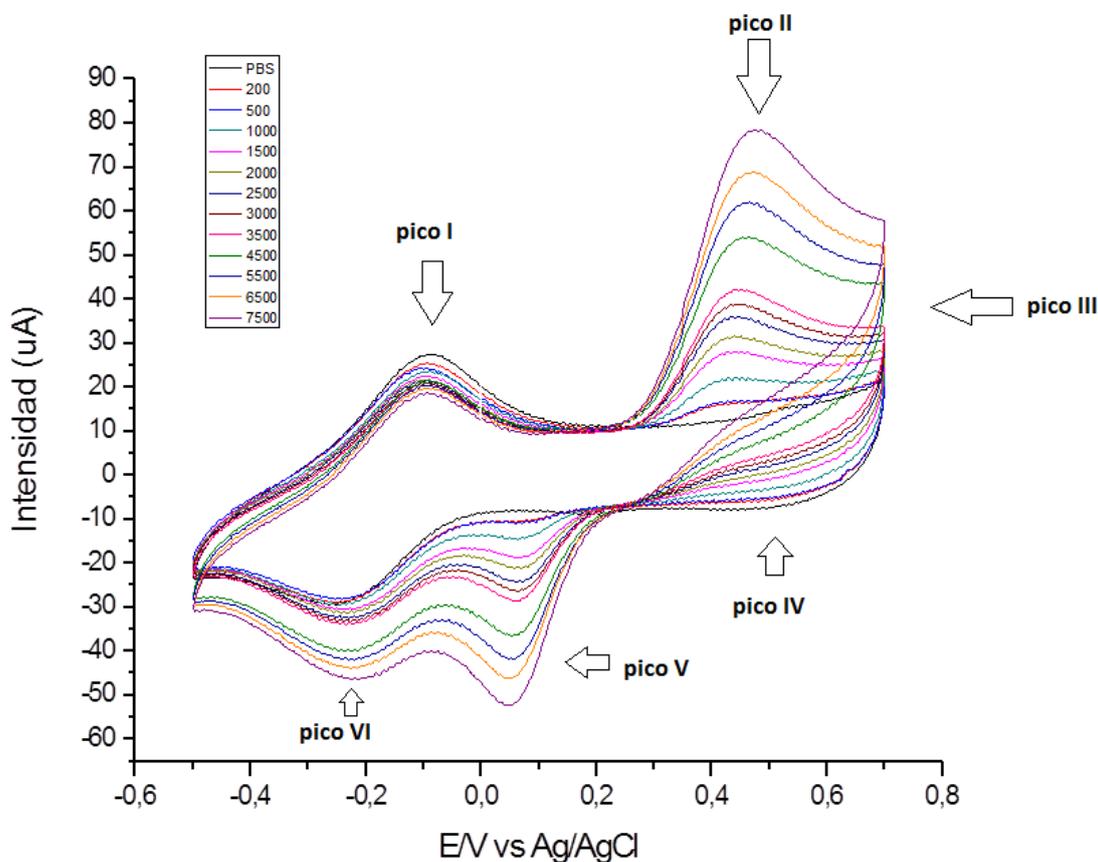


Fig. 4.24. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido cafeico, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Tyr.

Otro pico de interés, es el pico II, figura 4.24., que corresponde al proceso de oxidación electroquímica del ácido cafeico. Dicho pico se produce a un potencial de +0,45V.

Si se compara con la figura 4.23 se puede observar como la magnitud de los picos de intensidad de corriente de los sensores en los cuales se ha depositado enzima es mayor que en los electrodos en los que tan solo se ha depositado LuPc₂+AA(1:10).

También el hecho de que haya depositado junto con la enzima LuPc₂, hace que la intensidad de los picos enzimáticos y de los picos de los procesos electroquímicos sean más pronunciados, es decir, tengan una mayor intensidad. Esto es debido a que el LuPc₂ actúa como un mediador electrónico. Además el LuPc₂ tiene un efecto electrocatalítico, es decir, desplaza la posición de los picos electroquímicos hacia valores de potenciales menores.

El acoplamiento de la oxidación del ácido cafeico facilitada por el LuPc_2 y de la reducción de la o-quinona da lugar a un ciclo de reacción el cual resulta en una amplificación de la señal de respuesta en forma de mayor intensidad de corriente en los picos. Esto aparece representado en la figura 4.25.

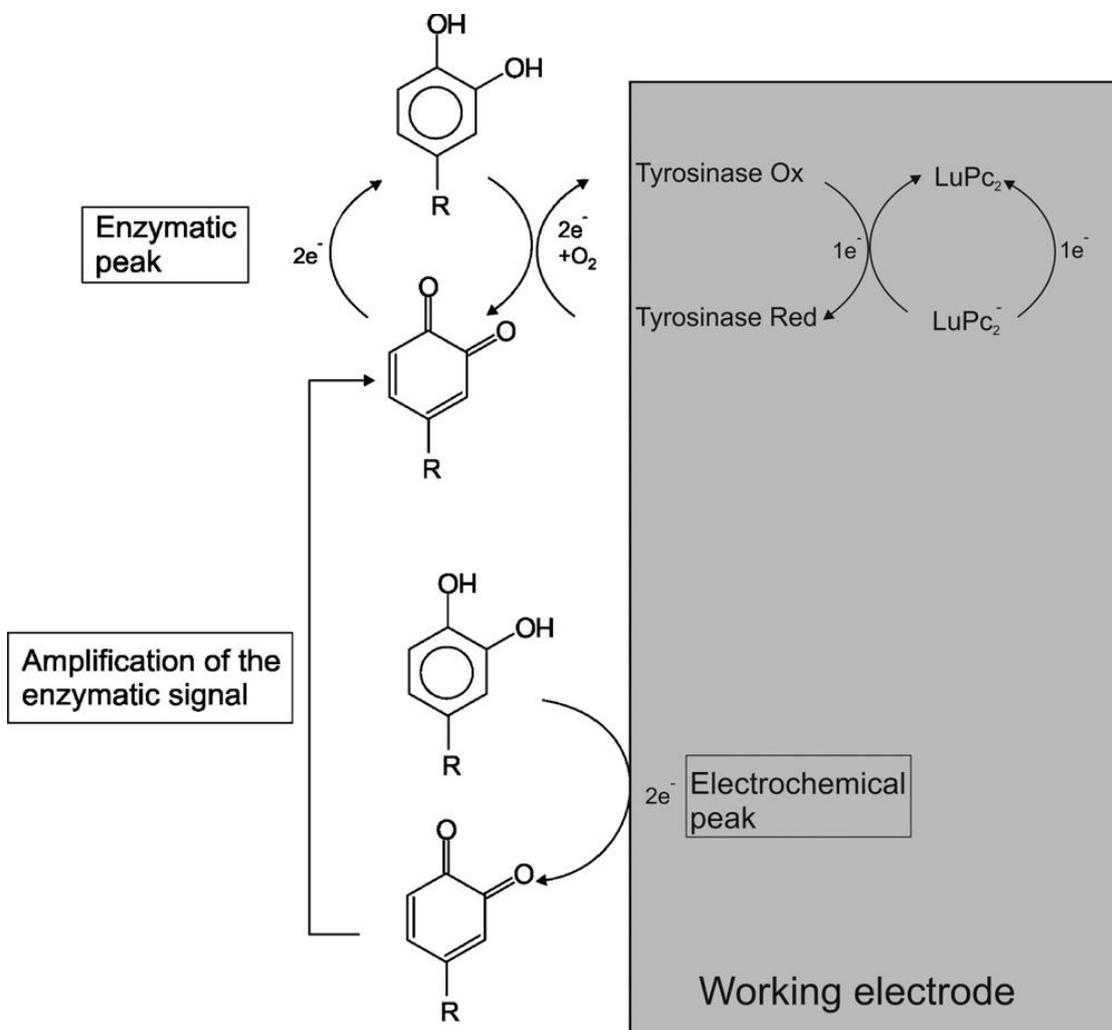


Fig 4.25. Esquema de las reacciones que tienen lugar en el electrodo de trabajo.

▪ Electrodo modificado de lacasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

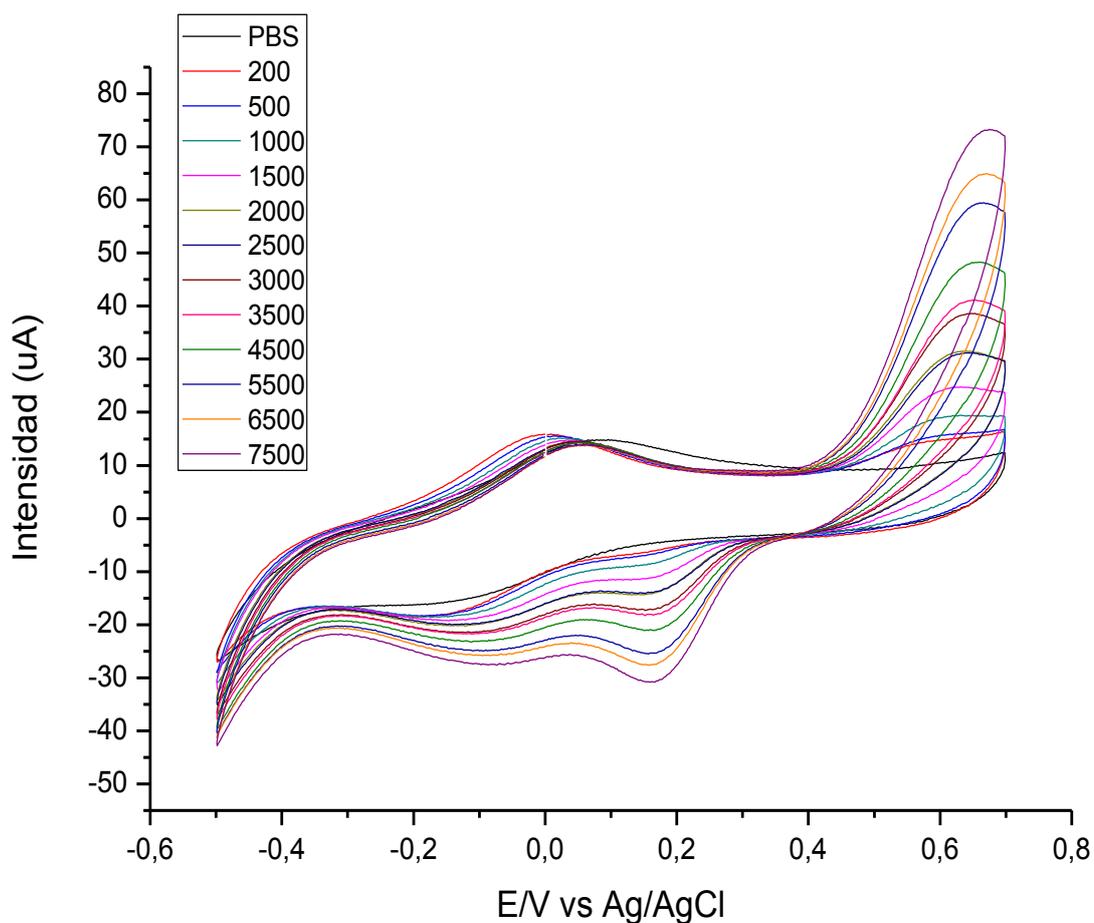


Fig. 4.26. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2 + \text{AA}(1:10)/\text{Lac}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de ácido cafeico 10^{-3}M en buffer fosfato.

La respuesta voltamétrica obtenida para el electrodo del enzima lacasa es totalmente diferente del obtenido en los dos casos anteriores. Se puede observar como el efecto electrocatalítico del LuPc_2 es menor para esta enzima y este antioxidante en particular, ya que los picos de intensidad, asociados tanto a procesos enzimáticos como a procesos electroquímicos, aparecen desplazados hacia potenciales mayores.

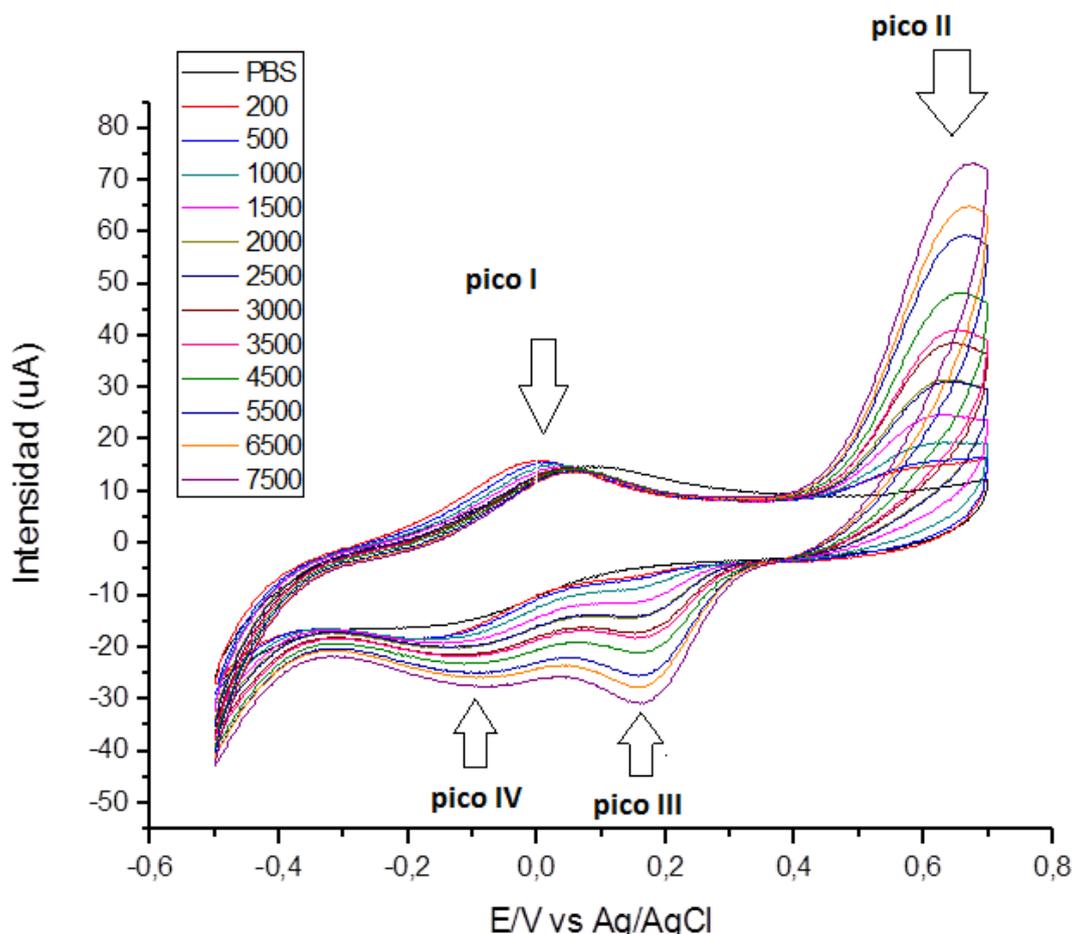


Fig. 4.27. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido cafeico, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2 + \text{AA}(1:10)/\text{Lac}$.

El pico I, figura 4.27., corresponde a la reducción del anillo $\text{Lu(III)Pc}_2/\text{Lu(III)Pc}_2^-$ de molécula de ftalocianina, siendo el pico IV su pico complementario.

El pico II, que aparece incompleto aunque si se pueden observar los máximos, corresponde al proceso de oxidación electroquímica del ácido cafeico y aparece a un potencial de +0,65V, lo cual supone un desplazamiento hacia potenciales mayores considerable frente a los +0,45V obtenidos para la tirosinasa.

El pico de intensidad de corriente que corresponde al proceso de reducción de la o-quinona a ácido cafeico es el pico III.

▪ Comparativa entre los distintos electrodos

En la figura 4.28. se pueden observar con mayor detalle las diferencias existentes entre los tres tipos de electrodos modificados.

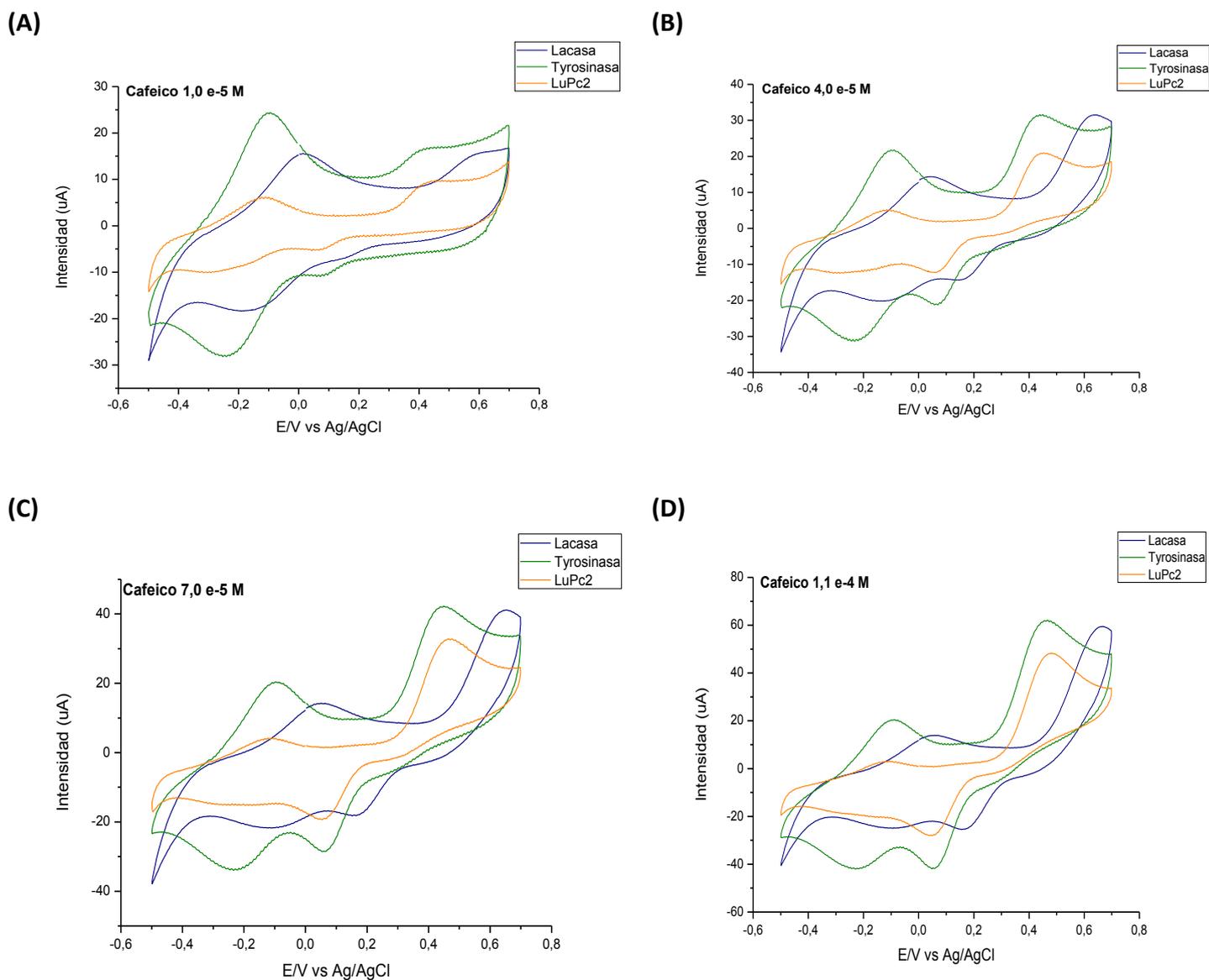


Fig. 4.28. Comparativa de los resultados obtenidos al realizar voltametrías cíclicas con electrodos de: $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$, $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ y $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$, frente a ácido cafeico de concentraciones: (A) $1 \times 10^{-5} \text{M}$, (B) $4,0 \times 10^{-5} \text{M}$, (C) $7,0 \times 10^{-5} \text{M}$ y (D) $1,1 \times 10^{-4} \text{M}$.

La intensidad de los picos es notablemente mayor para los electrodos de enzima respecto del que no tiene depositada enzima.

Al igual que ocurría con el ácido vanílico, se puede observar como las diferencias en la señal de fondo son notables entre los electrodos con enzima y el electrodo sin enzima, siendo en los primeros mucho mayor obteniendo un ciclo mucho más ancho. Además, esta señal de fondo es mayor en el caso de la tirosinasa que en el de la lacasa.

Una circunstancia que conviene reseñar, es que los potenciales de los picos de intensidad son aproximadamente coincidentes para el electrodo de tirosinasa y para el electrodo sin enzima. Sin embargo, picos de intensidad obtenidos para el electrodo de lacasa están desplazados hacia potenciales mayores.

C) Catecol

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

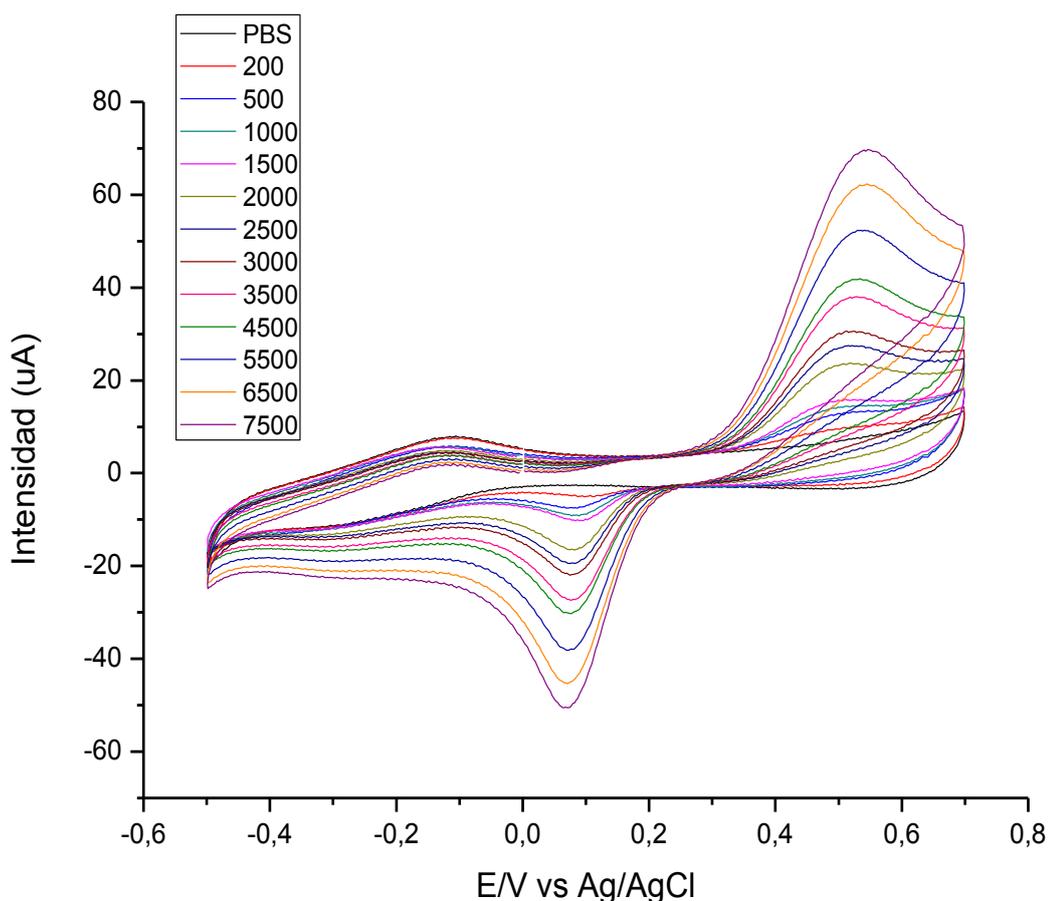


Fig. 4.29. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de catecol 10^{-3}M en buffer fosfato.

Se pueden observar tres picos definidos, los picos I y III (figura 4.30.) corresponden a los procesos redox de la ftalocianina. Mientras que el pico II corresponde al proceso de oxidación electroquímica del catecol y tiene lugar a un potencial de +0,55V.

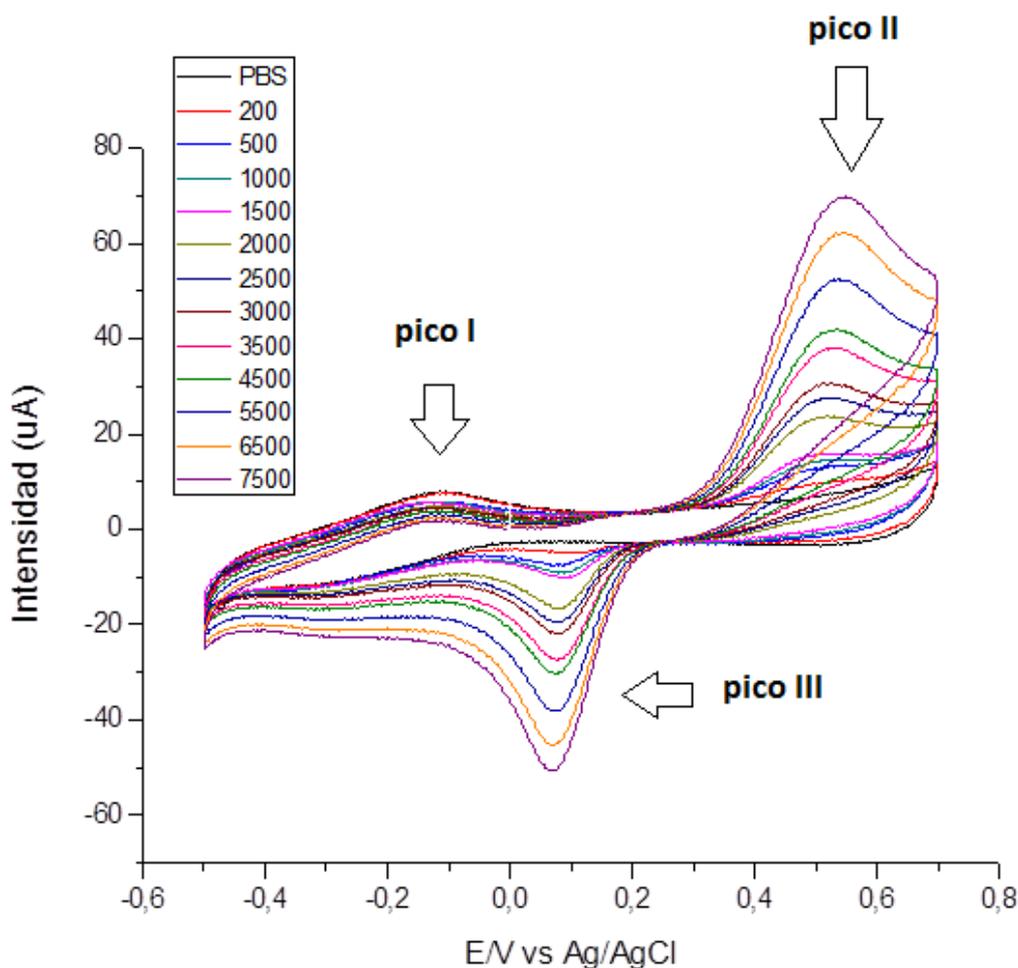


Fig. 4.30. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido cafeico, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10).

Al igual que para el otro difenol estudiado, el ácido cafeico, el incremento de la intensidad en los picos I y III conforme aumenta la concentración de antioxidante es muy notable. Mucho más notable que el que se produce en el ácido vanílico.

Para el catecol también se realizó una experiencia adicional tomando un rango de potenciales que va desde -0,5 V hasta +0,5 V en lugar de llegar hasta +0,7 V.

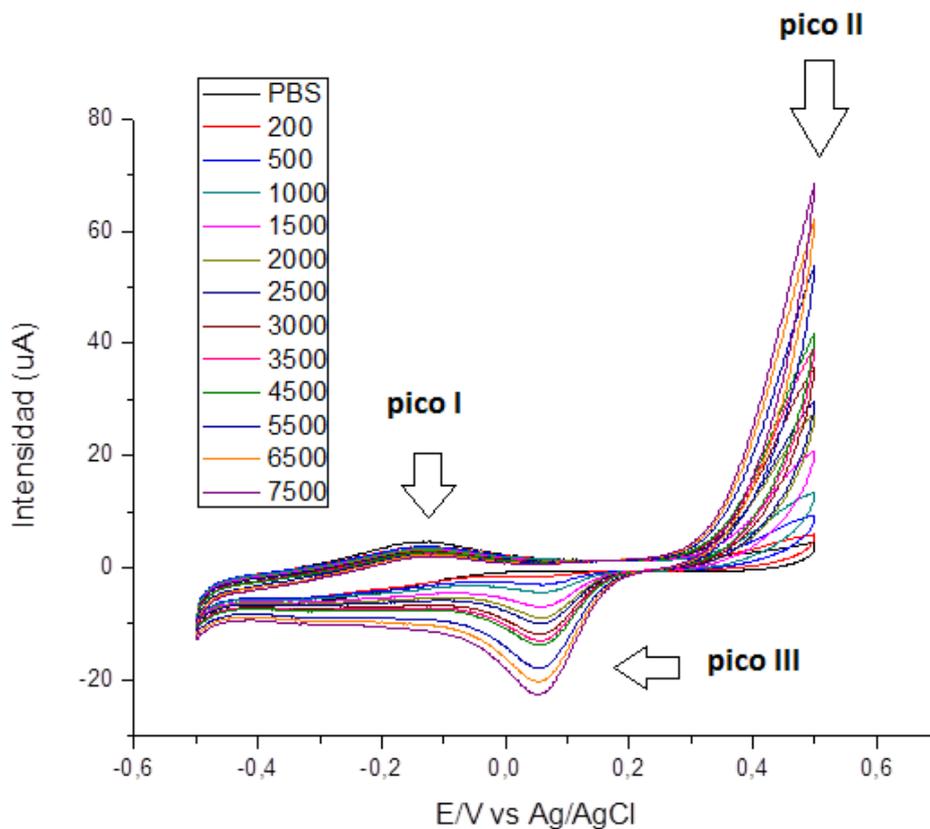


Fig. 4.31. Respuesta voltamétrica para un barrido entre $-0,5V$ y $+0,5V$.

La figura 4.31. sirve para ilustrar la influencia que tienen los límites del potencial empleados en el barrido sobre la respuesta voltamétrica obtenida. En primer lugar, la primera diferencia que se observa entre los voltamogramas 4.30. y 4.31. es que en este último el pico anódico de intensidad de corriente electroquímico, pico II, no aparece y se solapa con la oxidación de la ftalocianina. Las magnitudes de las intensidades de corriente obtenidas para ese pico son similares a las obtenidas en el gráfico 4.30. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el pico II del gráfico 4.31. están solapados dos procesos electroquímicos. Esto se demuestra cuando al observar el pico III, pico catódico enzimático, vemos que en el gráfico 4.30. la intensidad alcanza magnitudes de hasta $-50 \mu A$, mientras que en la figura 4.31. apenas llega hasta $-25 \mu A$.

- **Electrodo modificado de tirosinasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de

lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

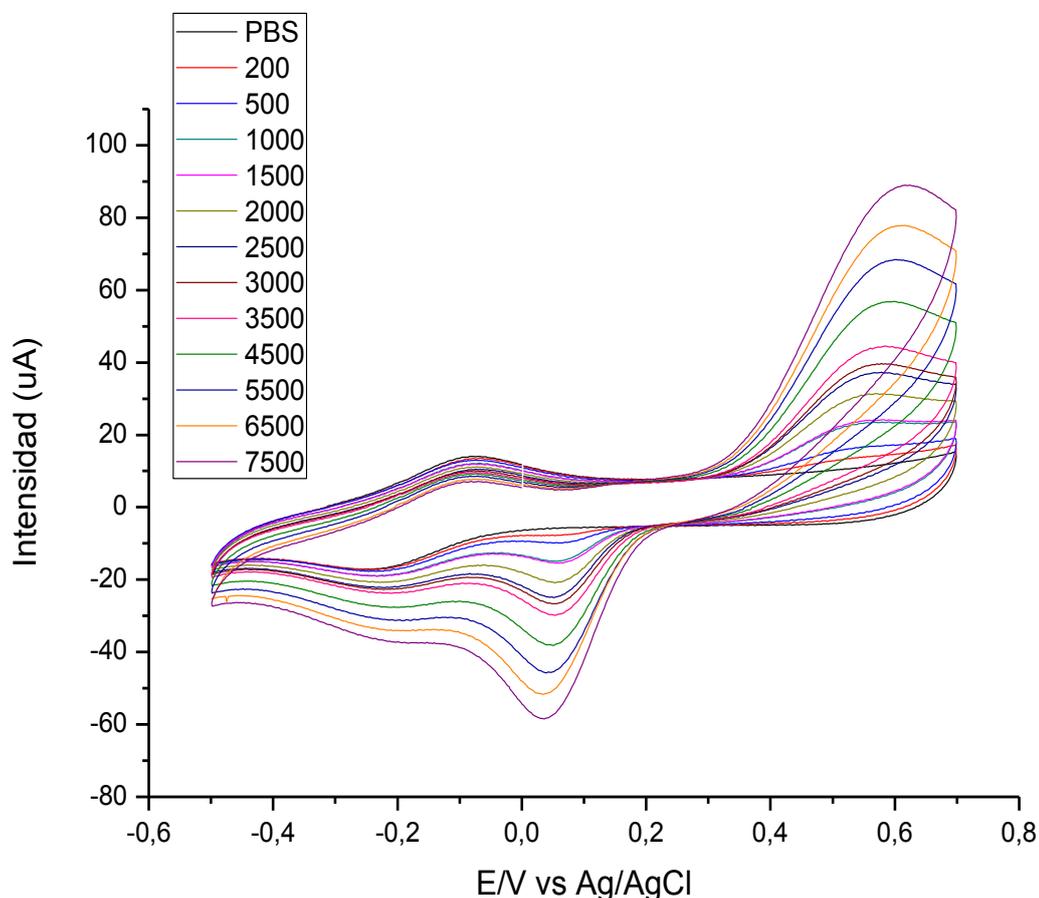


Fig. 4.32. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de catecol 10^{-3}M en buffer fosfato.

De nuevo trabajamos con un sensor de fenoles enzimático, en el cual se combina la tirosinasa (enzima) con un transductor electroquímico que permite detectar las quinonas electroactivas que se producen en la reacción enzimática. Estas quinonas se reducen a potenciales bajos de tal forma que el sustrato se regenera, desde un punto de vista electroquímico, dando lugar a una amplificación de la señal considerable [81].

Efectivamente, vemos como las intensidades de los picos se han incrementado considerablemente con respecto al sensor sin enzima. Con lo cual podemos concluir que para el catecol la deposición de la enzima da lugar a una mejora de la sensibilidad.

Hay que destacar la función de la bisftalocianina de lutecio como mediador redox, llevando a cabo la reacción de reducción de la o-quinona, lo cual permite que la o-quinona sea más fácilmente convertible a catecol, contribuyendo a la amplificación de la señal enzimática/electroquímica. Con esto se logra evitar que la reducción de las quinonas sea incompleta debido a su alta inestabilidad en agua y a que sus radicales intermedios formados en las reacciones tanto electroquímicas, como enzimáticas, pueden polimerizar con facilidad a compuestos poliaromáticos. Estos compuestos poliaromáticos pueden inactivar la enzima y ensuciar la superficie del electrodo [82].

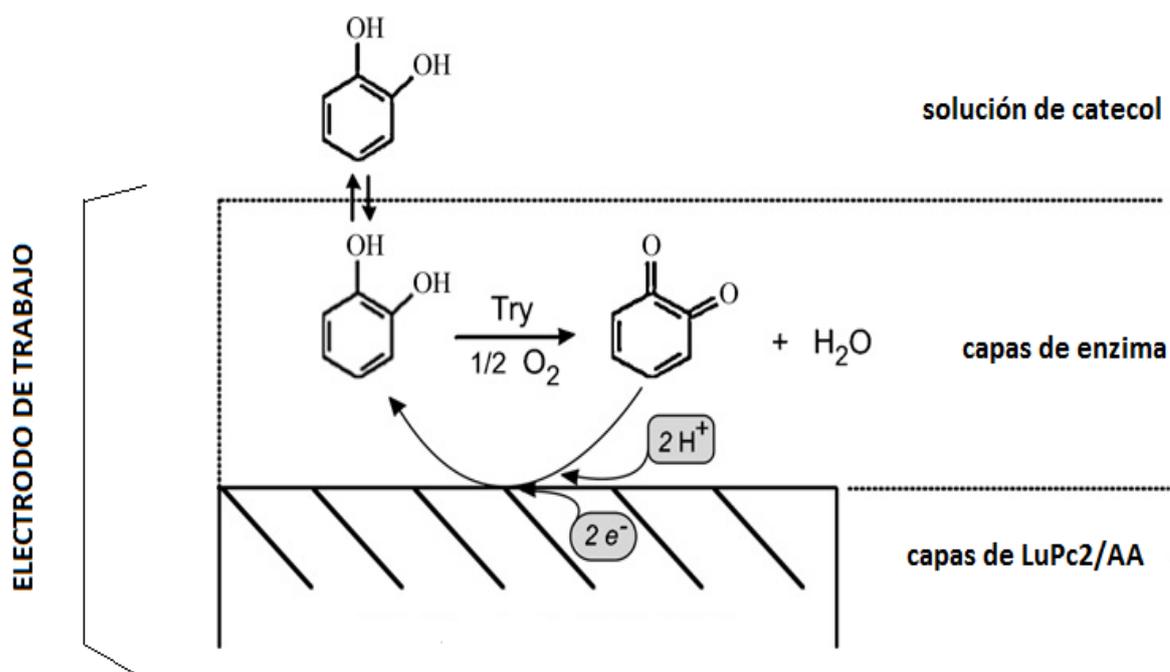


Fig 4.33. Principio de las reacciones acopladas enzimática y electroquímica que tienen lugar en la detección del catecol.

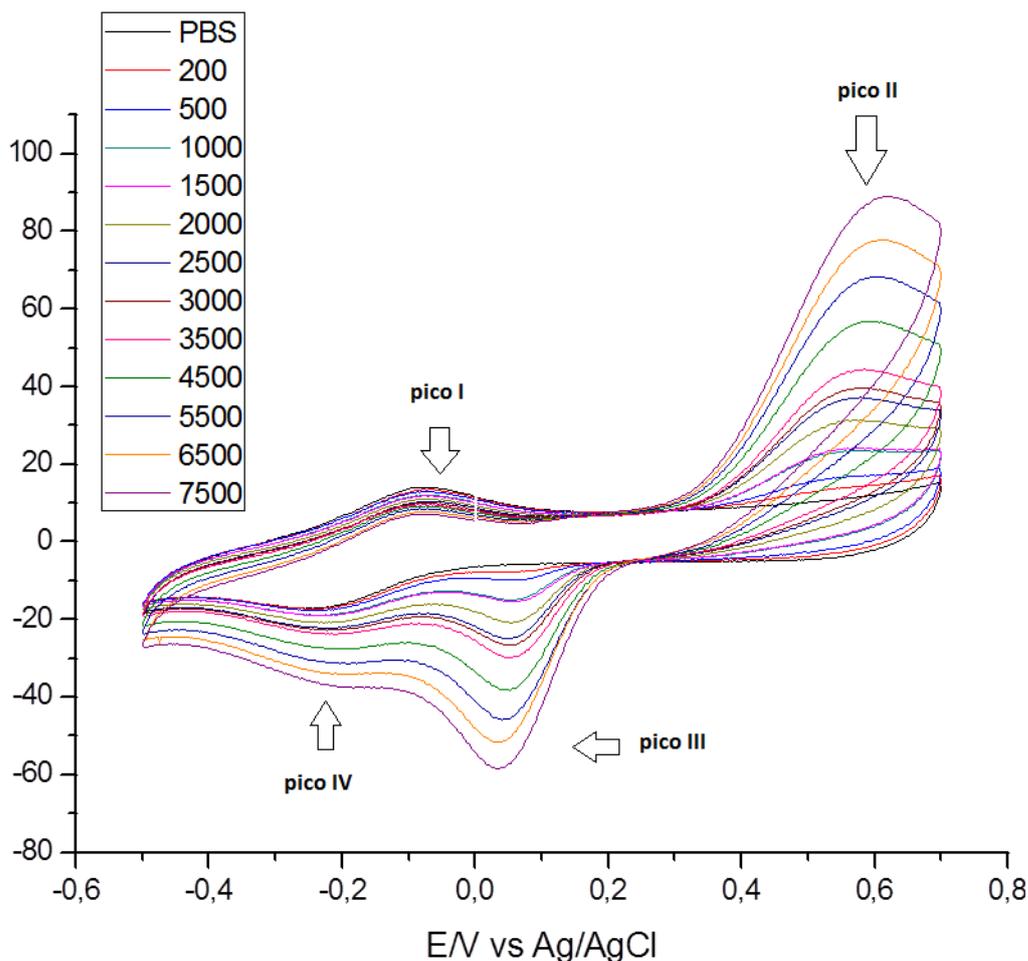


Fig. 4.34. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el catecol, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2 + \text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$.

En la figura 4.34. podemos observar el pico de intensidad enzimático catódico, pico III, a un potencial de +0,5V, y el pico electroquímico anódico, pico II, a un potencial de +0,6V. El pico electroquímico está desplazado hacia potenciales mayores con respecto a lo obtenido en el electrodo sin enzima.

- **Electrodo modificado de lacasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

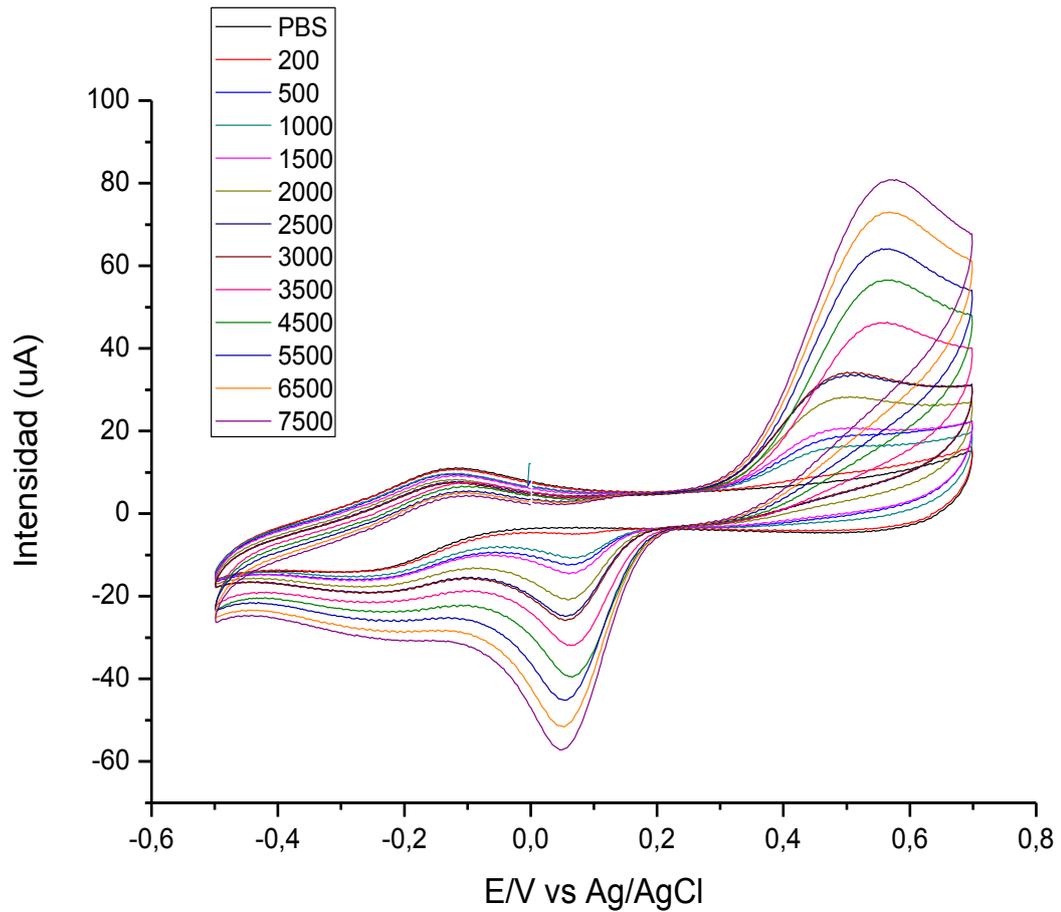


Fig. 4.35. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10)/Lac en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con distintas adiciones de disolución de catecol 10⁻³M en buffer fosfato.

Al igual que ocurría en el voltamograma obtenido para el electrodo de tirosinasa, podemos distinguir dos picos relacionados con los procesos que sufre el antioxidante, el catecol. El pico II (figura 4.35.) asociado a la oxidación electroquímica del catecol que se produce a +0,55V y el pico III (figura 4.35.), pico catódico, asociado al proceso enzimático de reducción de la quinona.

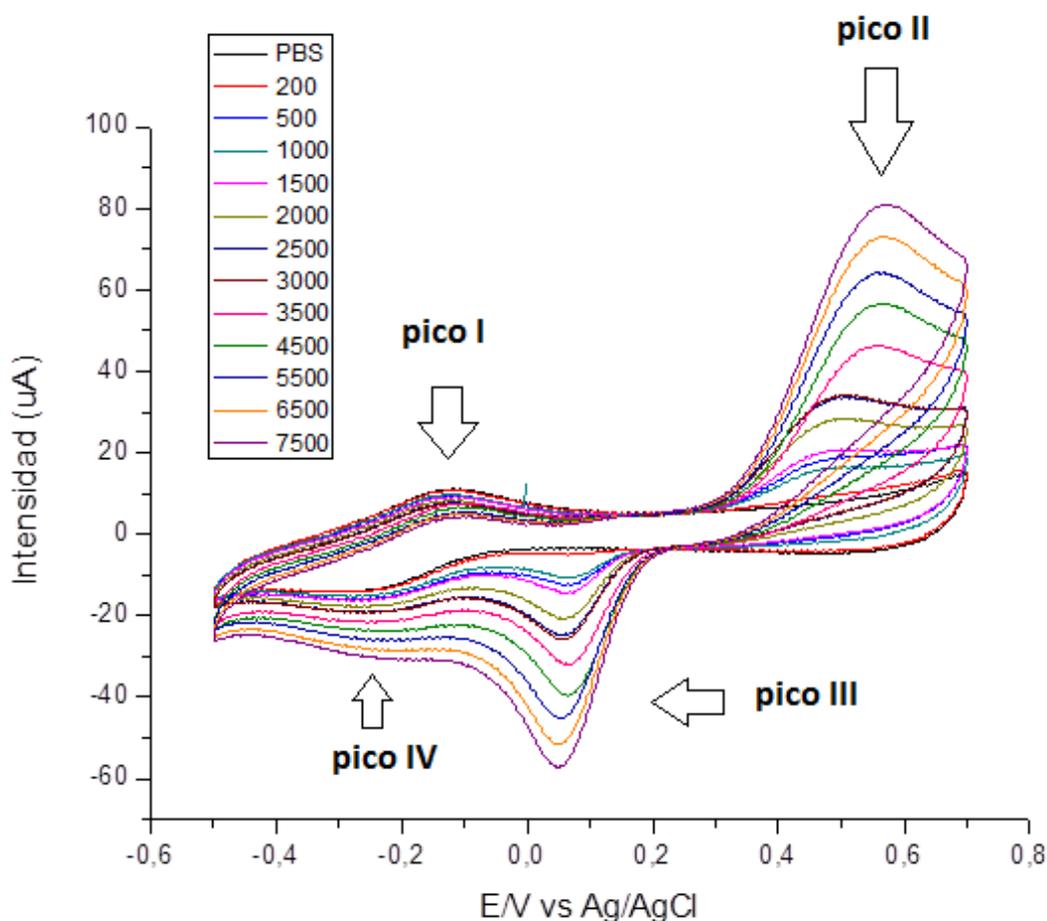


Fig. 4.36. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el catecol, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Lac.

El pico II no está tan desplazado hacia potenciales mayores (+0,55V) como en el caso de la tirosinasa (+0,6V) coincidiendo aproximadamente con el potencial de los picos obtenidos para el electrodo sin enzima. Sin embargo, una diferencia notable que se puede apreciar entre los electrodos con y sin enzima es que a medida que aumenta la concentración de antioxidante los picos sufren desplazamientos notables en cuanto a su potencial, cosa que no ocurre con los electrodos sin enzima.

▪ Comparativa entre los distintos electrodos

En la figura 4.37. se pueden observar con mayor detalle las diferencias existentes entre los tres tipos de electrodos modificados.

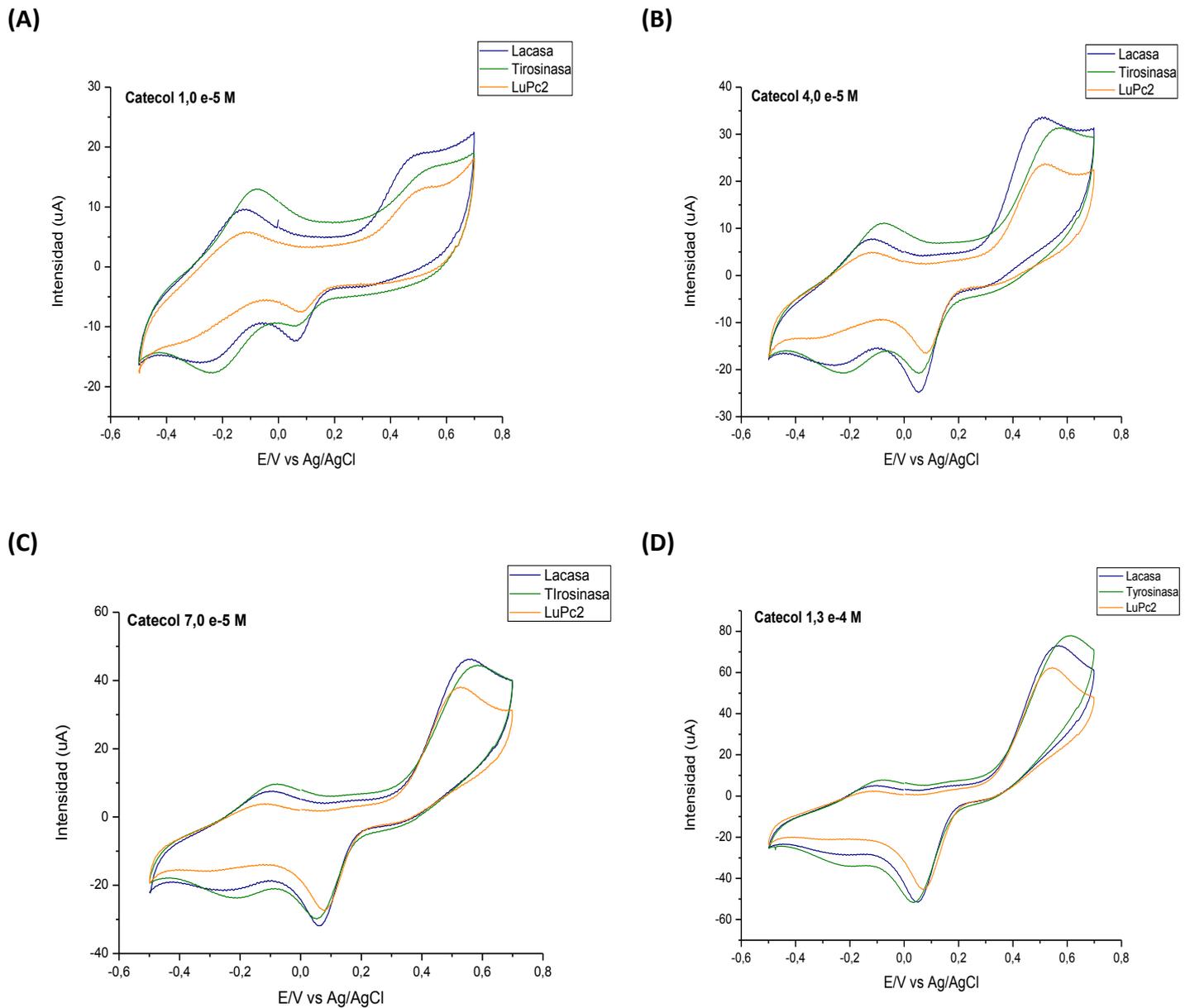


Fig. 4.37. Comparativa de los resultados obtenidos al realizar voltametrías cíclicas con electrodos de: $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$, $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ y $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$, frente a catecol de concentraciones: (A) $1 \times 10^{-5} \text{M}$, (B) $4,0 \times 10^{-5} \text{M}$, (C) $7,0 \times 10^{-5} \text{M}$ y (D) $1,3 \times 10^{-4} \text{M}$.

A diferencia de lo que ocurría con el ácido vanílico y con el ácido cafeico, las diferencias entre las señales de fondo del electrodo sin enzima y las de los electrodos con enzima, aunque existentes, no son ni de lejos tan amplias. De hecho, a medida que se incrementa la concentración las señales de fondo tienden a igualarse existiendo únicamente diferencias en la magnitud de los picos de intensidad que corresponden a los procesos redox.

La intensidad de los picos es notablemente mayor para los electrodos de enzima respecto del que no tiene depositada enzima.

Los potenciales a los que se producen los picos de intensidad son bastante coincidentes para los tres tipos de sensor. La única diferencia que podría destacarse en este aspecto tiene que ver con el pico anódico de oxidación electroquímica del catecol que se produce a entre +0,55V y +0,6V. Dicho pico aparece inicialmente desplazado hacia potenciales menores para las concentraciones más bajas en el caso de la lacasa con respecto a los otros dos electrodos. A medida que se incrementa la concentración se desplaza hacia potenciales mayores alcanzando un punto intermedio entre el electrodo sin enzima y el electrodo de tirosinasa a una concentración de $1,8 \times 10^{-4} \text{M}$.

D) Hidroquinona

La hidroquinona es otro difenol y presenta una fórmula molecular igual a la del catecol, con la única diferencia entre ambos de que el catecol es un orto-difenol y la hidroquinona es un para-difenol. Con lo cual, cabría esperarse que se obtuvieran resultados muy similares.

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

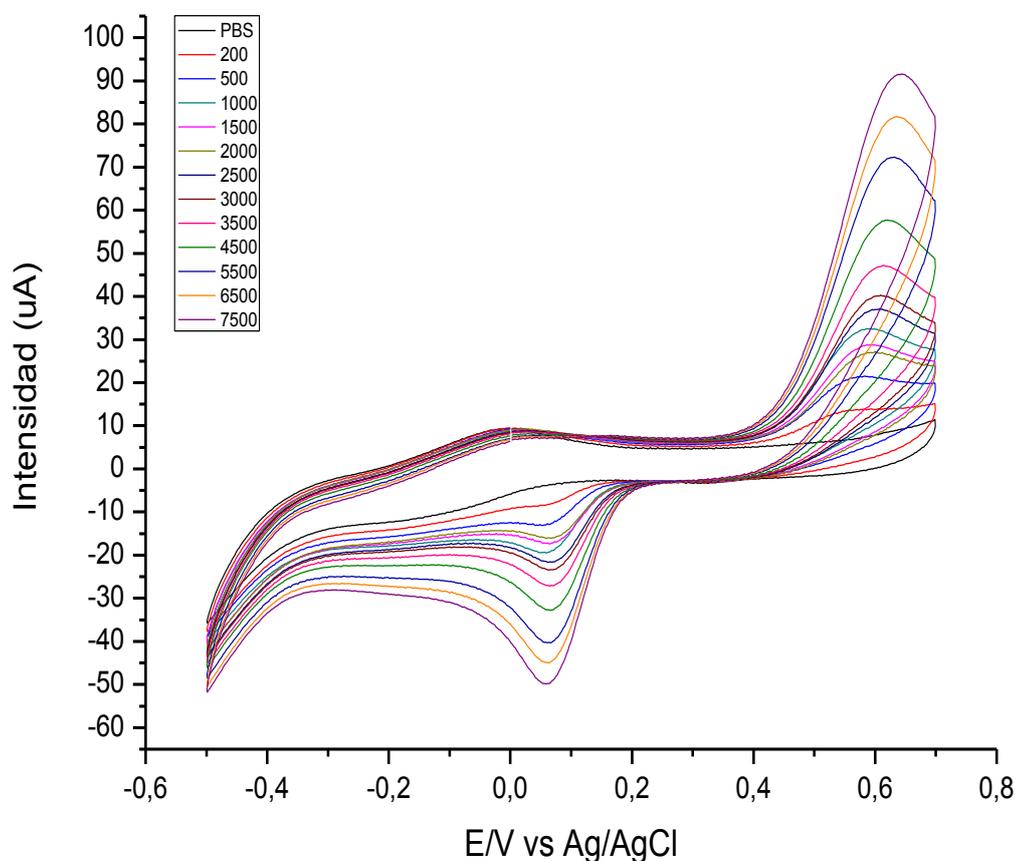


Fig. 4.38. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de hidroquinona 10^{-3}M en buffer fosfato.

Efectivamente, tal y como cabría esperar, los resultados obtenidos son muy similares a los registrados para el catecol. La diferencia principal que puede apreciarse es que el pico correspondiente a la oxidación electroquímica del difenol (pico II, figura 4.39) está desplazado hacia potenciales mayores con respecto a lo obtenido en el catecol para este electrodo.

Se observa una clara correlación entre la magnitud de los picos y la concentración de antioxidante.

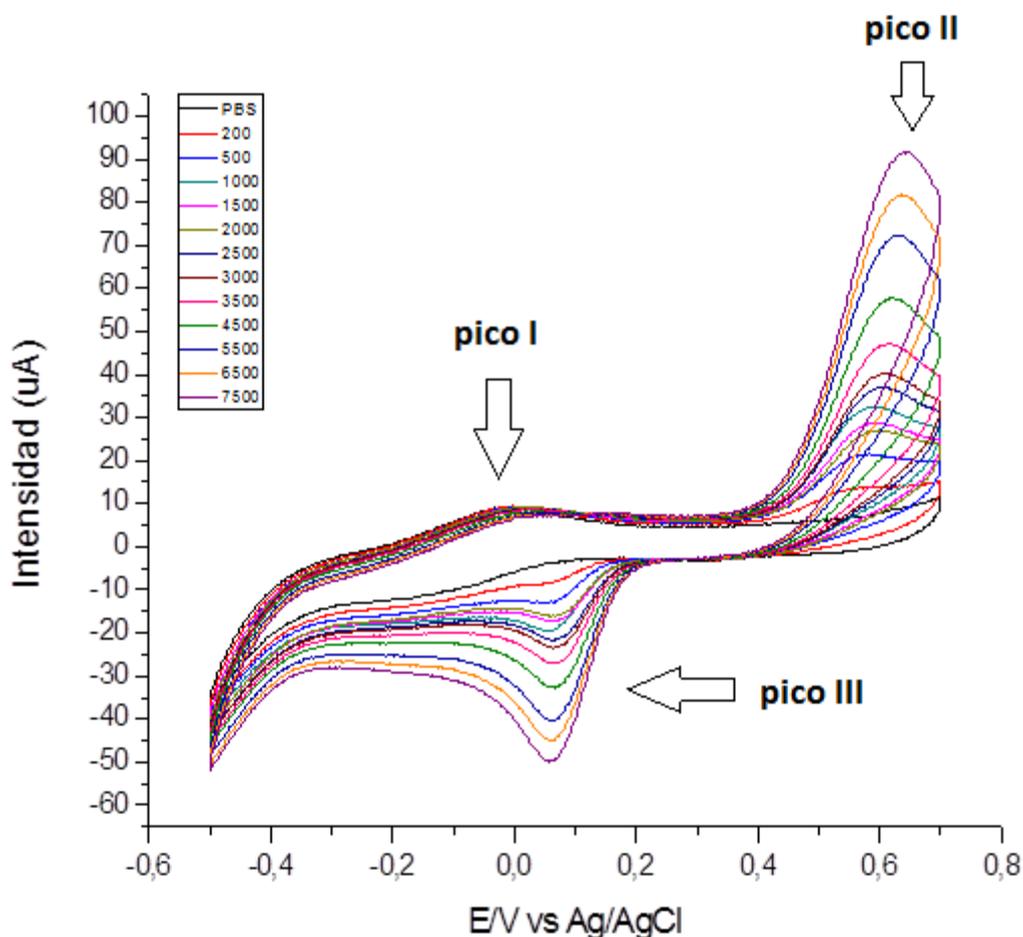


Fig. 4.39. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para la hidroquinona, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$.

- **Electrodo modificado de tirosinasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

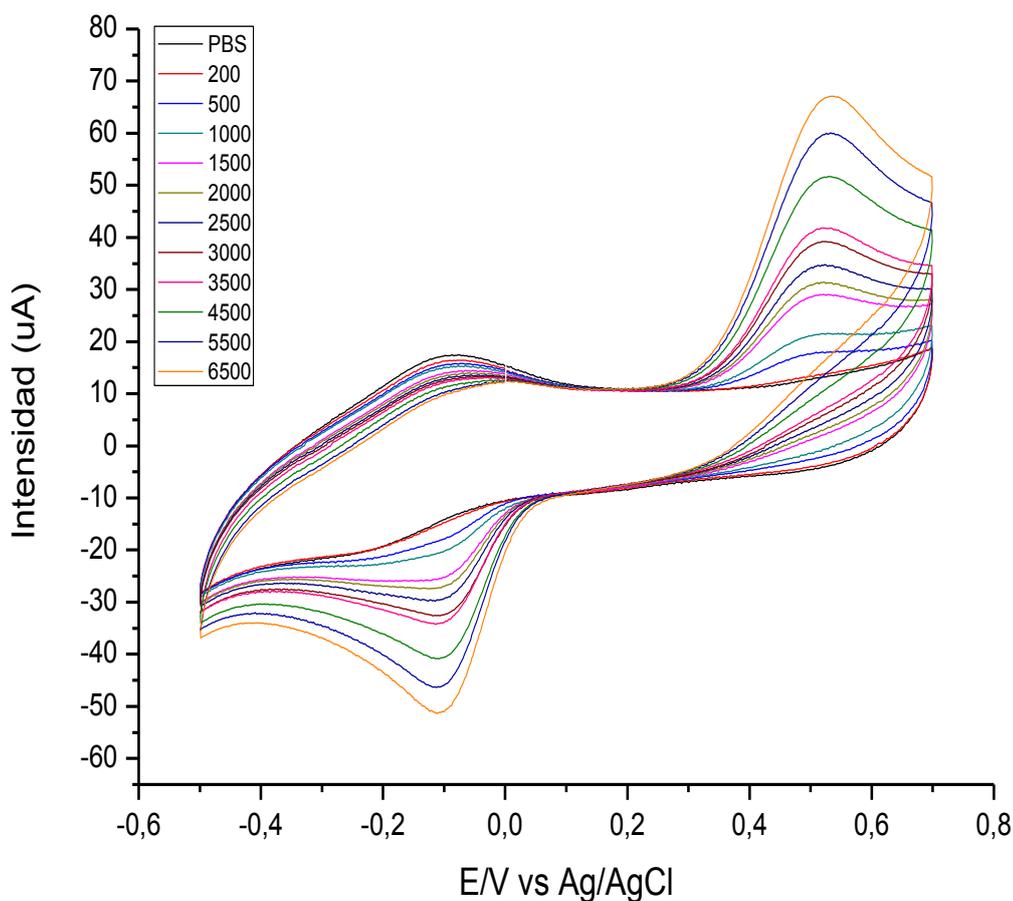


Fig. 4.40. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de hidroquinona 10^{-3}M en buffer fosfato.

Los picos están desplazados hacia potenciales menores con respecto al electrodo de lutecio, de tal forma que se puede deducir que para la hidroquinona la tirosinasa tiene un efecto electrocatalítico. Un comportamiento que no se ha observado en el caso del catecol.

El desplazamiento es especialmente notable en el pico III (figura 4.41.) donde se pasa de un potencial de $+60\text{ mV}$ en el electrodo de lutecio a un potencial de -100 mV en el electrodo de tirosinasa.

También la intensidad del pico II es mayor en el electrodo de lutecio que para este electrodo enzimático de tirosinasa. Algo que podrá observarse con mayor facilidad en la comparativa.

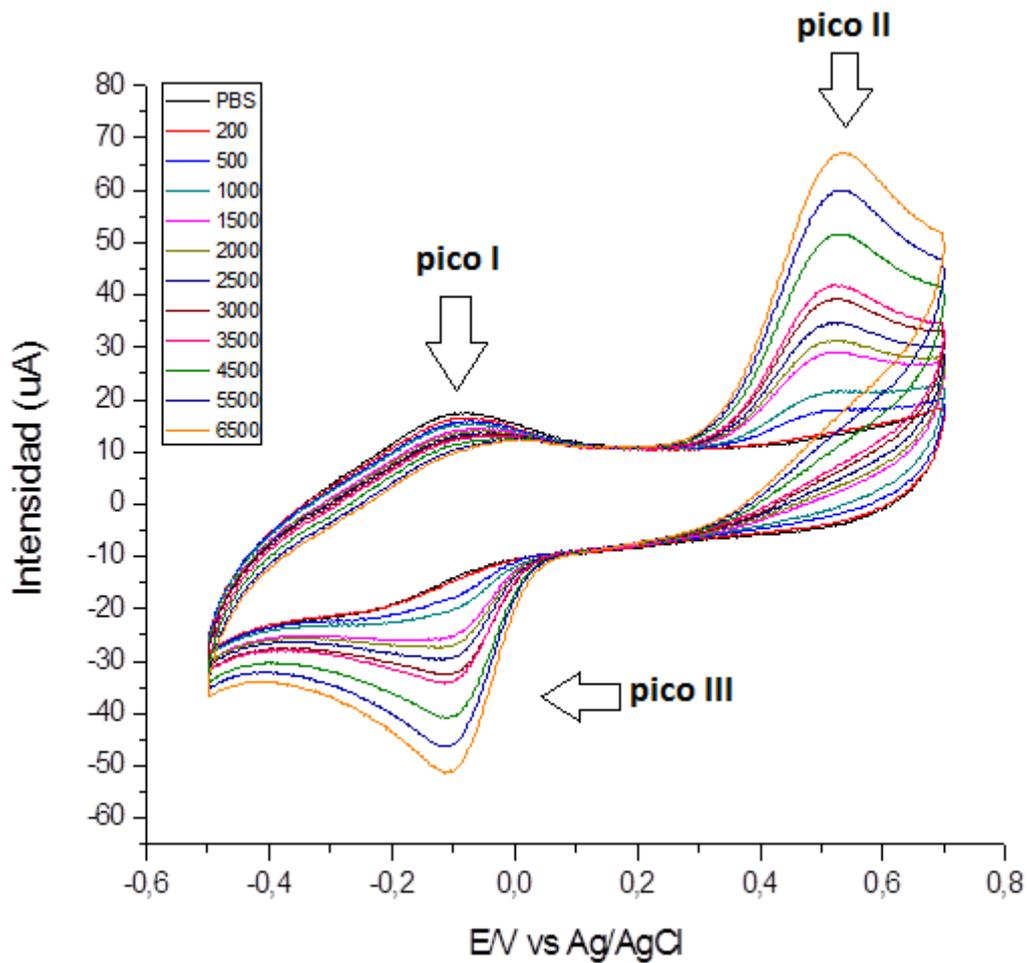


Fig. 4.41. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para la hidroquinona, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$.

- **Electrodo modificado de lacasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

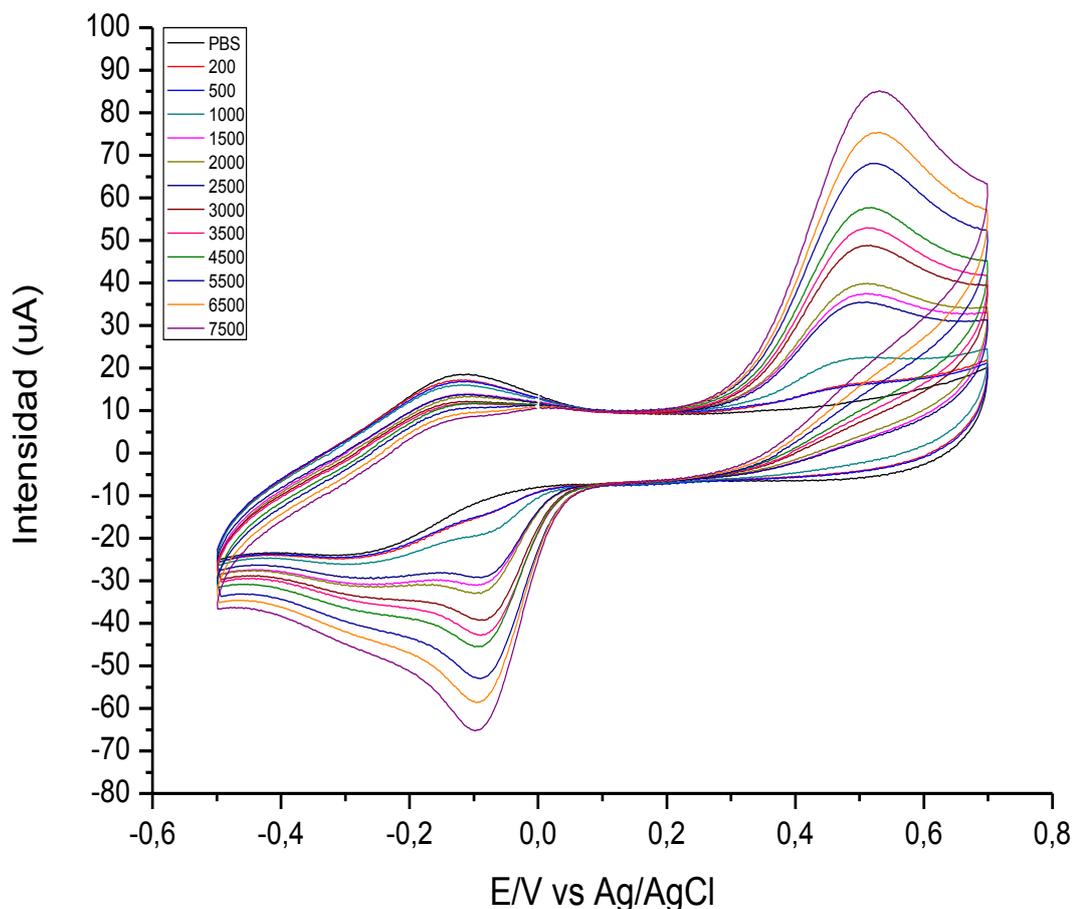


Fig. 4.42. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de hidroquinona 10^{-3}M en buffer fosfato.

De nuevo se hace patente la existencia de un desplazamiento del potencial hacia potenciales menores de los picos de intensidad obtenidos para este electrodo respecto de los obtenidos para el electrodo de lutecio.

La magnitud del pico II (figura 4.43) es mayor que en la tirosinasa, siendo superior a la del lutecio a concentraciones bajas y medias y siendo inferior a las más altas, dentro del rango de estudio.

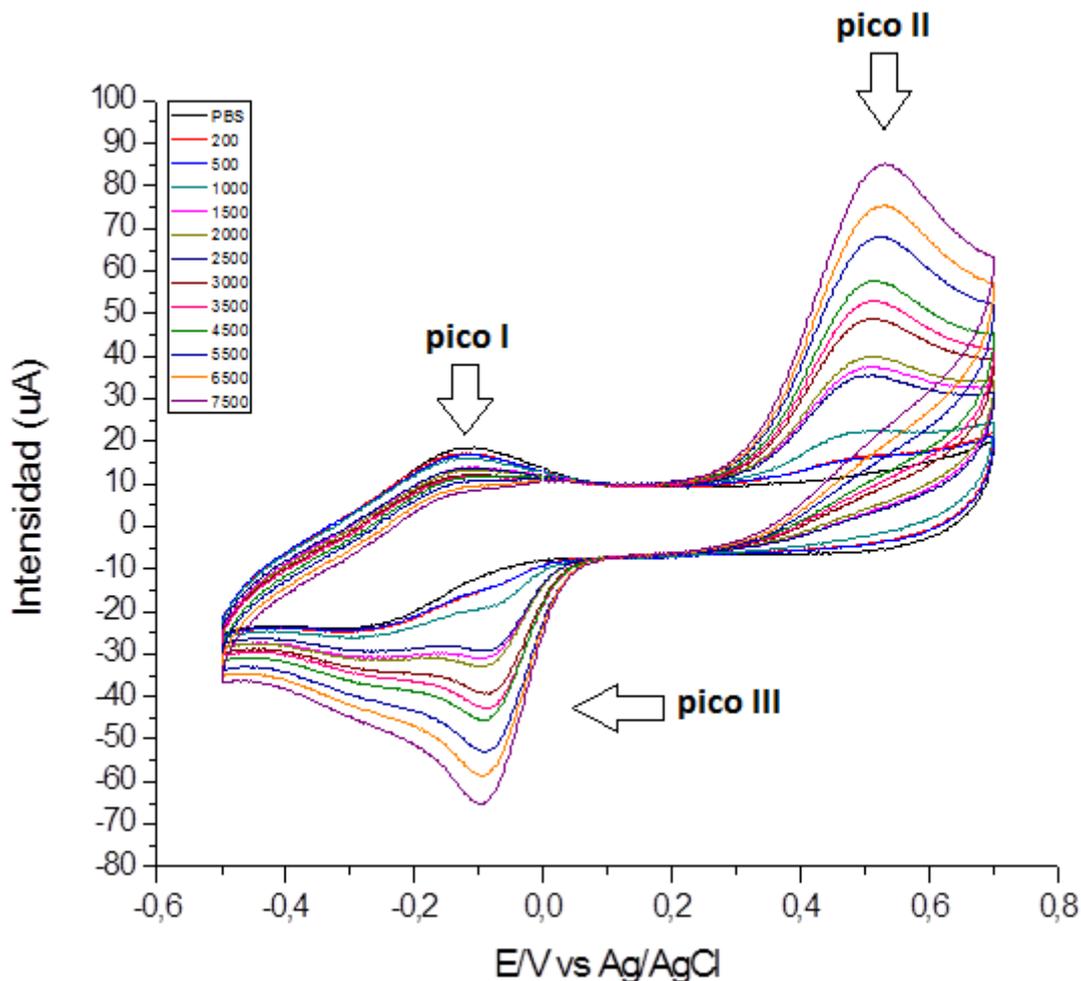


Fig. 4.43. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para la hidroquinona, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Lac.

- **Comparativa entre los distintos electrodos**

En la figura 4.44. se pueden apreciar con mayor detalle las diferencias existentes entre los tres tipos de electrodos modificados.

Podemos ver con claridad el considerable efecto electrocatalítico que ejercen las enzimas, ya que los voltamogramas correspondientes a estas presentan los picos claramente desplazados hacia potenciales menores. También se puede ver como la intensidad del pico anódico situado a entre 0,5 y 0,6 V es mayor para el lutecio que para la tirosinasa, excepto a concentraciones menores. La magnitud de dicho pico es mayor también para el electrodo de lutecio en relación al de lacasa para las concentraciones más altas del rango de estudio, es decir, a partir de $1,3 \times 10^{-4}$.

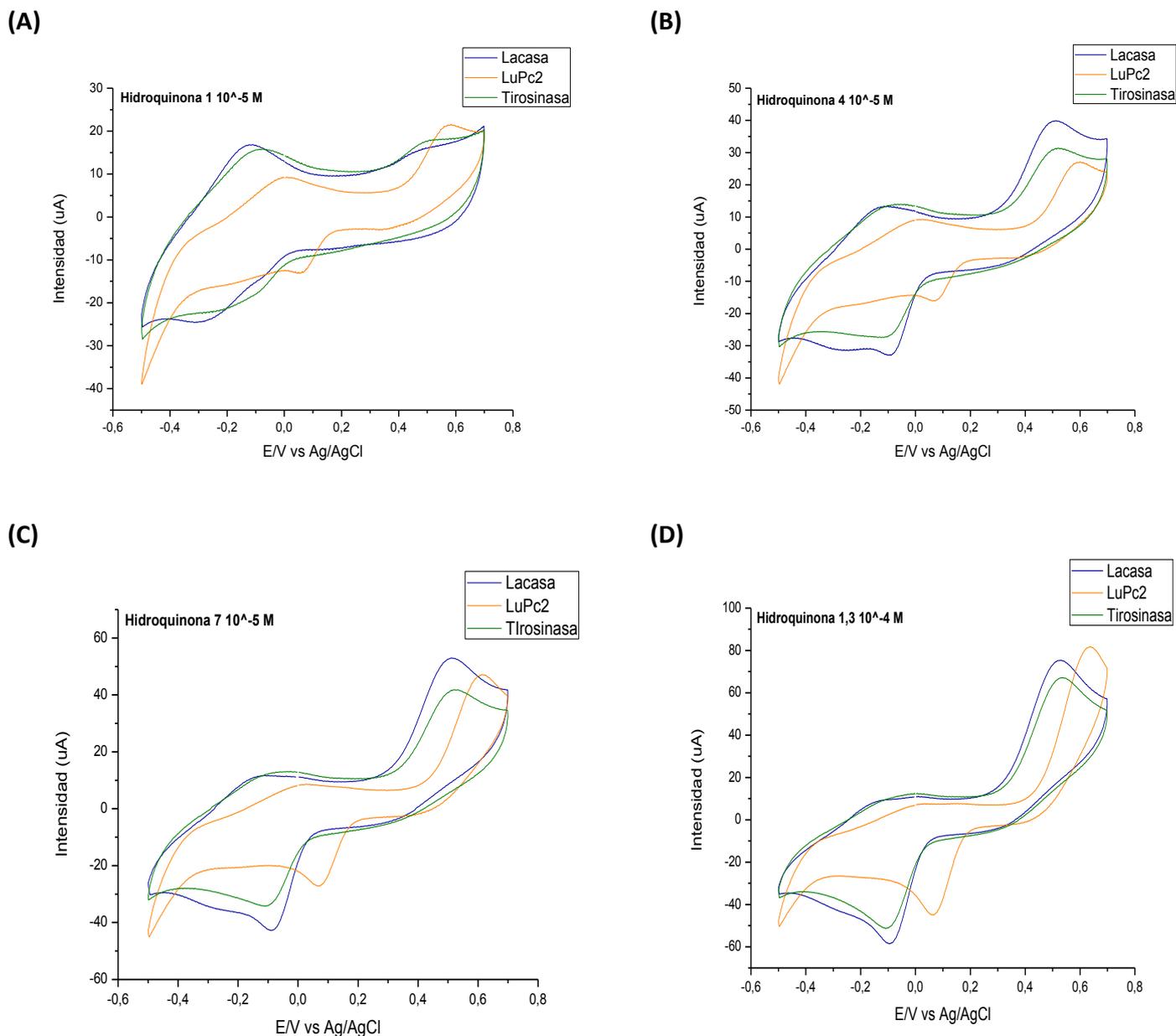


Fig. 4.44. Comparativa de los resultados obtenidos al realizar voltametrías cíclicas con electrodos de: $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$, $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ y $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$, frente a hidroquinona de concentraciones: (A) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, (B) $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, (C) $7,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ y (D) $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Si bien en el pico catódico situado a entre +0,05 y -0,2V a medida que aumenta la concentración la diferencia entre los picos de los distintos electrodos se atenúa, se puede ver como claramente se obtiene una mayor intensidad para este pico en los electrodos enzimáticos.

4.3.3.2.4. Trifenoles

E) Pirogalol

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

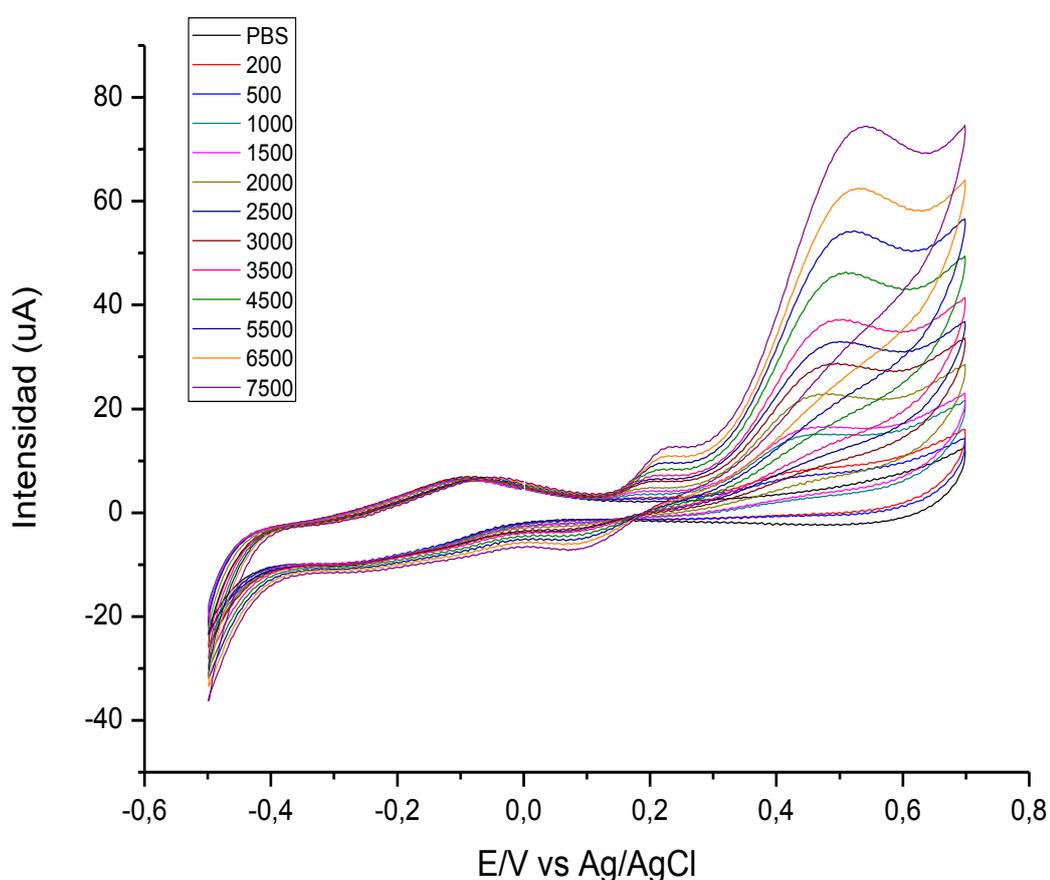


Fig. 4.45. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con distintas adiciones de disolución de pirogalol 10^{-3}M en buffer fosfato.

Podemos ver 3 picos de interés en relación a los procesos sufridos por el trifenol, en este caso el pirogalol, dichos picos corresponden a los picos II, III y IV de la figura 4.46.

Se puede apreciar como el pico II y IV parecen estar asociados a un proceso reversible. A priori, parece que la situación que tiene lugar es que el proceso redox en el cual intervienen 3 electrones se lleva a cabo en dos etapas, una según la cual se oxidan dos electrones (pico II) y otra según la cual se oxida el tercer electrón (pico III). Proceso asociado al pico II es reversible ya que se revierte en el barrido catódico en el pico IV siendo ambos de una magnitud relativamente similar, mientras que el pico III representa un proceso irreversible.

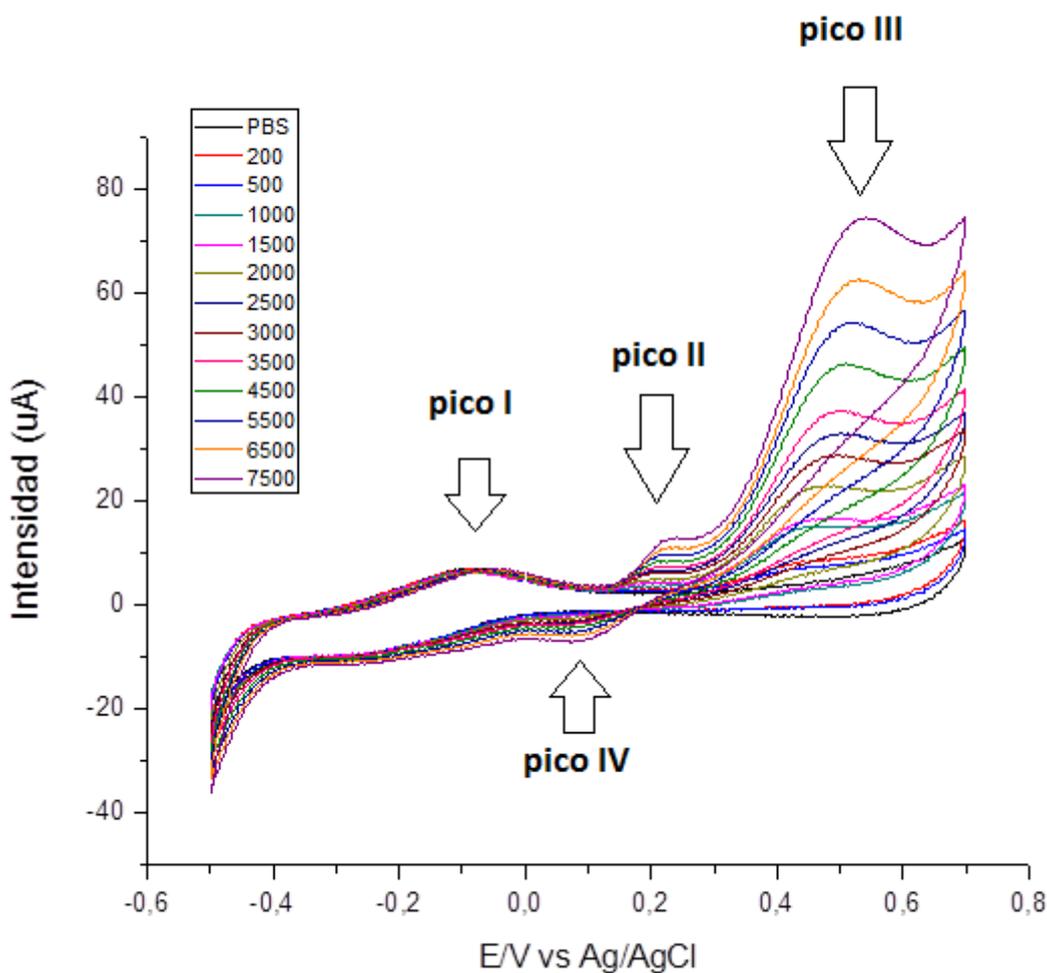


Fig. 4.46. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el pirogalol, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$.

- Electrodo modificado de tirosinasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

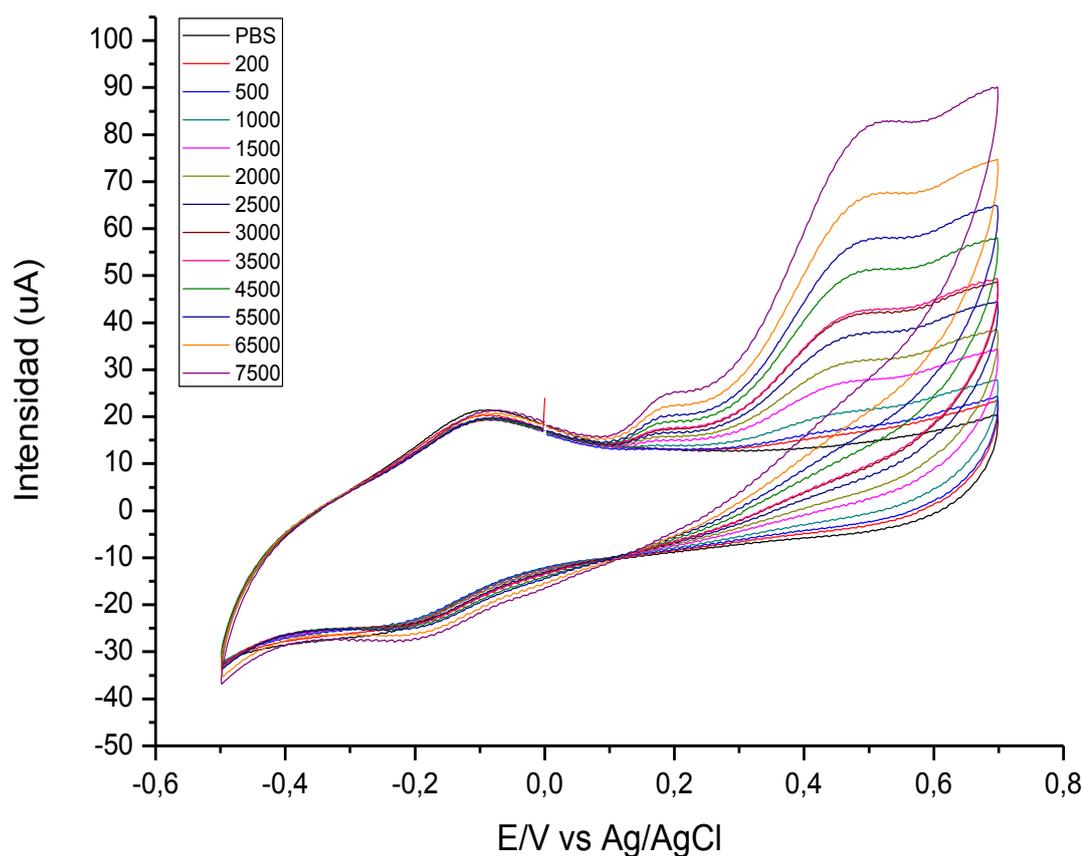


Fig. 4.47. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con distintas adiciones de disolución de pirogalol 10^{-3}M en buffer fosfato.

El pirogalol es un trifenol que presenta tres picos asociados a procesos redox del antioxidante; dos picos enzimáticos y uno electroquímico. Aunque también puede obtenerse una oxidación en dos etapas.

Para los electrodos de tirosinasa, en los trifenoles de acuerdo a la bibliografía se produce un pico de intensidad muy intenso a un potencial de +0,35V que está relacionado con una oxidación electroquímica de los compuestos [71]. Sin embargo, en la figura 4.48. se puede observar como dicho pico (pico III, fig 4.48.) se encuentra a un

potencial de +0,45V. También, según el mismo artículo se indica que aparece un pico enzimático muy poco intenso que corresponde a la reducción de la quinona a un potencial de -0,05V [71]. De nuevo, se puede observar como dicho pico se encuentra desplazado a potenciales mayores, concretamente se puede observar dicho pico (pico IV, fig. 4.48.) a un potencial de -0,02V.

Se puede concluir que a pesar del desplazamiento de potenciales existente con respecto a la referencia bibliográfica, los resultados obtenidos están en conformidad con los resultados publicados previamente.

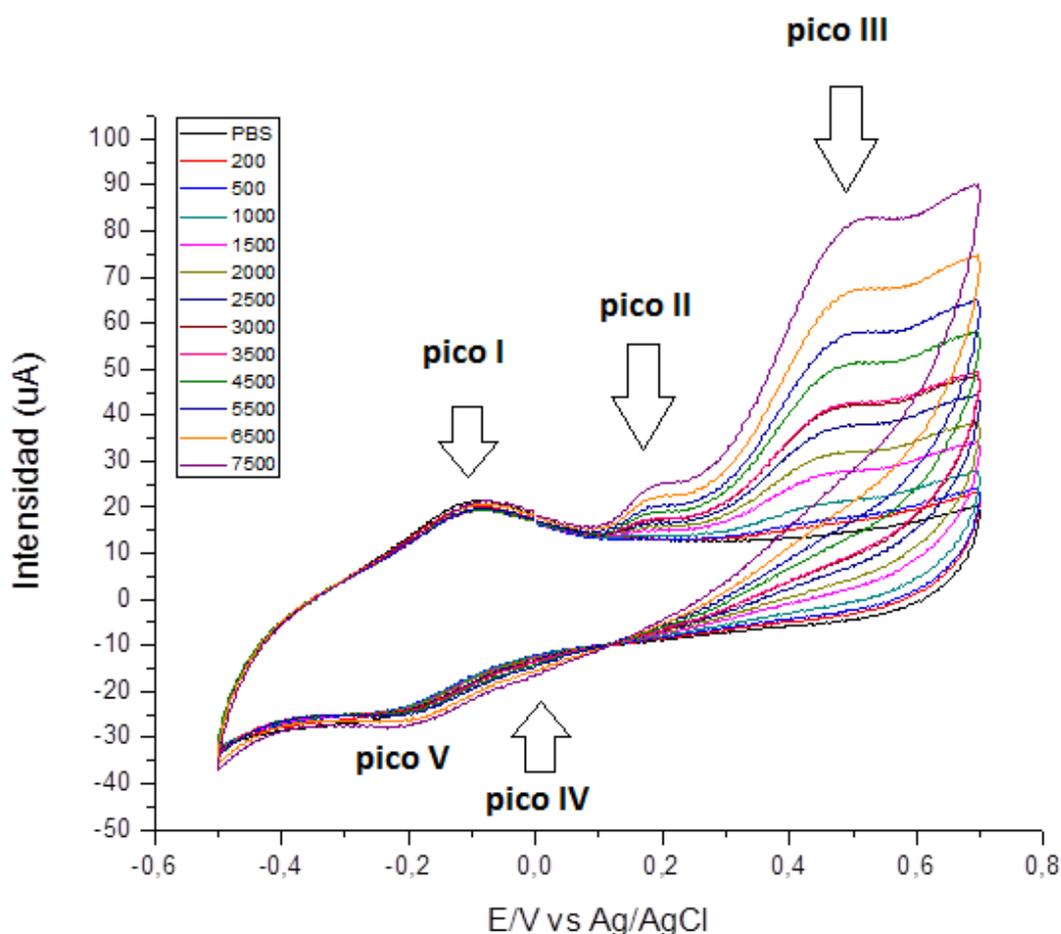


Fig. 4.48. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el pirogalol, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$.

El pico catódico IV, situado a un potencial aproximadamente de -0,02V, apenas se puede apreciar debido a lo ancho de la corriente de fondo corresponde un proceso de reducción enzimática.

Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el electrodo de lutecio es posible que el pico II no sea un pico enzimático, sino que esté asociado a una oxidación en dos etapas del trifenol siendo en este caso ambas irreversibles.

Por último cabe reseñar que la intensidad de los picos es mayor que la obtenida para el electrodo sin enzima.

▪ Electrodo modificado de lacasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

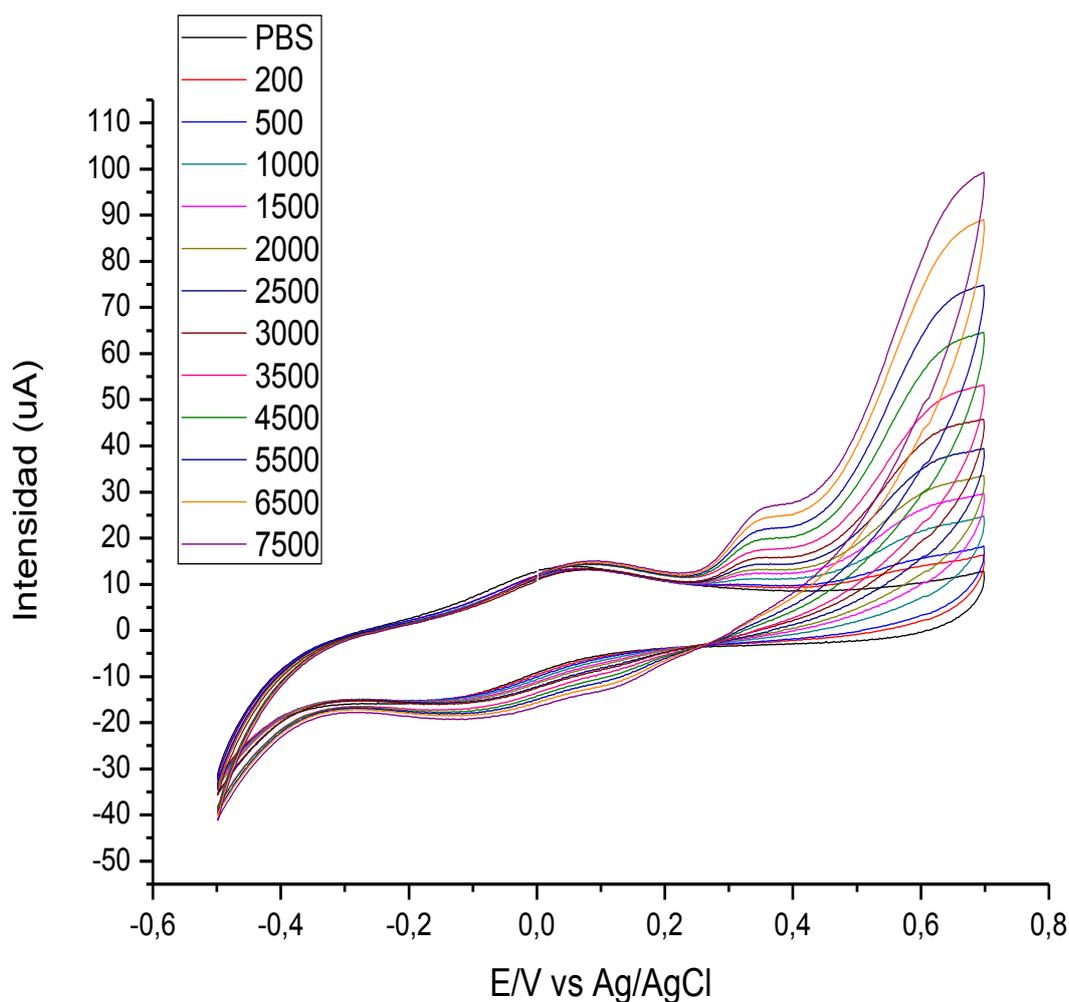


Fig. 4.49. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$ en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con distintas adiciones de disolución de pirogalol 10^{-3}M en buffer fosfato.

En el electrodo de lacasa el pico de oxidación electroquímica del pirogalol (pico III, figura 4.50.) se solapa con el pico asociado a la oxidación de la ftalocianina, debido a que el primero ha sufrido un desplazamiento hacia potenciales mayores.

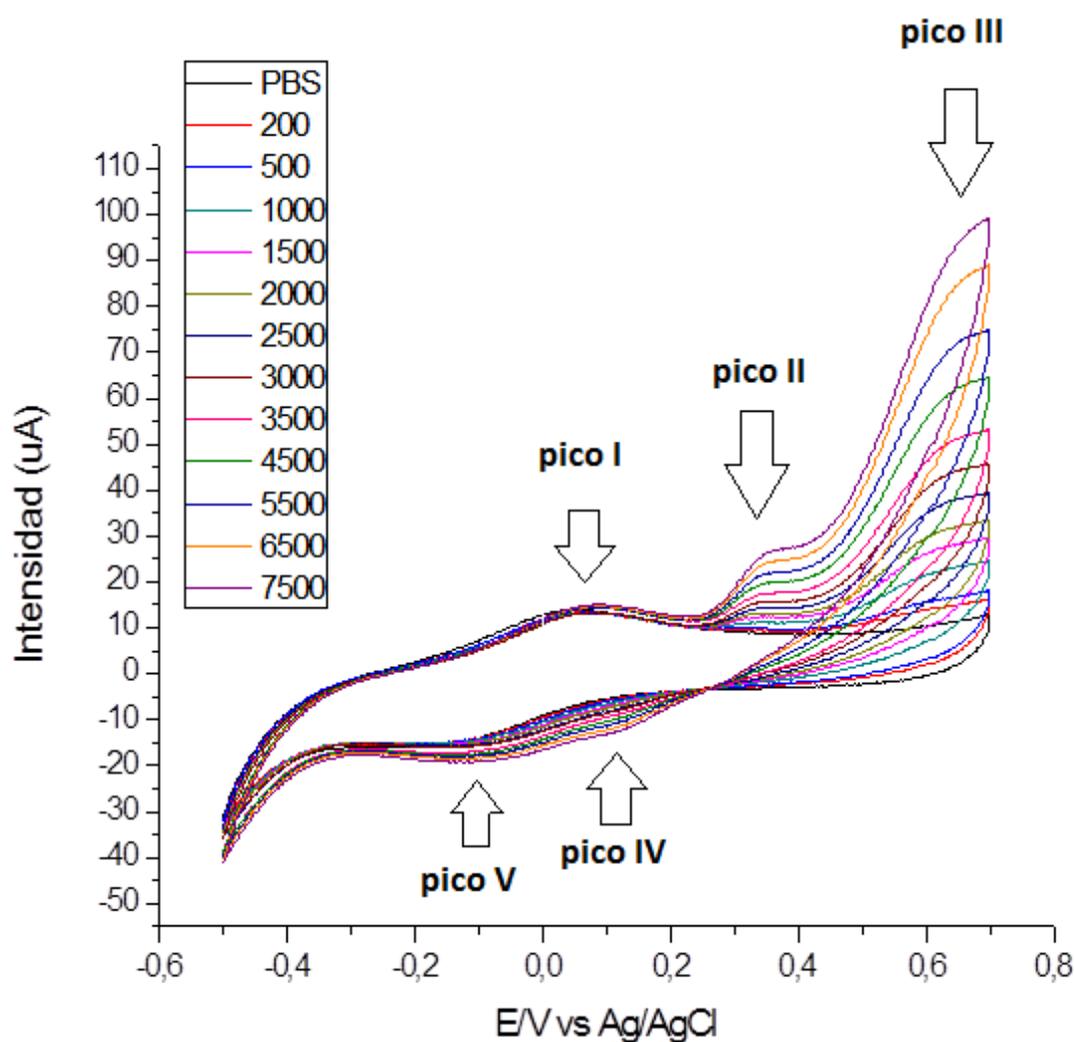


Fig. 4.50. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el pirogalol, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$.

Al igual que ocurría con el electrodo de tirosinasa el pico IV (figura 4.50.) aparece débilmente debido a la anchura de la corriente de fondo y a la proximidad del pico asociado a la ftalocianina (pico V).

También para este electrodo la magnitud de los picos es mayor que para el electrodo sin enzima.

▪ Comparativa entre los distintos electrodos

En la figura 4.51. se pueden observar con mayor detalle las diferencias existentes entre los tres tipos de electrodos modificados.

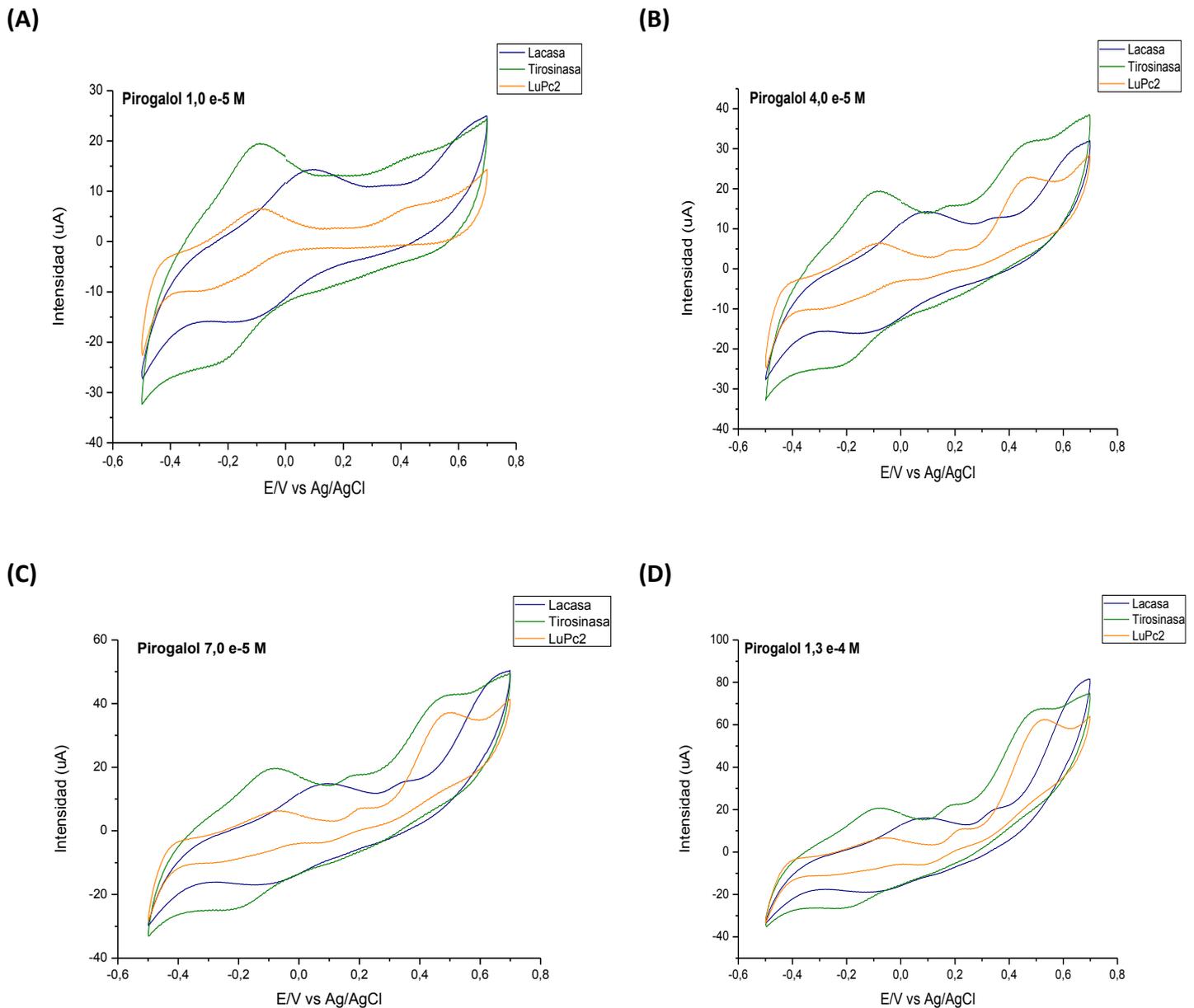


Fig. 4.51. Comparativa de los resultados obtenidos al realizar voltametrías cíclicas con electrodos de: $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$, $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ y $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$, frente a pirogalol de concentraciones: (A) $1 \times 10^{-5} \text{M}$, (B) $4,0 \times 10^{-5} \text{M}$, (C) $7,0 \times 10^{-5} \text{M}$ y (D) $1,3 \times 10^{-4} \text{M}$.

De nuevo las diferencias entre las señales de fondo son muy notables, especialmente a concentraciones más bajas donde los picos de intensidad están menos estilizados.

Cabe destacar además como en el electrodo sin enzima y el electrodo de tirosinasa aparece claramente el pico anódico de oxidación del pirogalol, mientras que en la lacasa dicho pico se solapa con la oxidación de la ftalocianina, debido al desplazamiento hacia potenciales mayores que sufren todos los picos del voltamograma que corresponde a la lacasa.

F) Ácido gálico

- Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

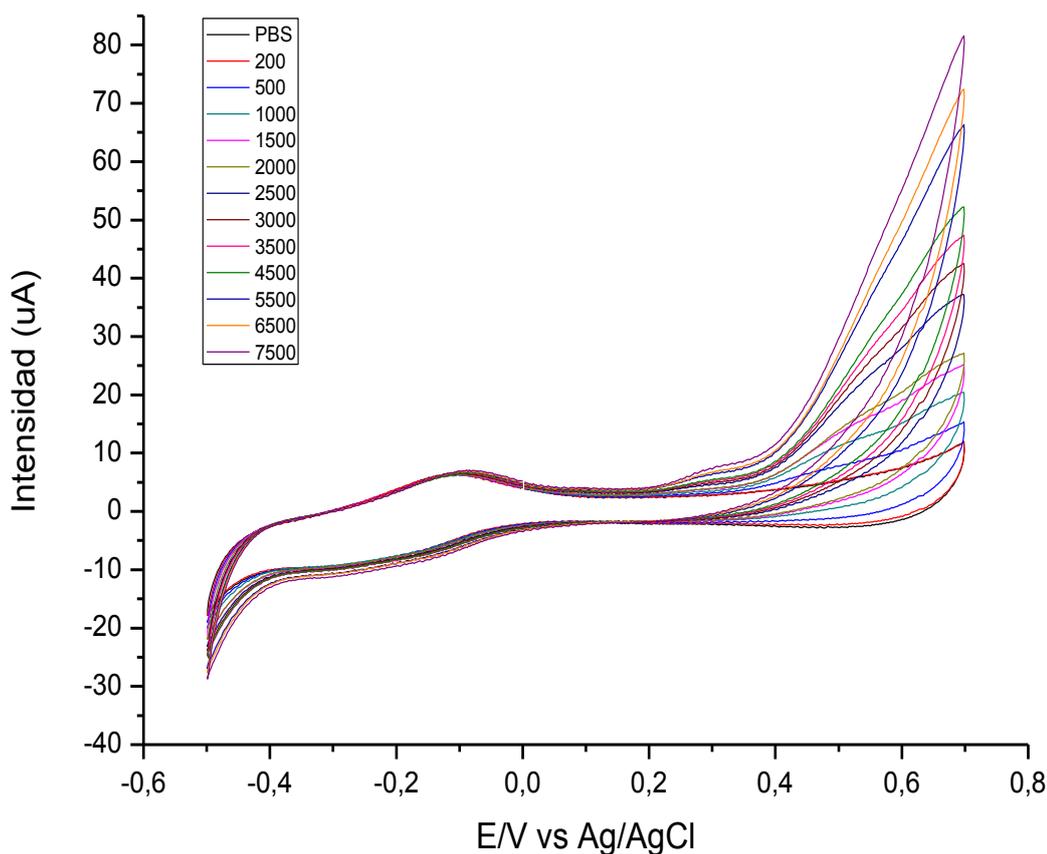


Fig. 4.52. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de ácido gálico 10^{-3}M en buffer fosfato.

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

A diferencia de lo observado para el otro trifenol analizado, el pirogalol, en este caso no observa con claridad el pico anódico correspondiente a la oxidación electroquímica (pico III, figura 4.53). Esto puede deberse a que se ha desplazado hacia potenciales mayores de tal forma que sale del rango de estudio y se solapa con el pico de la ftalocianina a +0,7V.

A +0,3V se observa un pico (pico II, figura 4.53.) que corresponde a una oxidación en varias etapas del ácido gálico. Al ser un trifenol, pueden oxidarse tres electrones, de tal forma que se oxidan dos electrones y posteriormente se oxida el tercero. Sin embargo, a diferencia del pirogalol no podemos observar reversibilidad en el proceso.

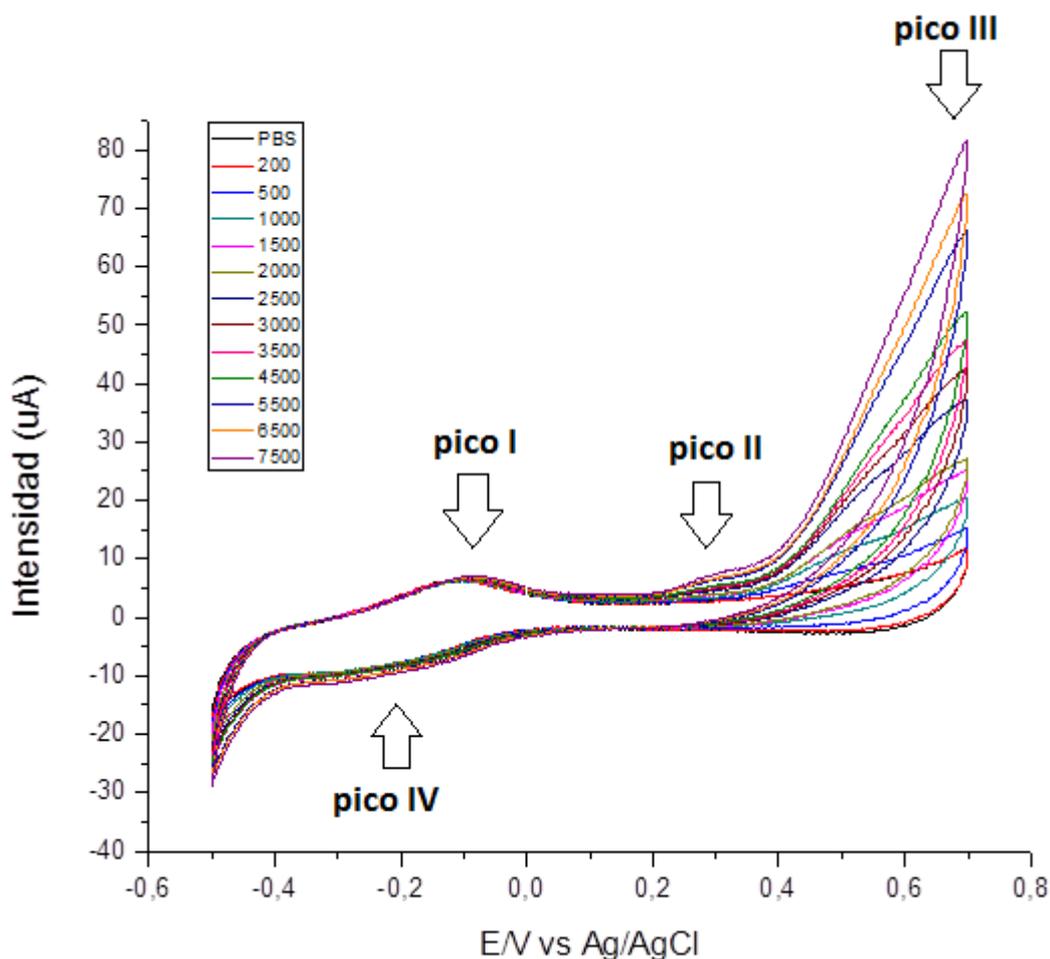


Fig. 4.53. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido gálico, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$.

▪ Electrodo modificado de tirosinasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

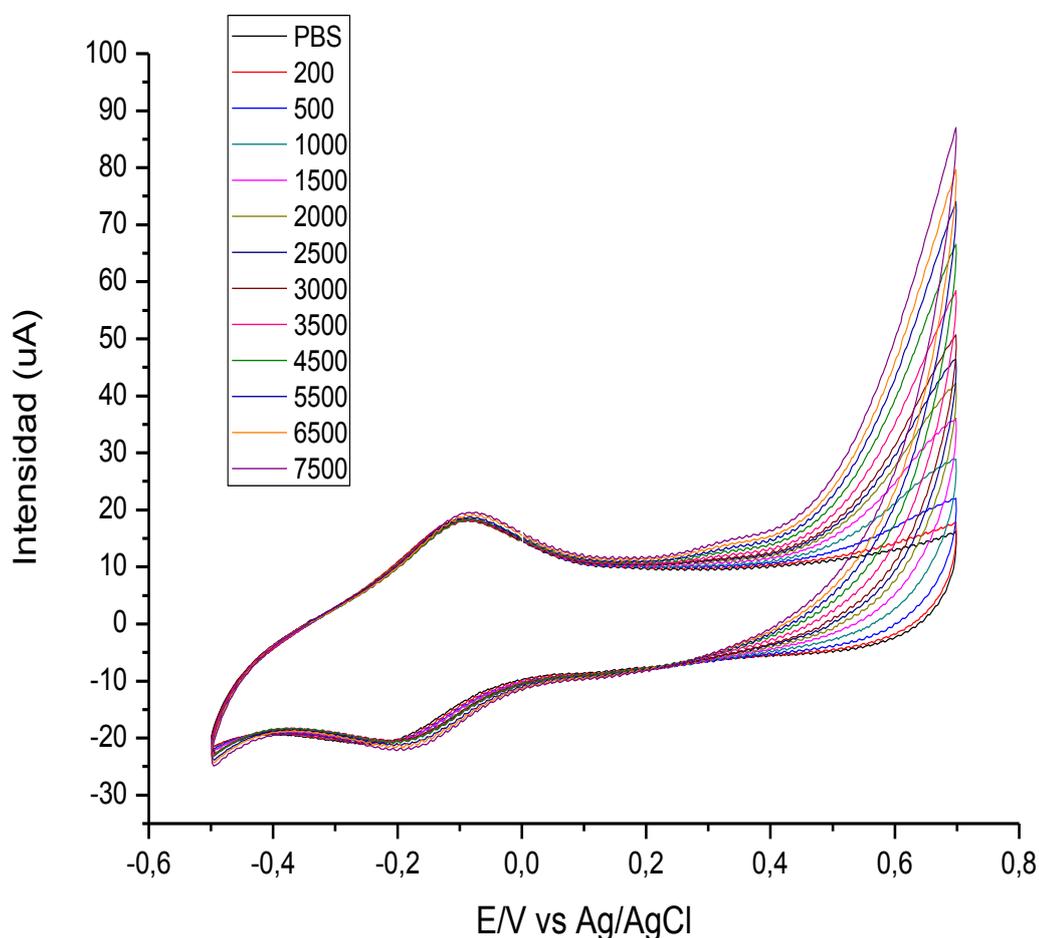


Fig. 4.54. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con distintas adiciones de disolución de ácido gálico 10^{-3}M en buffer fosfato.

Para el electrodo de tirosinasa podemos apreciar un pico muy pequeño (pico IV, figura 4.55.), en la práctica más que de un pico se trata de una protuberancia, que puede corresponderse con el pico asociado al pico II de la oxidación de dos de los electrones del ácido gálico. Esto hace indicar cierto grado de reversibilidad en el proceso.

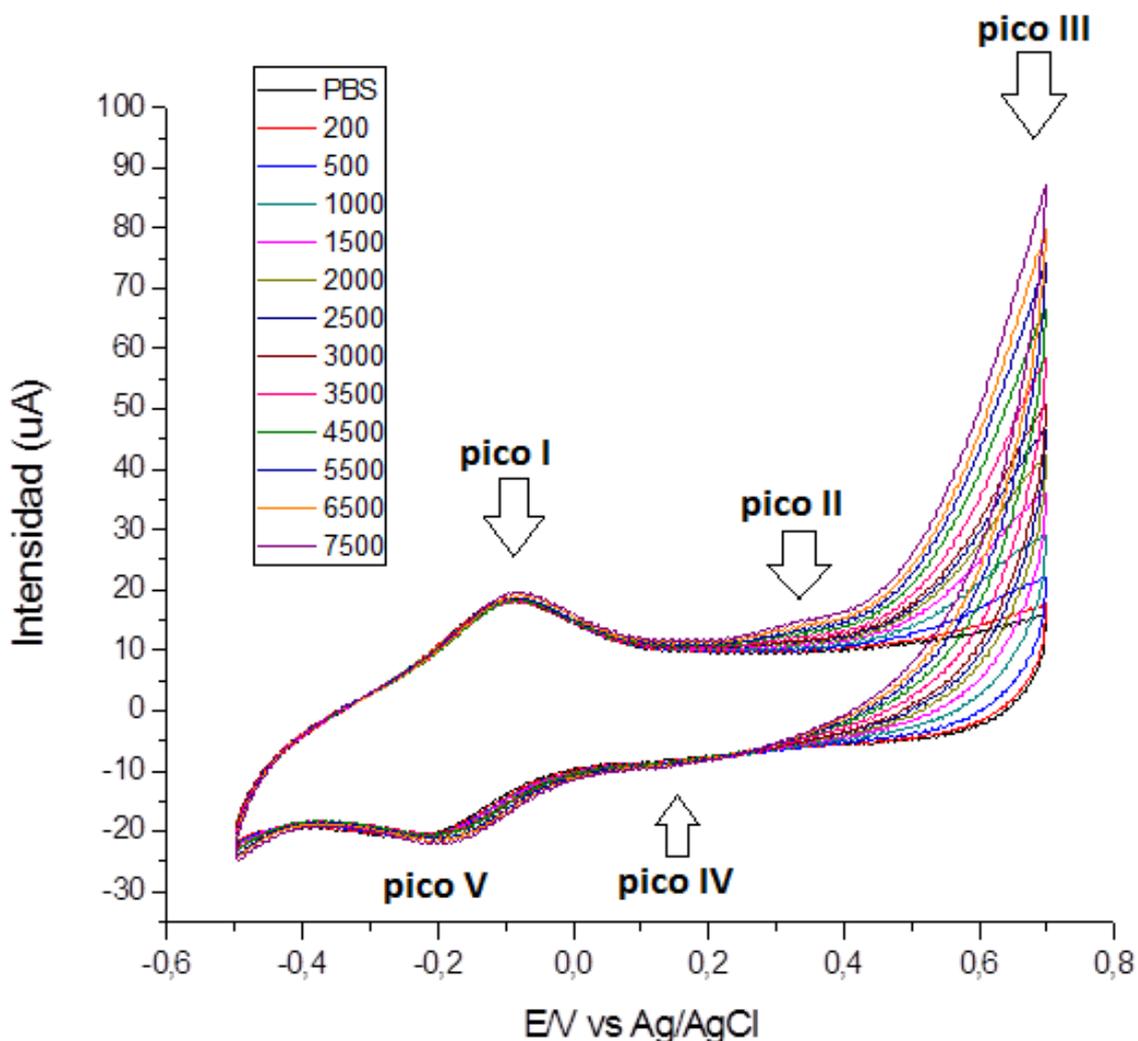


Fig. 4.55. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido gálico, empleando un electrodo de LuPc₂+AA(1:10)/Tyr.

- **Electrodo modificado de lacasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de

lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

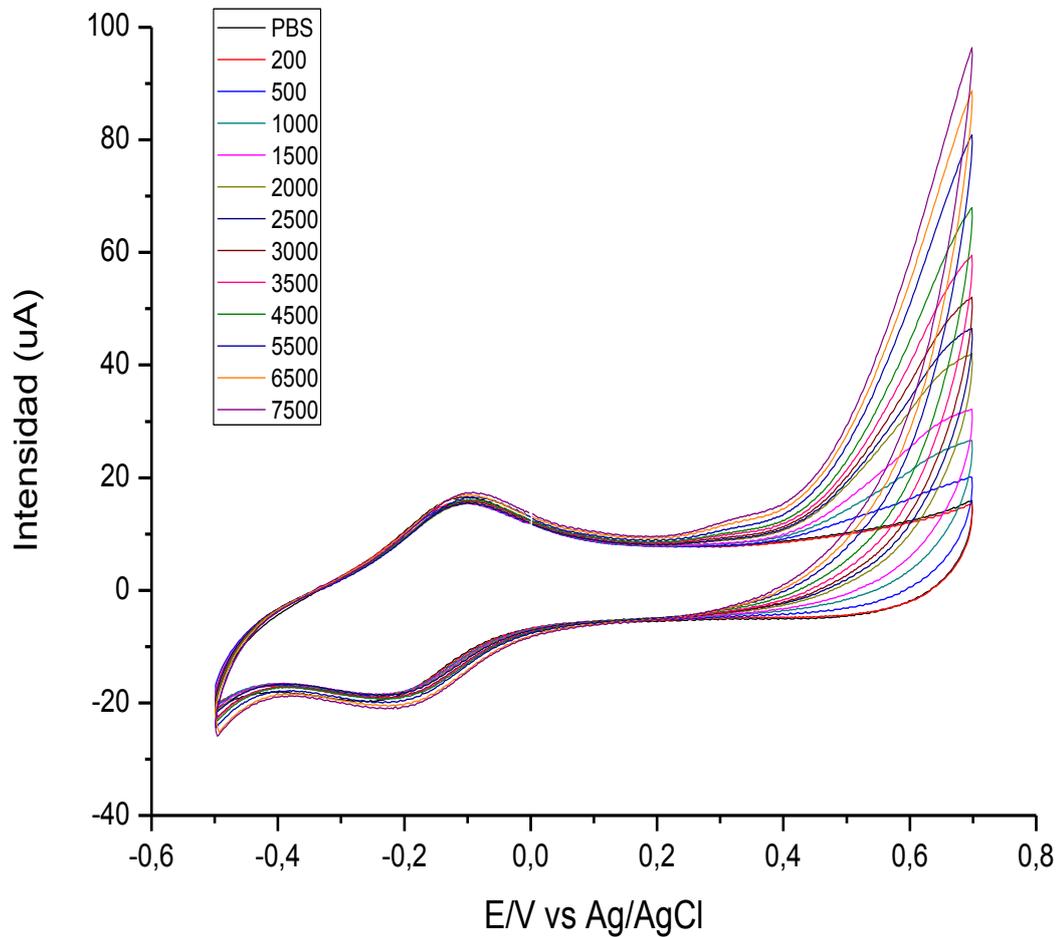


Fig. 4.56. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01M$, $\text{pH}=7$, con distintas adiciones de disolución de ácido gálico $10^{-3}M$ en buffer fosfato.

La situación observada para la lacasa es más similar a la del lutecio que a la del electrodo de tirosinasa, ya que el pico catódico asociado al pico II es inapreciable.

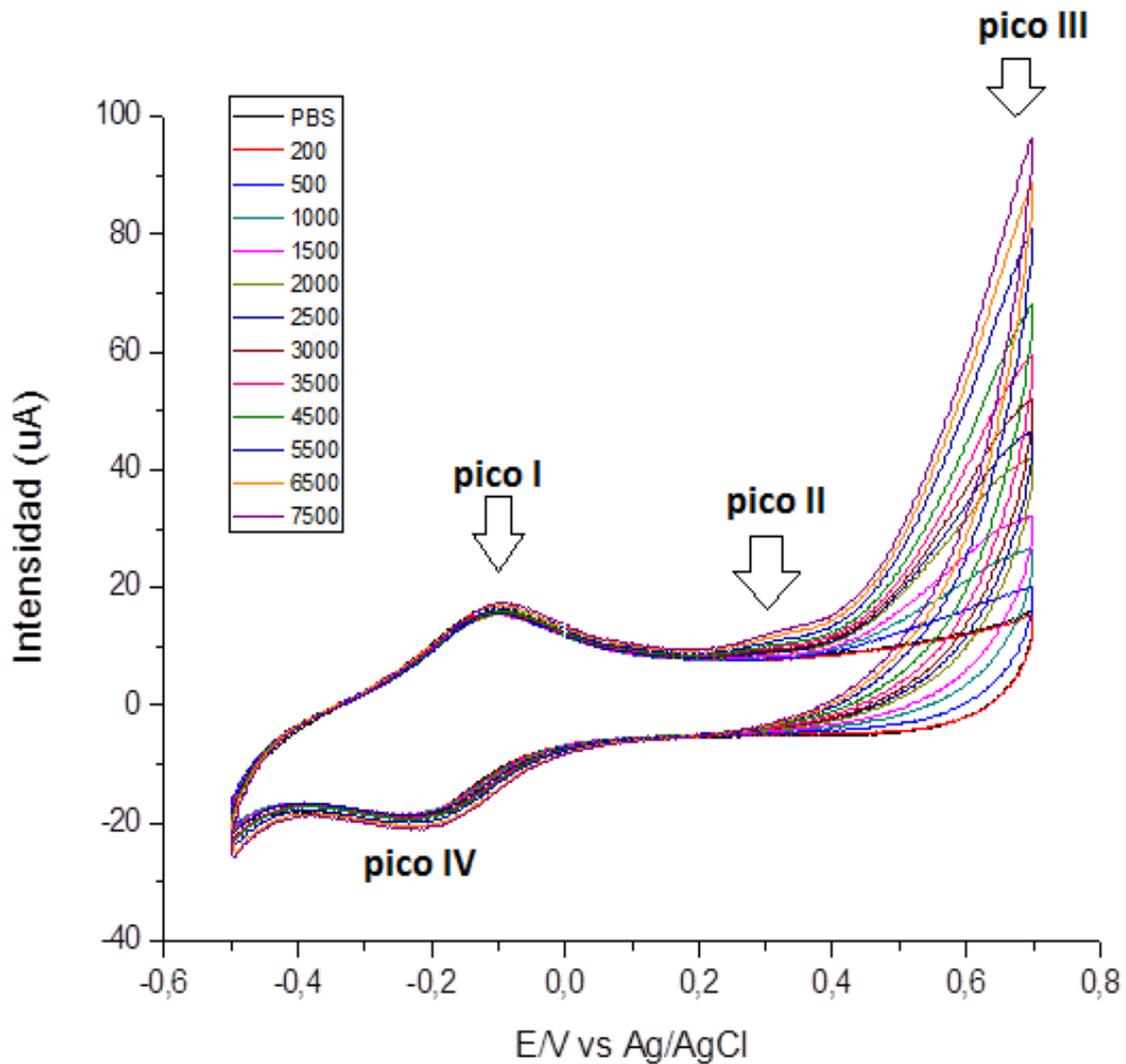


Fig. 4.57. Detalle de los picos de intensidad de corriente asociados a los procesos redox que tienen lugar en la voltametría cíclica para el ácido gálico, empleando un electrodo de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$.

- **Comparativa entre los distintos electrodos**

En la figura 4.58. se pueden observar con mayor detalle las diferencias existentes entre los tres tipos de electrodos modificados.

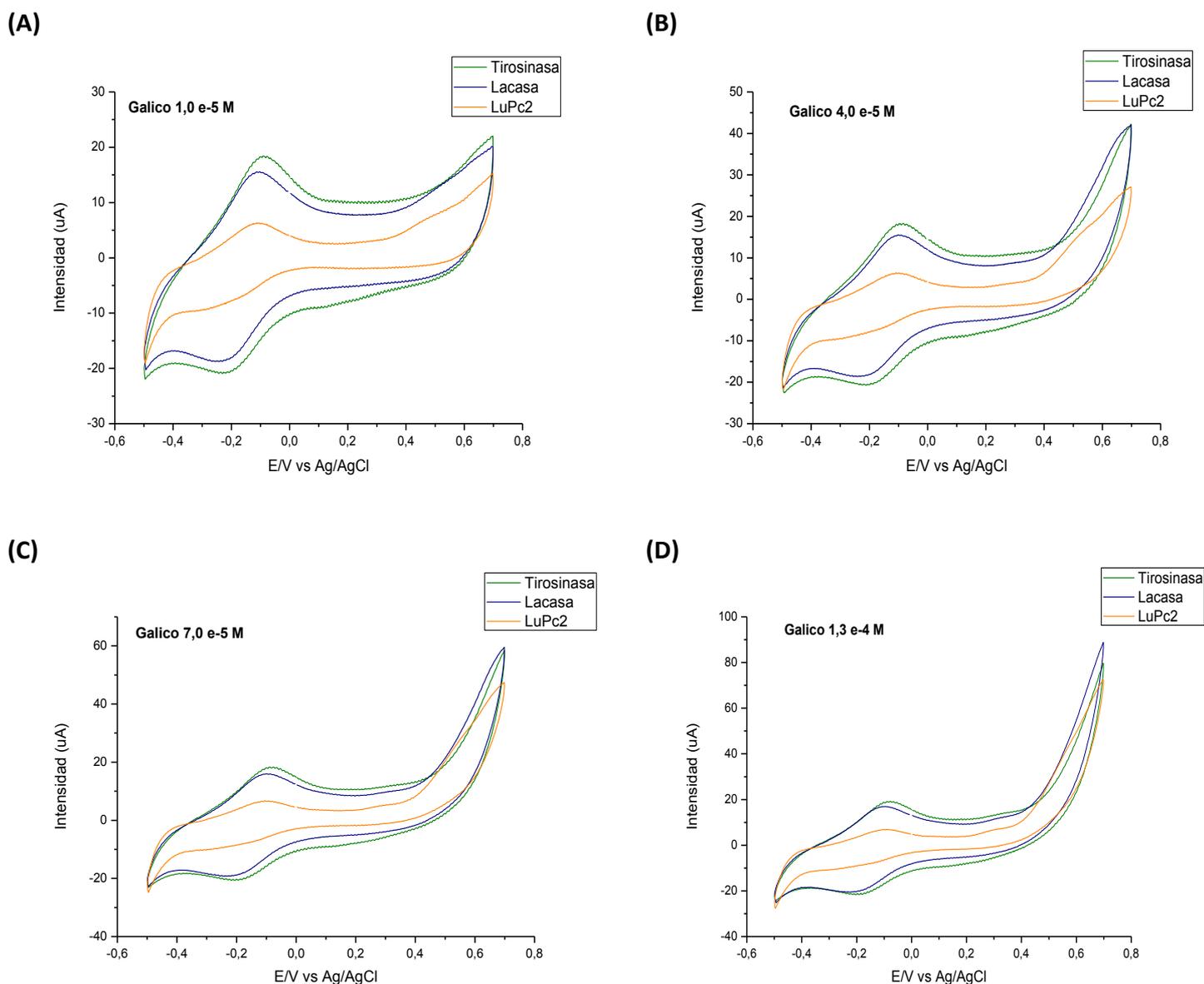


Fig. 4.58. Comparativa de los resultados obtenidos al realizar voltametrías cíclicas con electrodos de: $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$, $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ y $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$, frente a ácido gálico de concentraciones: (A) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, (B) $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, (C) $7,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ y (D) $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Para el ácido gálico de nuevo se aprecian diferencias notables entre las corrientes de fondo existentes para los electrodos de enzimas y el electrodo sin enzima, siendo en los electrodos enzimáticos mucho mayor. Estas diferencias en las corrientes de fondo se atenúan en cierto modo a medida de aumenta la concentración ya que al incrementarse la concentración aumentan los picos, especialmente el situado a un potencial de +0,7V, “estirando” el voltamograma.

En el caso del gálico se puede observar como los potenciales a los que tienen lugar los picos de intensidad son prácticamente coincidentes para los tres tipos de sensores. La única diferencia es la existencia de un pico catódico muy pequeño existente en el sensor de tirosinasa, que no aparece en el resto de los electrodos.

La respuesta de los electrodos para el ácido gálico es menos característica que la obtenida para el pirogalol, en el cual se distinguían todos los picos enzimáticos y electroquímicos con mucha claridad. Una de las razones que pueden esgrimirse para explicar este comportamiento puede encontrarse en el grupo ácido (ácido carboxílico, COOH) que presenta el ácido gálico y que no forma parte del pirogalol. Es posible que al tratarse de una molécula de mayor tamaño no encaje de la misma forma en el sitio activo y por ello se obtengan picos menos definidos.

4.3.3.2.5. Comparativa de las respuestas obtenidas para los distintos antioxidantes

Este apartado sirve para resumir los resultados obtenidos para los distintos antioxidantes respecto de un mismo sensor.

- **Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio**

En la comparativa se puede observar fácilmente como se obtienen respuestas distintas para cada antioxidante, lo cual nos permite diferenciarlos con claridad en relación al voltamograma obtenido. Estas diferencias se producen tanto en las señales de fondo, como en la posición de los picos y en la magnitud de dichos picos de intensidad.

También se pueden observar ciertas similitudes entre los difenoles.

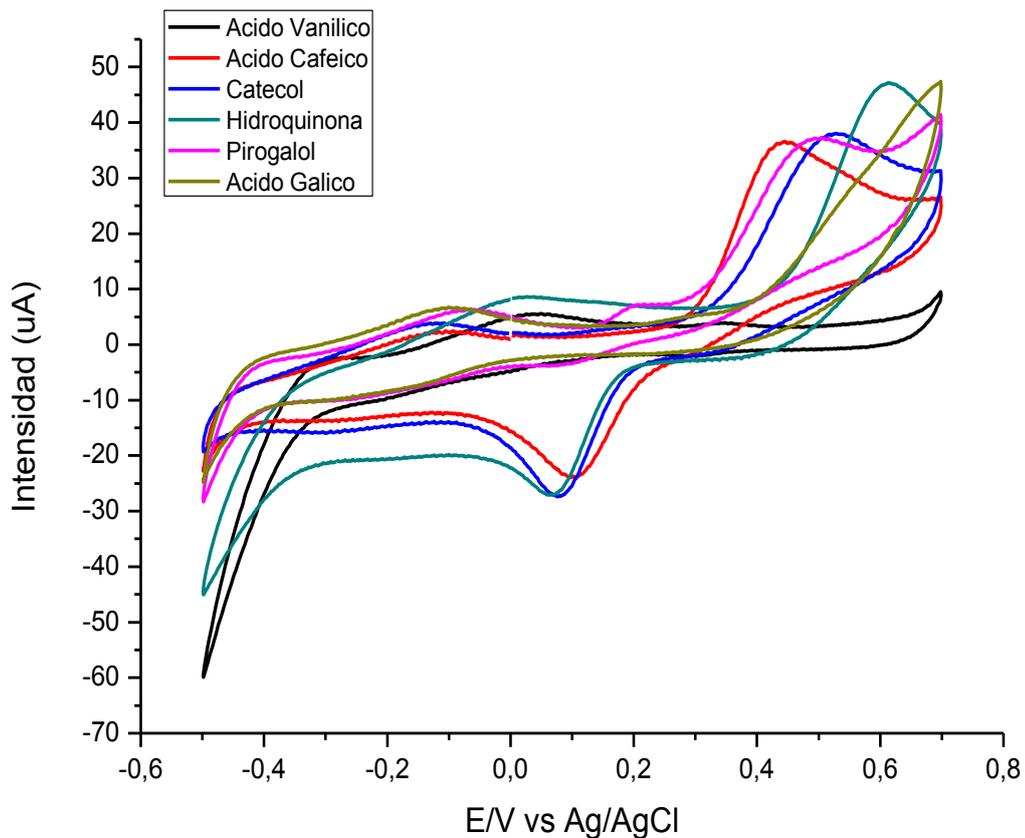


Fig. 4.59. Comparativa de las respuestas obtenidas para un electrodo de LuPc2+AA(1:10) frente a los distintos antioxidantes utilizados a lo largo del proyecto en concentración $9,0 \cdot 10^{-5} M$.

- **Electrodo modificado de tirosinasa**

Al igual que para el lutecio, se obtienen señales completamente distintas para cada antioxidante. Las señales de fondo en general son mayores, así como son mayores las intensidades de pico. También se observan similitudes entre los voltamogramas de los difenoles.

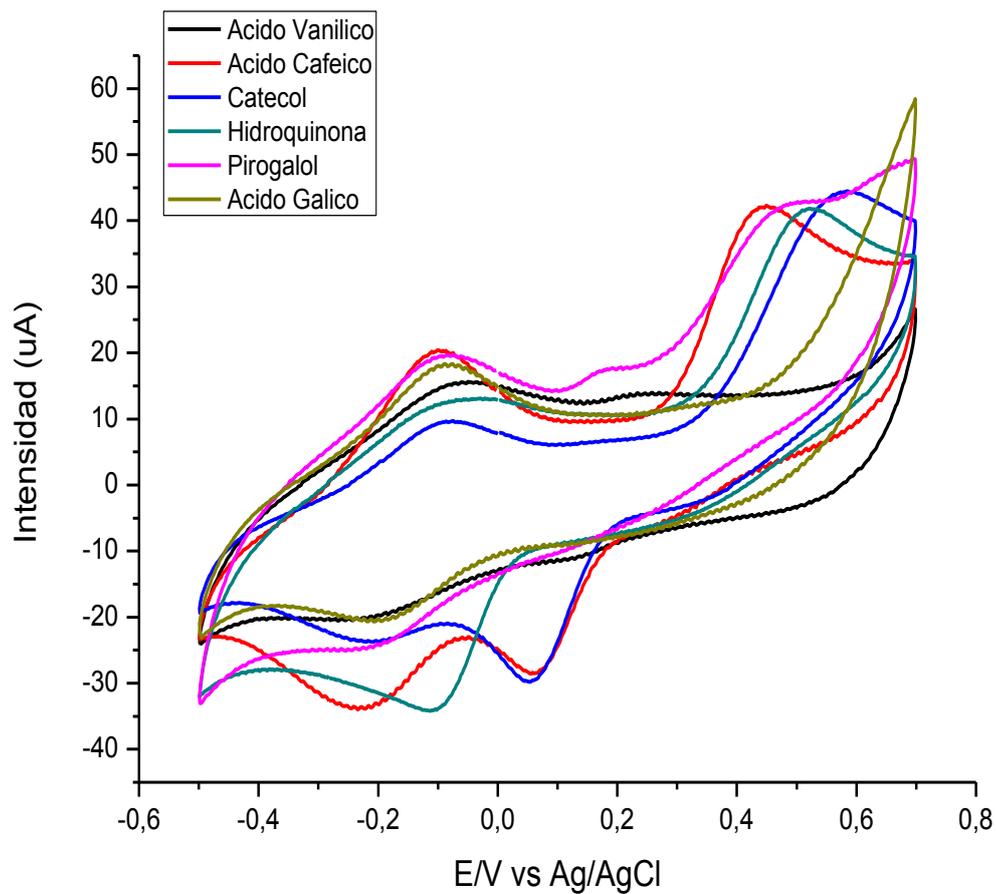


Fig. 4.60. Comparativa de las respuestas obtenidas para un electrodo de LuPc2+AA(1:10)/Tyr frente a los distintos antioxidantes utilizados a lo largo del proyecto en concentración $9,0 \cdot 10^{-5} M$.

- **Electrodo modificado de lacasa**

También el electrodo de lacasa proporciona un voltamograma de respuesta distinto para cada antioxidante, pudiendo observarse al igual que para los otros dos tipos de sensores, similitudes entre los voltamogramas de los difenoles.

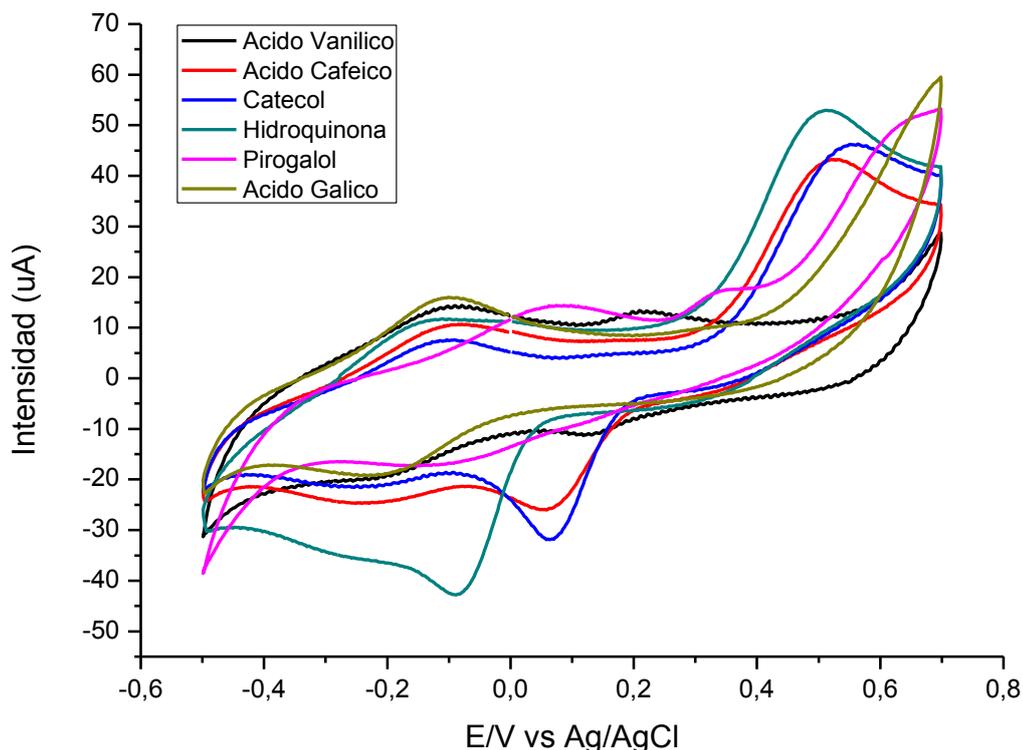


Fig. 4.61. Comparativa de las respuestas obtenidas para un electrodo de LuPc2+AA(1:10)/Lac frente a los distintos antioxidantes utilizados a lo largo del proyecto en concentración $9,0 \cdot 10^{-5} M$.

Por lo tanto para cada sensor se obtienen señales distintas para cada antioxidante y las respuestas obtenidas por cada sensor respecto de un mismo antioxidante también son distintas. Esta diversidad de respuestas nos permite caracterizar y diferenciar antioxidantes de un analito desconocido, pudiendo construir una red de sensores en la cual se integran con total funcionalidad los biosensores nanoestructurados de enzimas que se han desarrollado.

4.3.3.3. Límites de detección

4.3.3.3.1. Introducción

El **límite de detección (LDD)** se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Intuitivamente, el LDD sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente.

Para el cálculo del límite de detección en primer lugar se tabulan y representan gráficamente los valores de la intensidad de corriente de cada pico representativo, con respecto a la concentración de antioxidante.

Se realiza un ajuste lineal del cual se obtiene la ecuación de la recta:

$$y = b \cdot x + a$$

Por otra parte, se toman los datos de los valores de la intensidad de la corriente para los potenciales a los que tiene lugar cada pico para el ensayo en blanco, es decir, habiendo en la celda 50 mL de disolución buffer de fosfato 0,01M (PBS) sin que se haya añadido antioxidante. Teniendo en cuenta, que para el ensayo en blanco se realizan 5 ciclos, se desestima el primer ciclo y se realiza un estudio estadístico descriptivo de los valores de la intensidad de los cuatro ciclos restantes obtenidos para cada pico. De este estudio se obtiene el valor de la desviación estándar (SD).

El límite de detección para cada pico será igual a:

$$LDD = \frac{3 \cdot SD}{b}$$

Para mostrar los datos obtenidos se trabajará pico a pico, es decir, se toma uno de los picos que se ha seleccionado para su estudio y se analiza el límite de detección de dicho pico para los distintos electrodos con los que se trabaja. Luego se pasa al siguiente y se realiza lo mismo y así sucesivamente. Finalmente se presenta un cuadro resumen.

Los datos de referencia para este estudio se obtienen a partir de las experiencias realizadas en los ensayos de concentraciones.

4.3.3.3.2. Monofenoles

A) Ácido vanílico

En el ácido vanílico podemos analizar tres picos en los cuales se aprecian diferencias notables.

En primer lugar, para mostrar cual ha sido la forma de operar para obtener las distintas gráficas y resultados de los valores del límite de detección se va a detallar el proceso para el pico situado a 200 mV del ácido vanílico medido con el electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio y araquídico.

La tabla 4.2. resume los valores obtenidos de la máxima intensidad para el pico de 200 mV a cada una de las concentraciones de trabajo.

Potencial (mV)	200	
Volumen añadido (uL)	Concentración (M)	Intensidad (uA)
200	4,00E-06	2,34619
500	1,00E-05	2,55127
1000	2,00E-05	2,65442
1500	3,00E-05	2,95288
2000	4,00E-05	3,2251
2500	5,00E-05	3,47046
3000	6,00E-05	3,58948
3500	7,00E-05	3,74878
4500	9,00E-05	3,80859
5500	1,10E-04	3,93982
6500	1,30E-04	4,23035
7500	1,50E-04	4,33594

Tabla 4.2. Valores de intensidad de corriente en función de la concentración de ácido vanílico para el pico situado a un potencial de +0,2V, electrodo de LuPc₂+AA (1:10).

Se hace una representación de dicho máximo de intensidad frente a la concentración de antioxidante, de donde se recoge el valor de la pendiente.

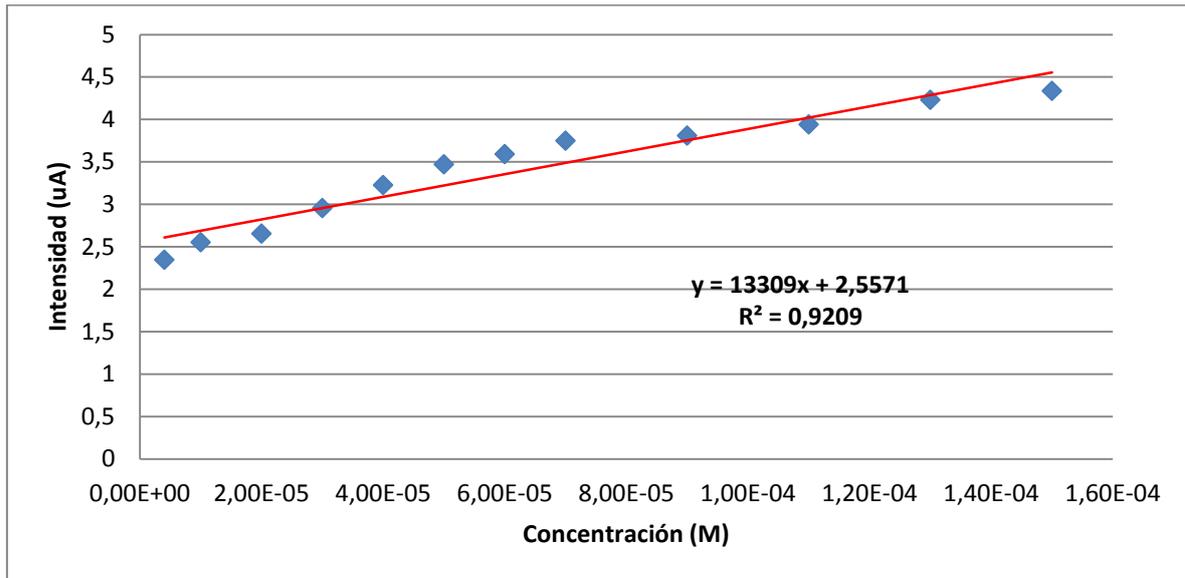


Fig. 4.62. Representación de la intensidad frente a la concentración de ácido vanílico para el pico situado a +0,2V.

Con los datos de esos máximos de intensidad obtenidos para los cuatro últimos ciclos del ensayo en blanco se realiza un estudio estadístico de cara a obtener el valor de la desviación estándar.

nº ciclo	Intensidad (uA) PBS
2	2,13318
3	2,16675
4	2,25647
5	2,28638

Tabla 4.3. Valores de intensidad de corriente para el pico situado a un potencial de +0,2V a distintos ciclos con el ensayo en blanco.

El estudio estadístico se ha realizado con Microsoft Excel 2010 y aparte de los mostrados en la tabla 4.4. también proporciona otros parámetros que no se han considerado de interés.

Media	2,210695
Error típico	0,03624374
Mediana	2,21161
SD	0,07248749
Varianza de la muestra	0,00525444

Tabla 4.4. Análisis estadístico de los datos de la tabla 4.3.

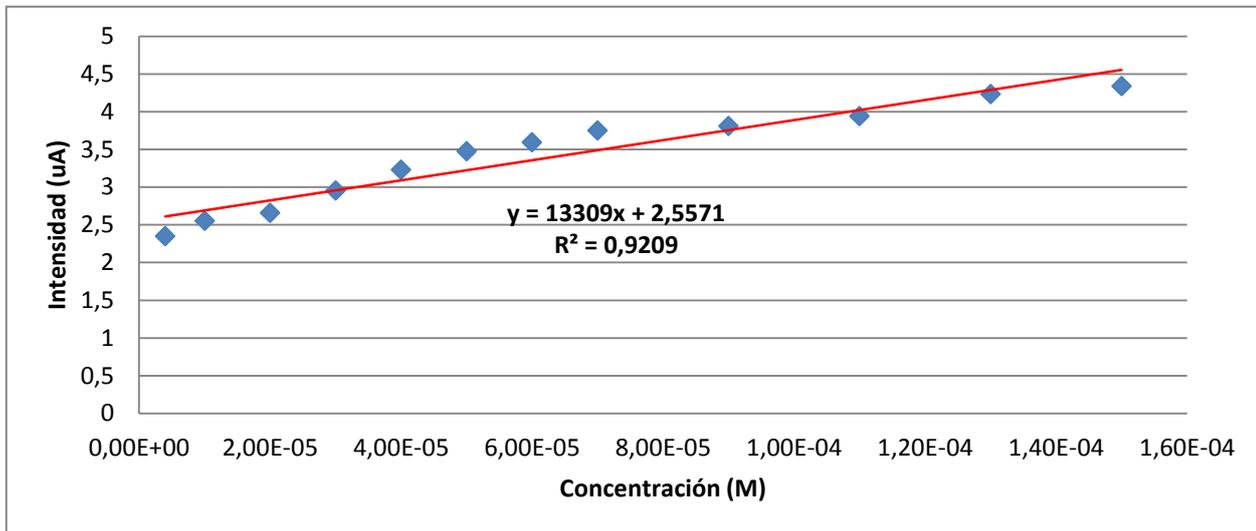
Con los valores de la pendiente de la recta y de la desviación estándar se obtiene el valor del límite de detección:

$$LDD = \frac{3 \cdot SD}{b} = \frac{3 \cdot 0,07248}{13309} = 1,63 \cdot 10^{-5} M$$

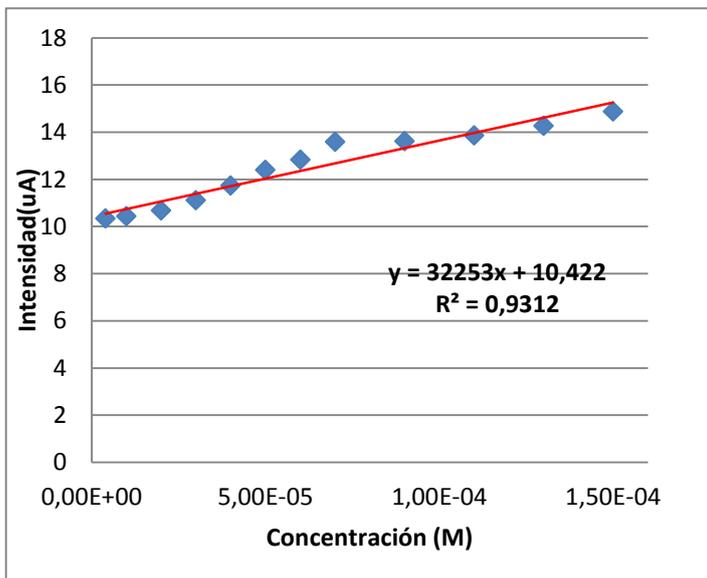
De forma análoga se trabaja con el resto de picos y el resto de electrodos. Una vez explicado cual es modo de operar detallado para la obtención de los límites de detección, se procederá a expresar los resultados de forma resumida. Para ello tan solo se expondrán las gráficas que muestran la relación intensidad frente a concentración para cada pico de intensidad y los valores finales de los límites de detección que se constituyen como los datos de mayor interés.

1) Pico de intensidad a un potencial de 200 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

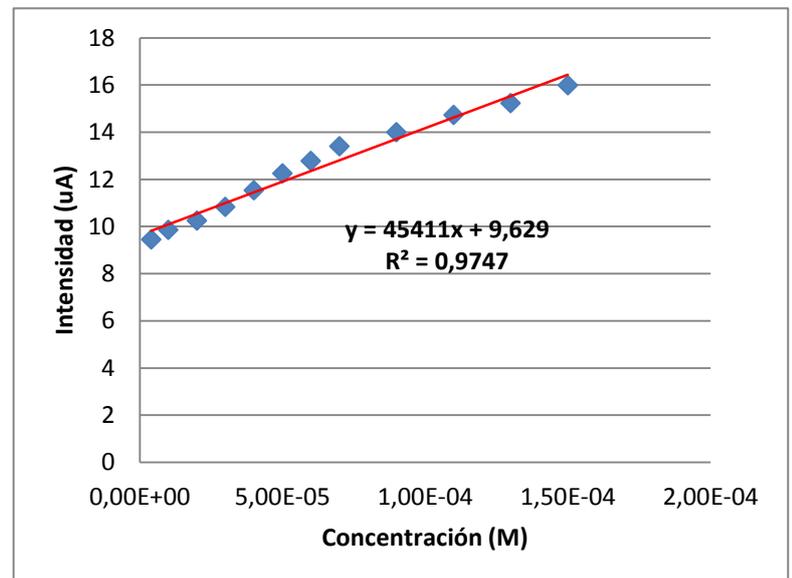


Fig. 4.63. Representación de la intensidad frente a la concentración de ácido vanílico del pico situado a 200 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

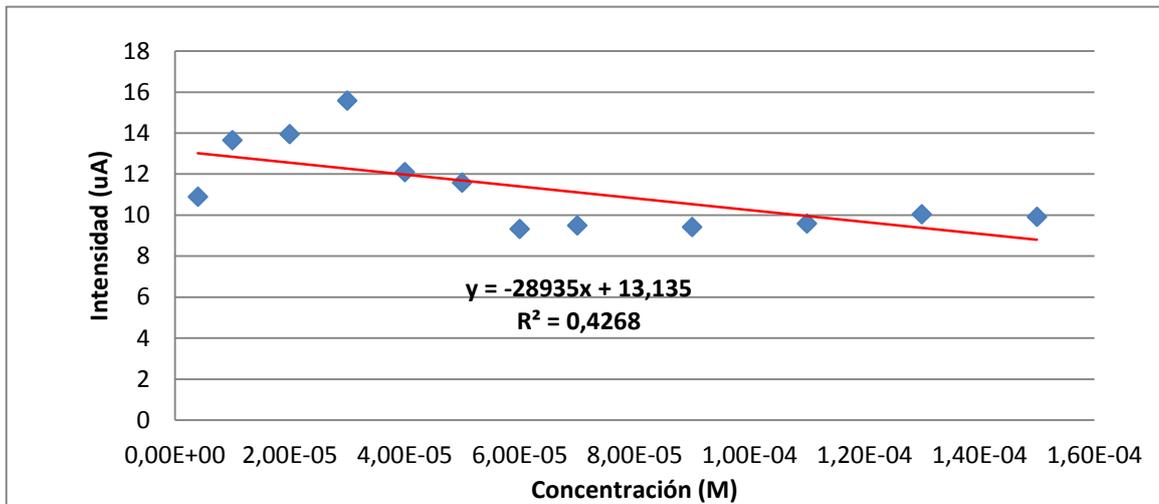
En la tabla 4.5. se puede observar como el límite de detección más bajo para este pico se obtiene con el lutecio seguido muy de cerca por la lacasa. Esto es algo que a priori no cabría esperar, especialmente debido a que el límite de detección de la tirosinasa es bastante mayor.

ÁCIDO VANÍLICO				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
200	LUTECIO	1,63E-05	16,34	0,9209
	TIROSINASA	2,10E-04	209,57	0,9619
	LACASA	1,72E-05	17,18	0,9747

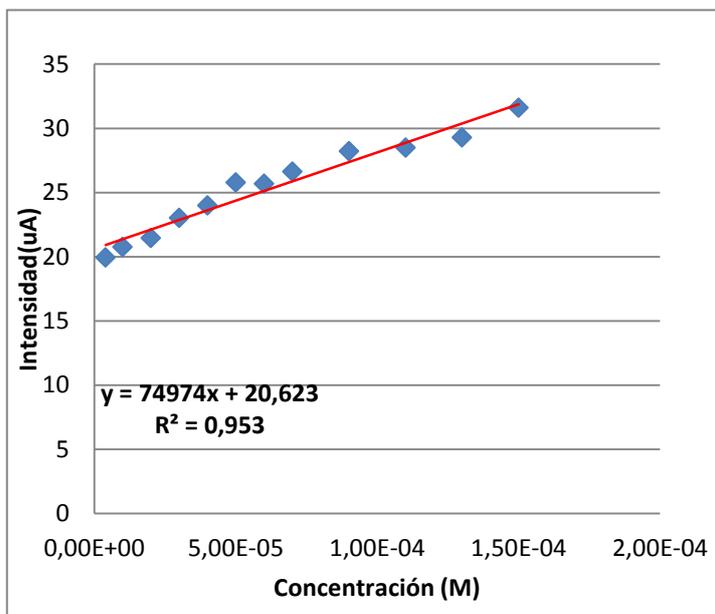
Tabla 4.5. Límites de detección para el pico situado a 200 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

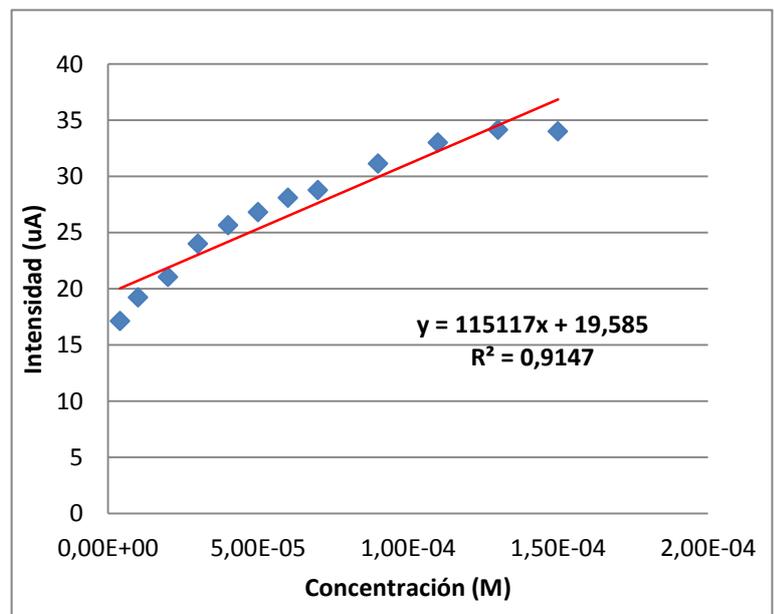


Fig. 4.64. Representación de la intensidad frente a la concentración de ácido vanílico del pico situado a 700 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

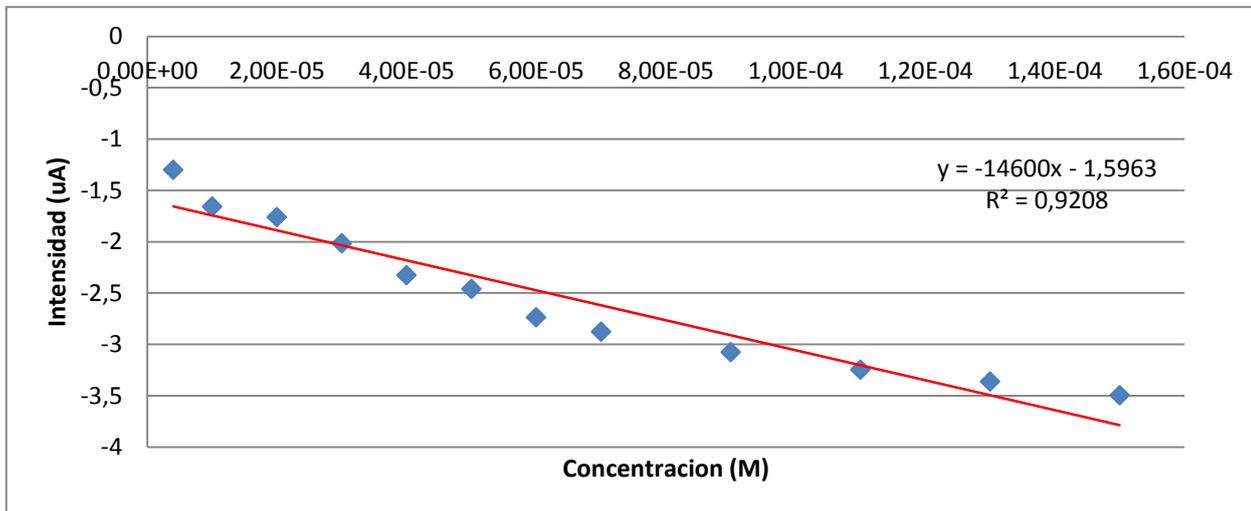
En la tabla 4.6. se aprecia como el límite de detección de la tirosinasa es de nuevo superior al del lutecio y al de la lacasa, siendo este último el menor con diferencia, del orden de unidades μM .

ÁCIDO VANÍLICO				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (μM)	R2
700	LUTECIO	6,97E-05	69,70	0,4268
	TIROSINASA	3,63E-04	362,74	0,9676
	LACASA	5,15E-06	5,15	0,9147

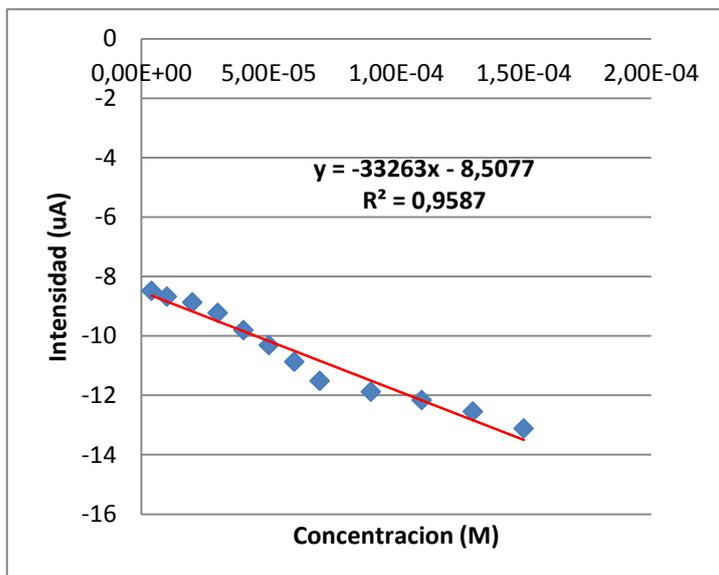
Tabla 4.6. Límites de detección para el pico situado a 200 mV.

3) Pico de intensidad a un potencial de 100 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

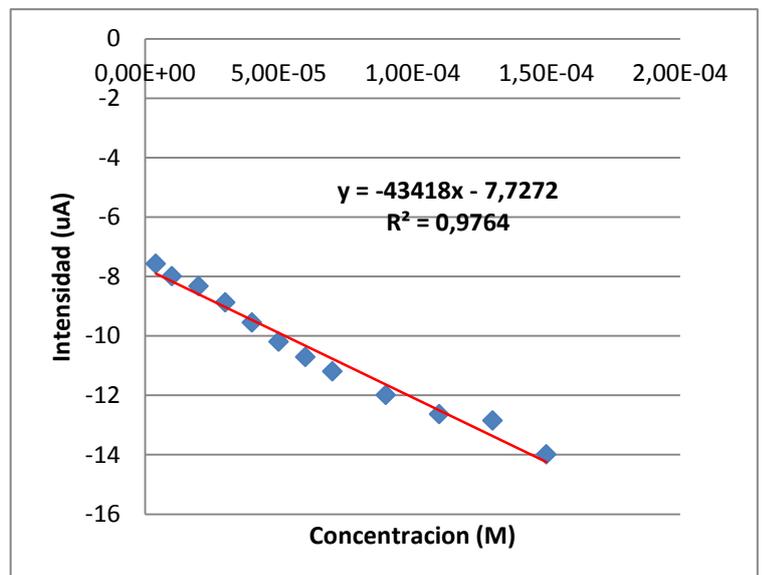


Fig. 4.65. Representación de la intensidad frente a la concentración de ácido vanílico del pico situado a 100 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

Los resultados de la tabla 4.7. nos indican que los límites de detección obtenidos para los tres sensores entran dentro del mismo orden, siendo ligeramente inferiores en el caso del lutecio.

ÁCIDO VANÍLICO				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
100	LUTECIO	1,20E-05	12,02	0,9208
	TIROSINASA	1,29E-05	12,89	0,9753
	LACASA	1,39E-05	13,91	0,9764

Tabla 4.7. Límites de detección para el pico situado a 100 mV.

En relación a los resultados obtenidos, puede concluirse que el electrodo de lutecio es el más sensible de todos, ya que a nivel general presenta los límites de detección más bajos.

Los electrodos de lacasa también presentan un buen comportamiento en relación a los de lutecio, especialmente en el pico situado a 700 mV donde son capaces de detectar en el orden de μM .

Los menos sensibles a la hora de detectar el ácido vanílico son los electrodos de tirosinasa.

ÁCIDO VANÍLICO				
MOLÉCULA	POTENCIAL (mV)	LD (M)	LD (uM)	R2
LUTECIO	200	1,63E-05	16,34	0,9209
	700	6,97E-05	69,70	0,4268
	100	1,20E-05	12,02	0,9208
LACASA	200	1,72E-05	17,18	0,9747
	698	5,15E-06	5,15	0,9147
	110	1,39E-05	13,91	0,9764
TIROSINASA	200	2,10E-04	209,57	0,9619
	700	3,63E-04	362,74	0,9676
	100	1,29E-05	12,89	0,9753

Tabla 4.8. Cuadro resumen de los límites de detección del ácido vanílico.

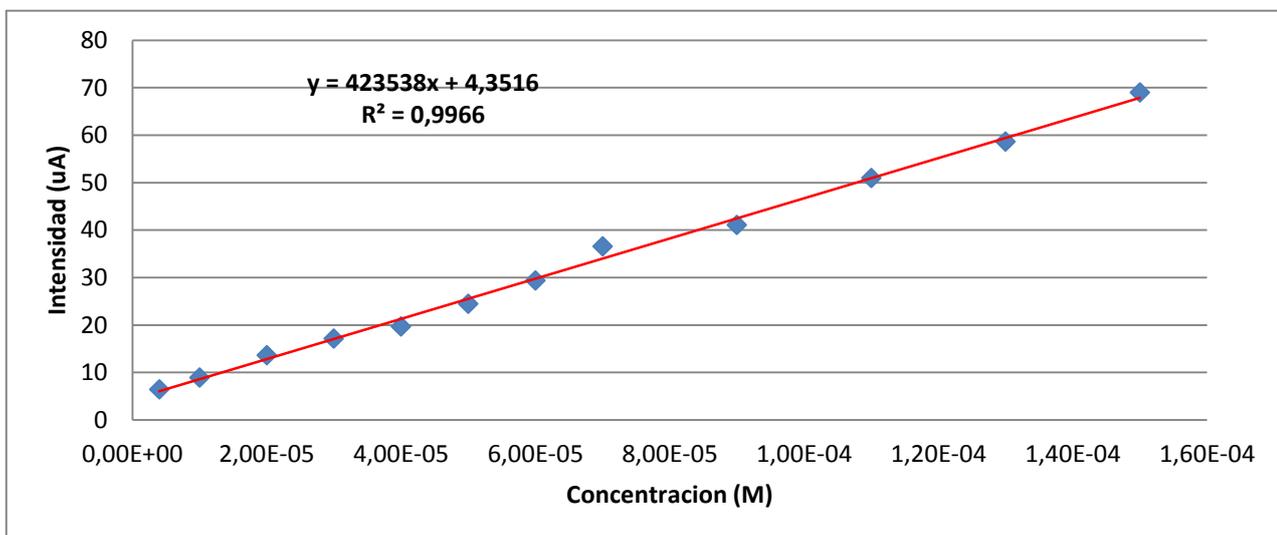
4.3.3.3. Difenoles

B) Ácido cafeico

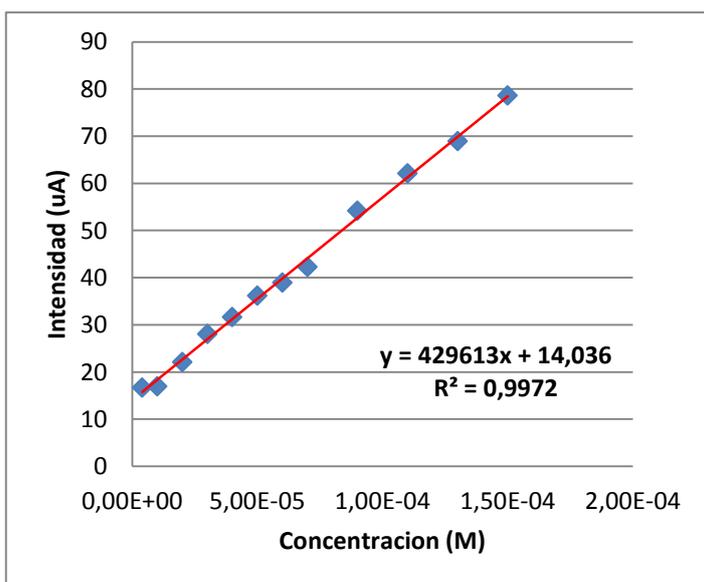
Para el ácido cafeico se realiza un análisis de los límites de detección para dos picos, los situados a potenciales de: 450 y 100 mV (tomando como referencia el lutecio).

1) Pico de intensidad a un potencial de 450 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

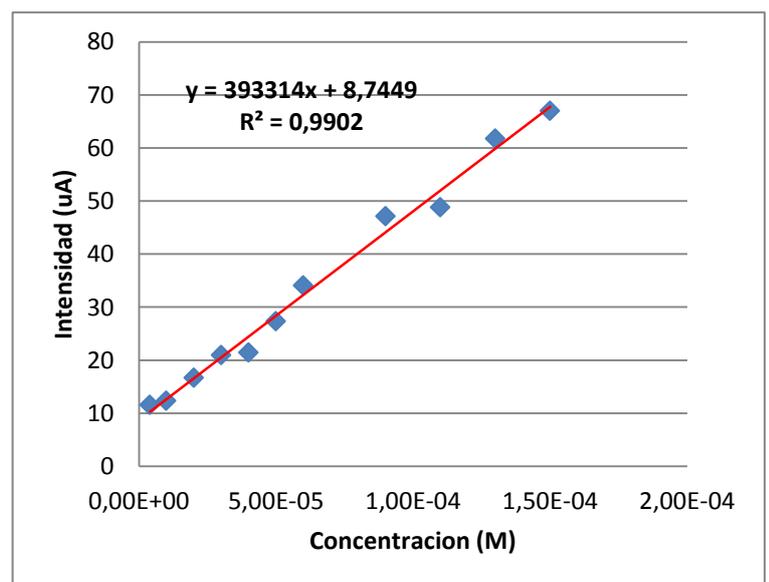


Fig. 4.66. Representación de la intensidad frente a la concentración de ácido cafeico del pico situado a 450 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

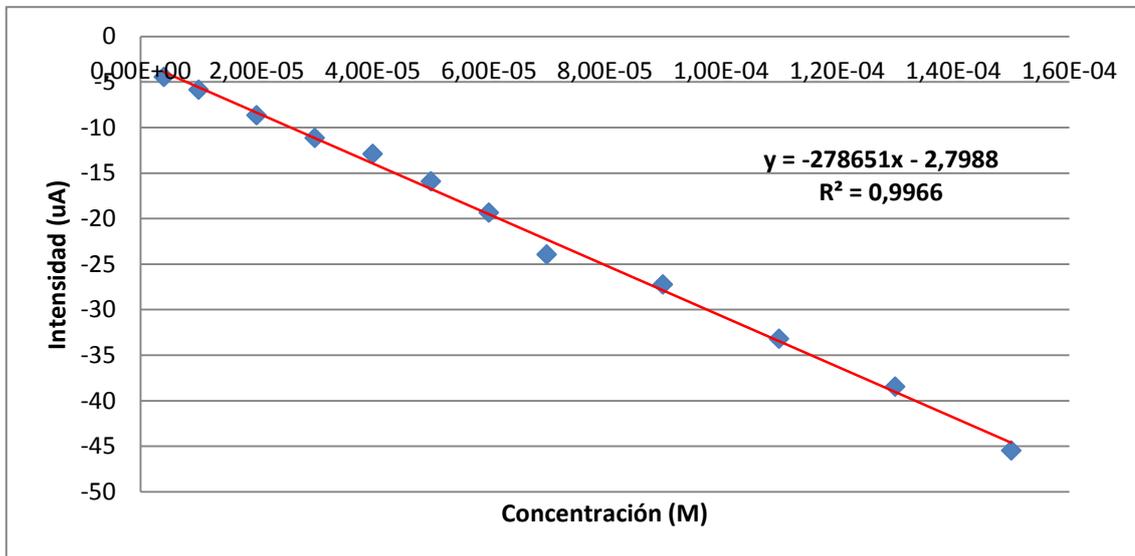
Se puede observar en la tabla 4.9. que los límites de detección más bajos se obtienen para el lutecio y la lacasa, siendo el peor de todos, el obtenido para la tirosinasa que se diferencia de los otros dos en un orden de unidades. Son límites de detección muy bajos, se pueden detectar concentraciones realmente bajas.

ÁCIDO CAFEICO				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
450	LUTECIO	6,5384E-07	0,65	0,9966
	TIROSINASA	2,35E-06	2,35	0,9972
	LACASA	5,769E-07	0,58	0,9902

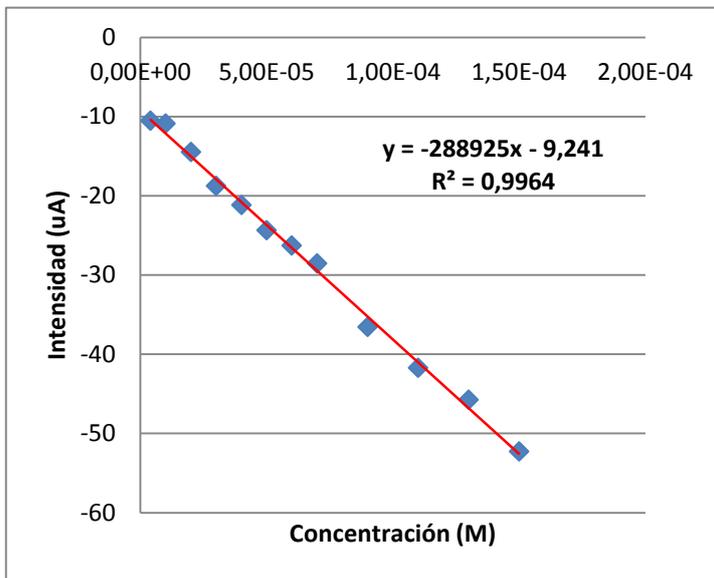
Tabla 4.9. Límites de detección para el pico situado a 450 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 100 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

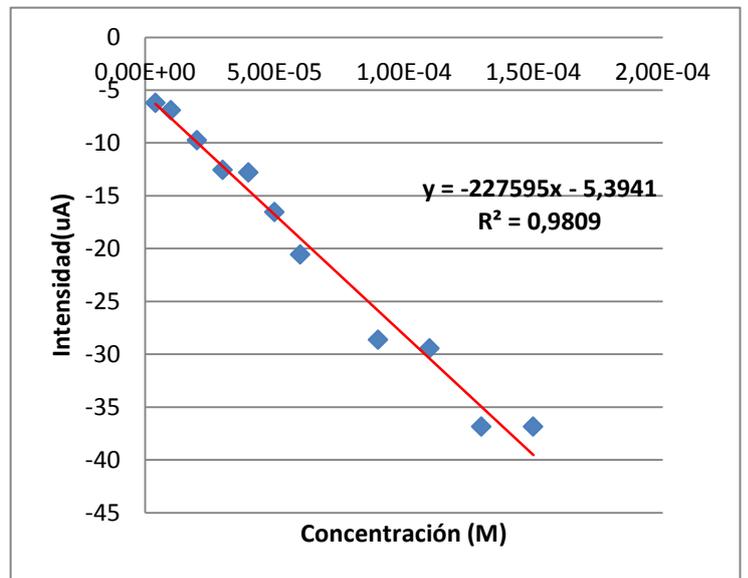


Fig. 4.67. Representación de la intensidad frente a la concentración de ácido cafeico del pico situado a 100 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

Para este segundo pico los mejores resultados se obtienen para los electrodos de enzimas.

ÁCIDO CAFEICO				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
100	LUTECIO	3,3592E-06	3,36	0,9966
	TIROSINASA	1,50E-06	1,50	0,9964
	LACASA	7,74E-07	0,77	0,9809

Tabla 4.10. Límites de detección para el pico situado a 100 mV.

Se puede observar en la tabla 4.11. como los límites de detección son en general muy bajos, especialmente en los electrodos de lacasa. Las diferencias los límites de detección de los dos picos objeto del estudio no son muy notables excepto para el caso del lutecio.

ÁCIDO CAFEICO				
MOLÉCULA	POTENCIAL (mV)	LD (M)	LD (uM)	R2
LUTECIO	450	6,5384E-07	0,65	0,9966
	100	3,3592E-06	3,36	0,9966
LACASA	520	5,769E-07	0,58	0,9902
	55	7,74E-07	0,77	0,9809
TIROSINASA	500	2,35E-06	2,35	0,9972
	60	1,50E-06	1,50	0,9964

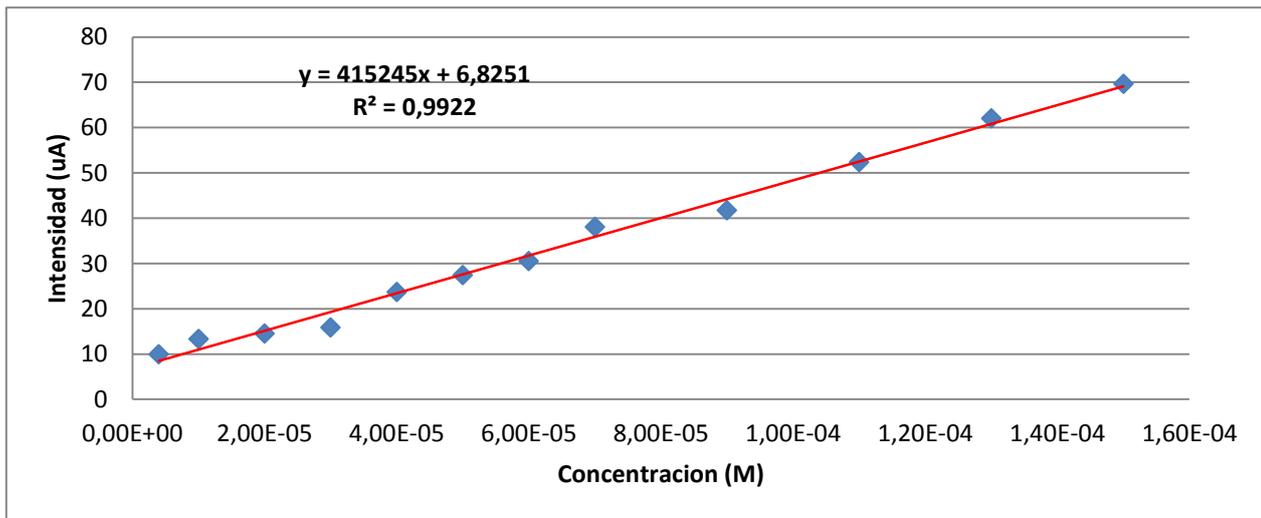
Tabla 4.11. Cuadro resumen de los límites de detección del ácido cafeico.

C) Catecol

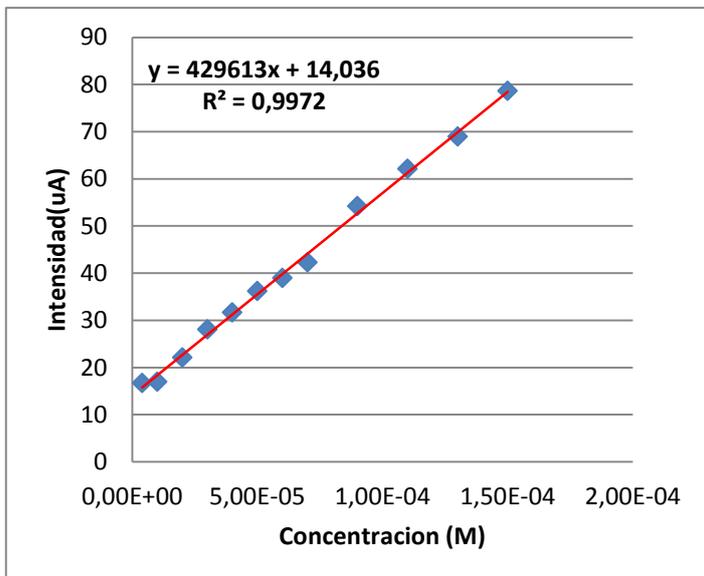
Para el catecol se analizan de detección referidos a dos picos situados uno aproximadamente a 80 mV y otro a aproximadamente 550 mV (los potenciales varían según el electrodo)

1) Pico de intensidad a un potencial de 550 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

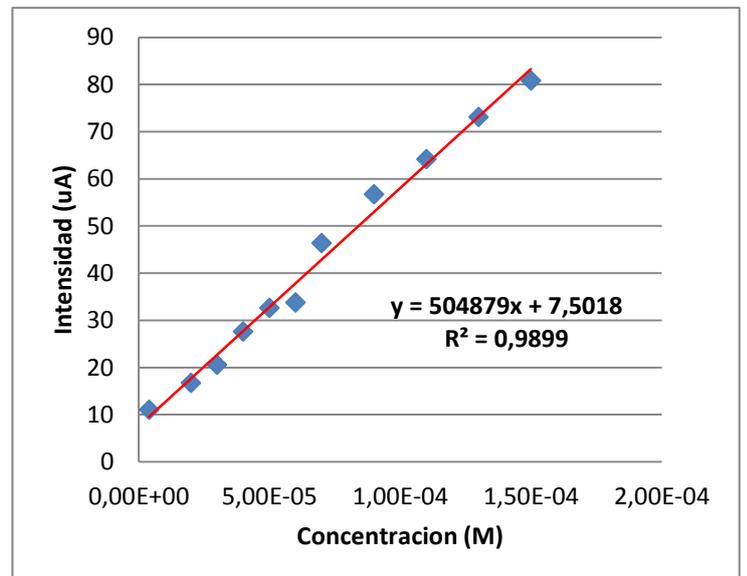


Fig. 4.68. Representación de la intensidad frente a la concentración de catecol del pico situado a 550 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

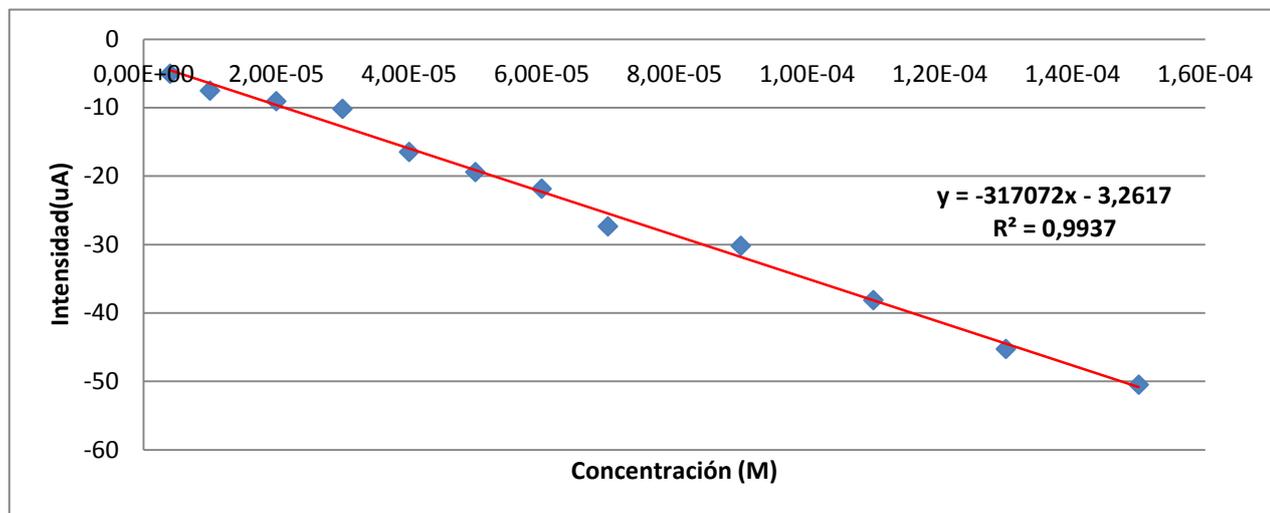
Los límites de detección son muy bajos, aproximadamente se encuentran en el orden de magnitud obtenido para el mismo pico del otro difenol, el ácido cafeico. Cabe destacar que los límites más bajos son los obtenidos para los electrodos enzimáticos, especialmente para el de lacasa.

CATECOL				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
550	LUTECIO	4,2765E-06	4,28	0,9922
	TIROSINASA	1,4389E-06	1,44	0,996
	LACASA	4,59E-07	0,46	0,9899

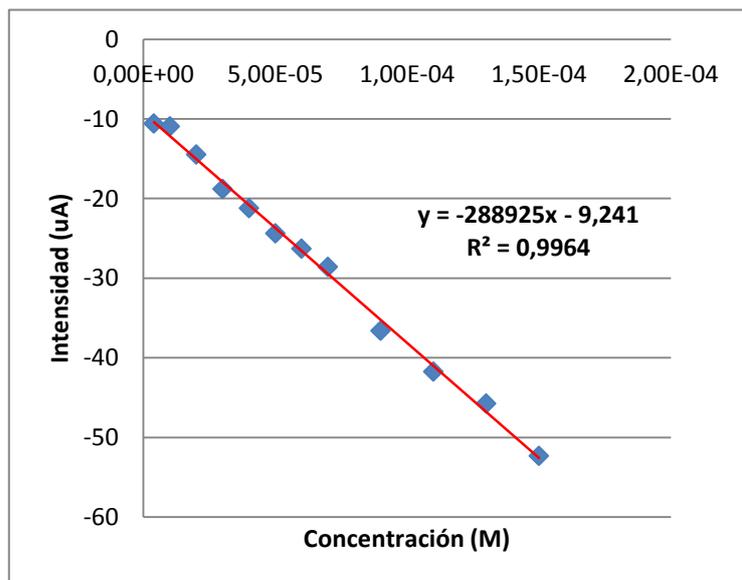
Tabla 4.12. Límites de detección para el pico situado 550 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 70 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

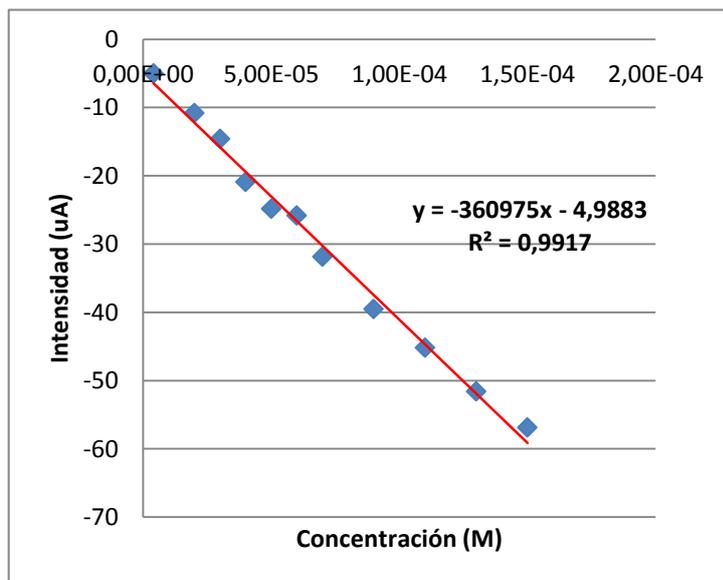


Fig. 4.69. Representación de la intensidad frente a la concentración de catecol del pico situado a 70 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

Los límites obtenidos son similares a los obtenidos anteriormente, sin embargo, en esta ocasión los mejores resultados vienen dados para el electrodo de tirosinasa.

CATECOL				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
70	LUTECIO	1,3845E-06	1,38	0,9937
	TIROSINASA	5,1840E-07	0,52	0,9964
	LACASA	1,43E-06	1,43	0,9917

Tabla 4.13. Límites de detección para el pico situado 70 mV.

En la tabla 4.14. se puede observar como todos los límites de detección están en el orden de entre 10^6 y 10^7 , resultados muy similares a los obtenidos para el otro difenol.

CATECOL				
MOLÉCULA	POTENCIAL (mV)	LD (M)	LD (uM)	R2
LUTECIO	530	4,2765E-06	4,28	0,9922
	80	1,3845E-06	1,38	0,9937
LACASA	550	4,59E-07	0,46	0,9899
	65	1,43E-06	1,43	0,9917
TIROSINASA	600	1,4389E-06	1,44	0,996
	60	5,1840E-07	0,52	0,9974

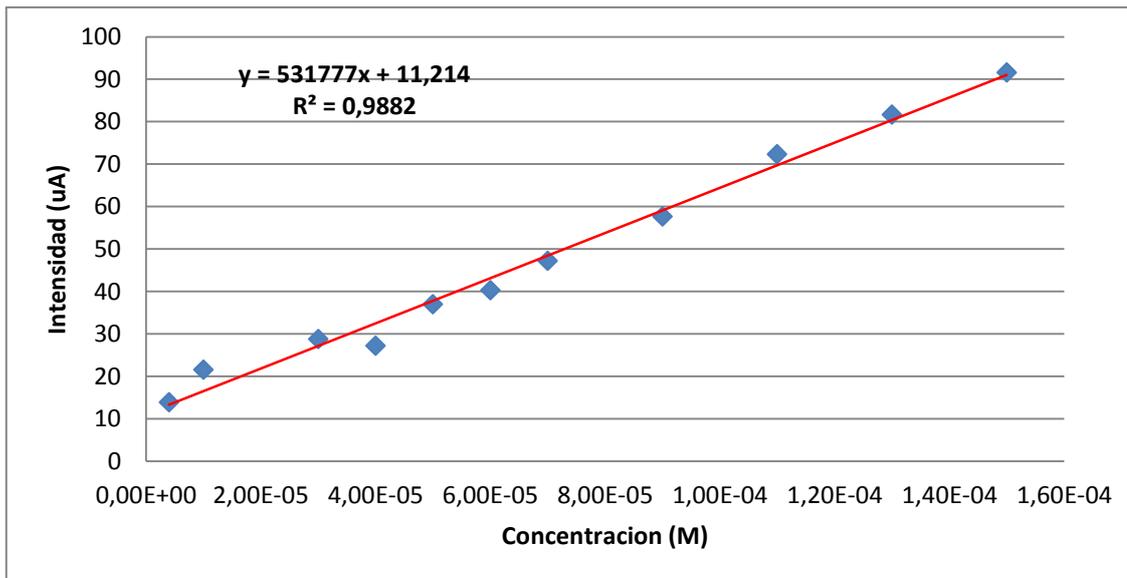
Tabla 4.14. Cuadro resumen de los límites de detección del catecol.

D) Hidroquinona

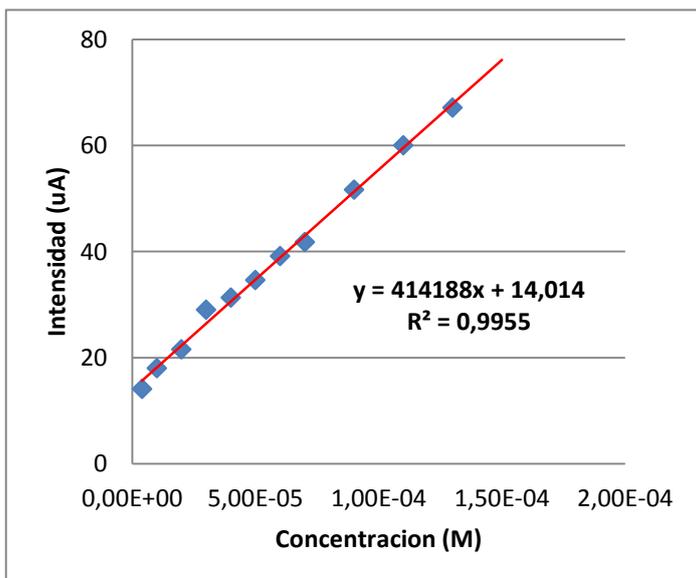
En la hidroquinona se analizan también dos picos, al igual que para los otros dos difenoles. Dichos picos están situados a +600 mV y a +60 mV (respecto del lutecio).

1) Pico de intensidad a un potencial de 600 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

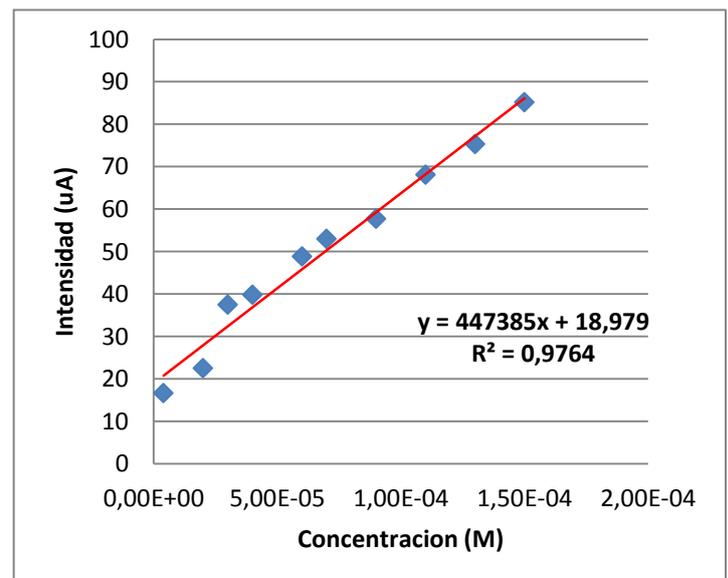


Fig. 4.70. Representación de la intensidad frente a la concentración de hidroquinona del pico situado a 600 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

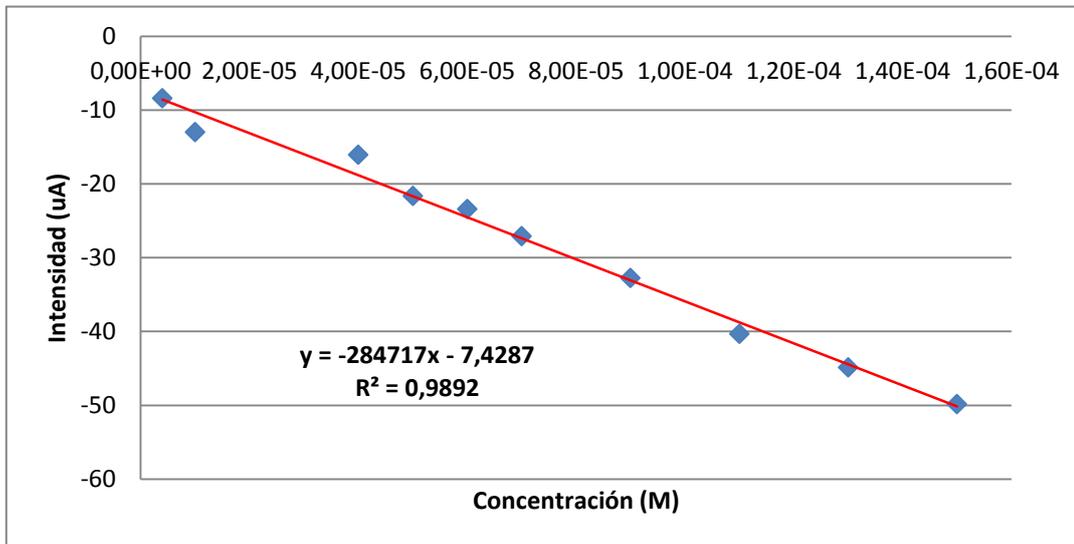
Se puede ver que los límites de detección son bajos, especialmente el obtenido para la lacasa, seguido del lutecio, siendo el de tirosinasa el que proporciona una menor sensibilidad.

HIDROQUINONA				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
600	LUTECIO	7,4597E-07	0,75	0,9882
	TIROSINASA	1,8739E-06	1,87	0,9955
	LACASA	5,7147E-07	0,57	0,9764

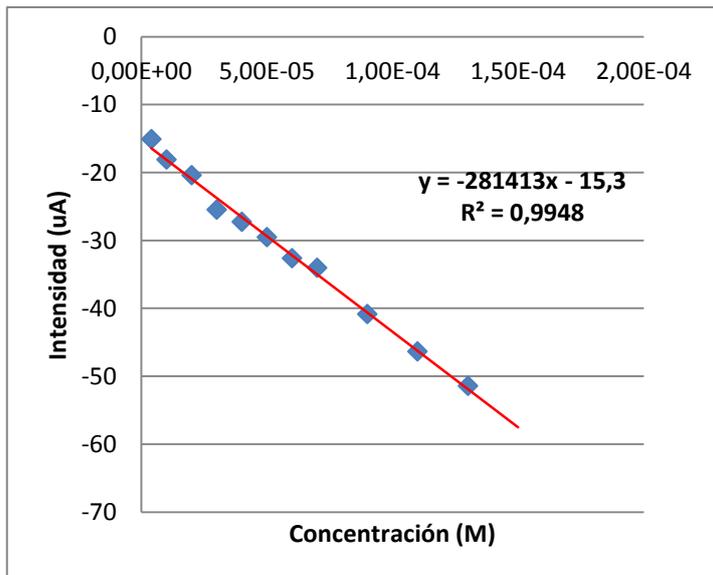
Tabla 4.15. Límites de detección para el pico situado a 600 mV

2) Pico de intensidad a un potencial de 60 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

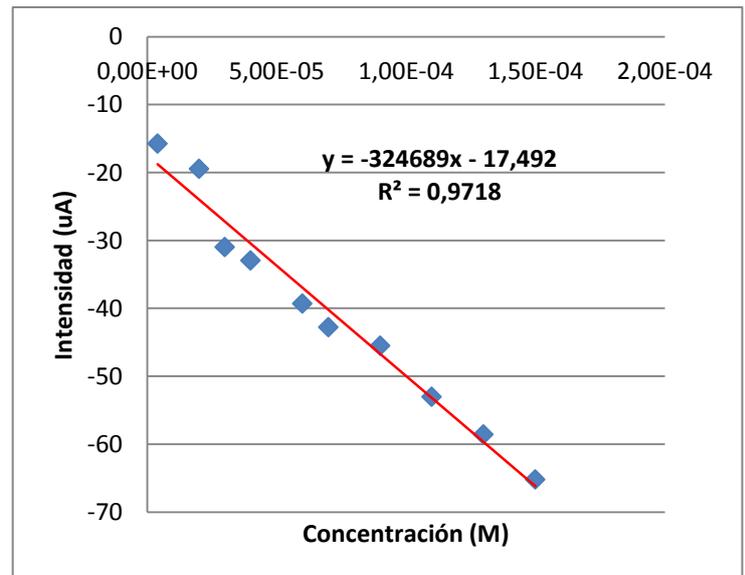


Fig. 4.71. Representación de la intensidad frente a la concentración de hidroquinona del pico situado a 60 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

En este pico los límites de detección son mayores que antes para los tres electrodos. De nuevo el electrodo de lacasa ofrece los mejores resultados, coincidiendo prácticamente con los del lutecio y siendo de nuevo los de tirosinasa los valores más altos.

HIDROQUINONA				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
60	LUTECIO	1,4065E-06	1,41	0,9892
	TIROSINASA	2,8063E-06	2,81	0,9948
	LACASA	1,3982E-06	1,40	0,9718

Tabla 4.16. Límites de detección para el pico situado a 600 mV

En el cuadro resumen se observa como ambos picos están desplazados hacia potenciales menores, con respecto al electrodo de lutecio. También podemos apreciar como los límites de detección se encuentran en el mismo orden de magnitud que los obtenidos para los otros dos difenoles.

HIDROQUINONA				
MOLÉCULA	POTENCIAL (mV)	LD (M)	LD (uM)	R2
LUTECIO	600	7,4597E-07	0,75	0,9882
	60	1,4065E-06	1,41	0,9892
LACASA	550	5,7147E-07	0,57	0,9764
	-90	1,3982E-06	1,40	0,9718
TIROSINASA	550	1,8739E-06	1,87	0,9955
	-100	2,8063E-06	2,81	0,9948

Tabla 4.17. Cuadro resumen de los límites de detección de la hidroquinona.

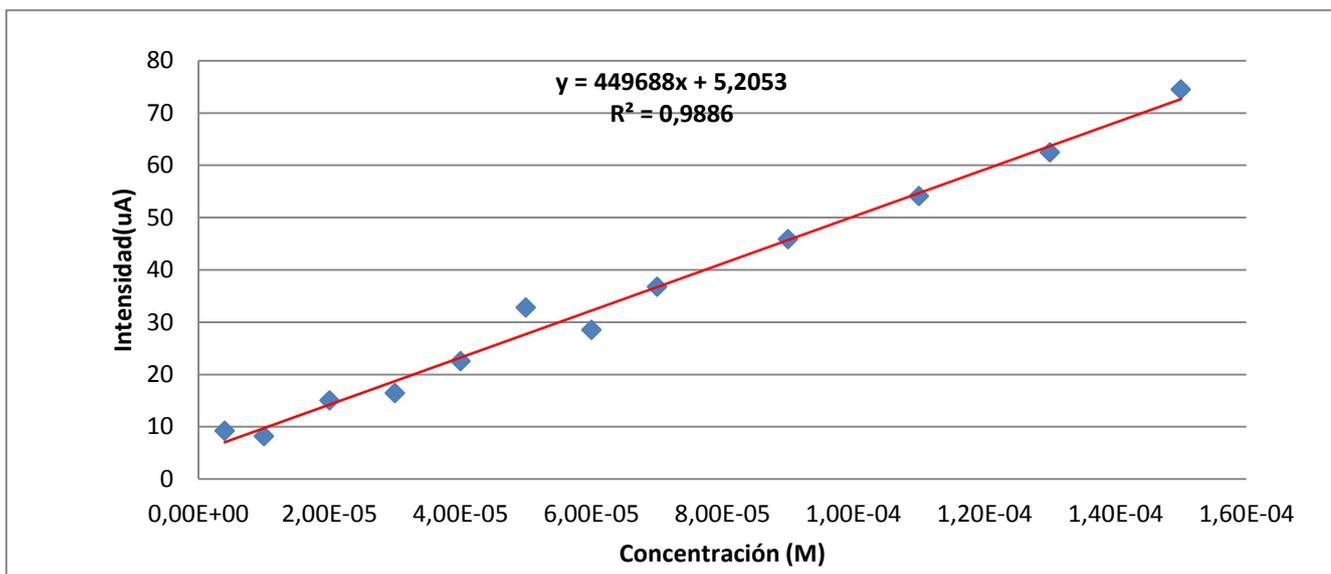
4.3.3.3.4. Trifenoles

E) Pirogalol

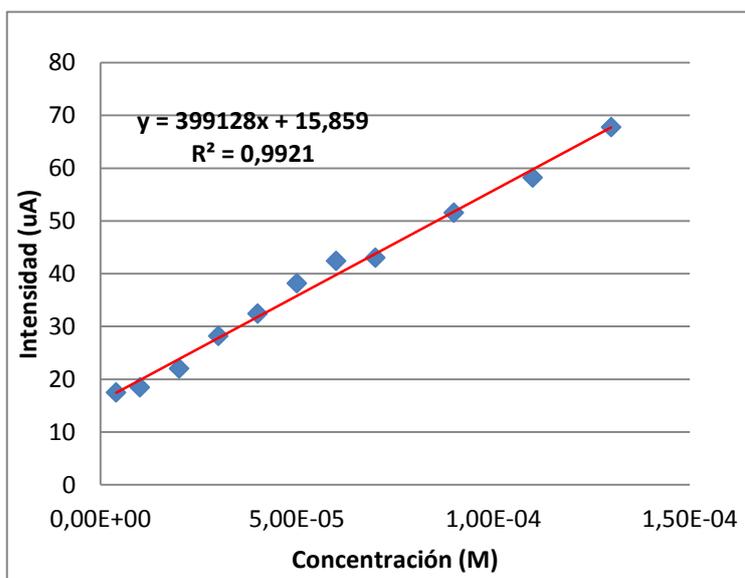
Para el pirogalol se van a analizar dos picos los situados a potenciales 530 y 250 mV, respecto del lutecio.

1) Pico de intensidad a un potencial de 530 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

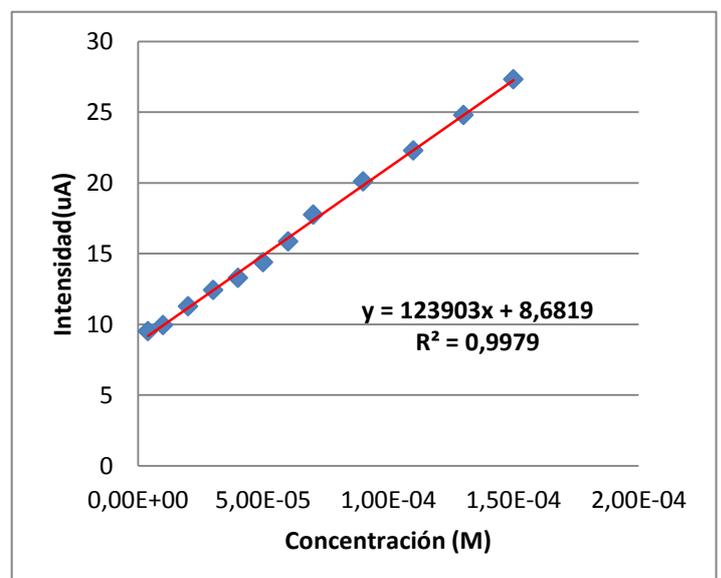


Fig. 4.72. Representación de la intensidad frente a la concentración de pirogalol del pico situado a 530 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

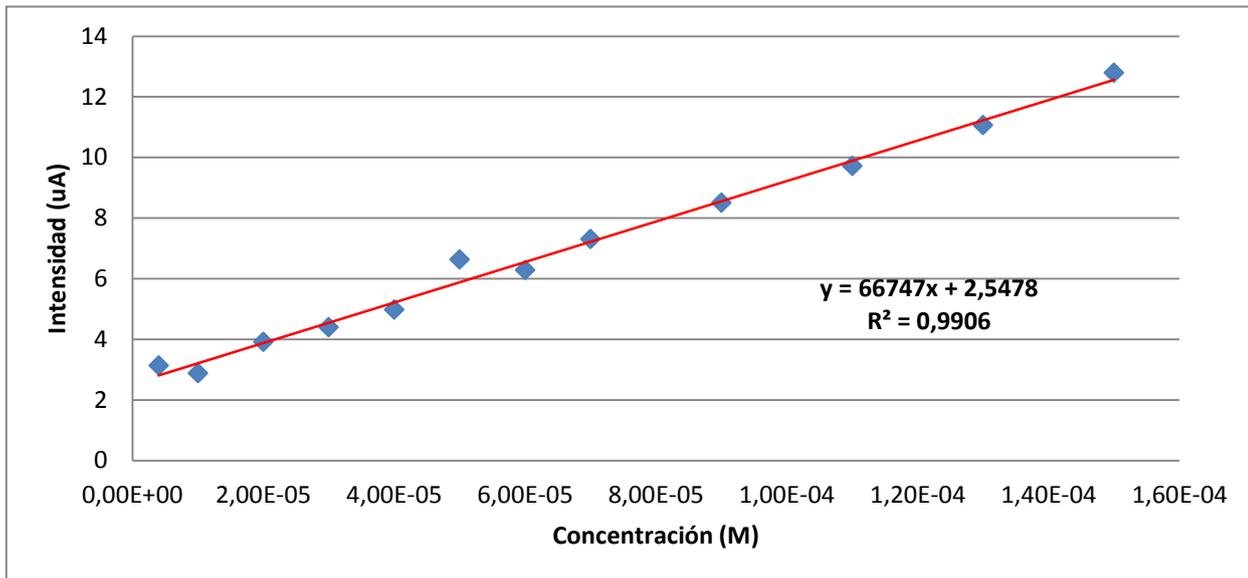
Los límites de detección más bajos corresponden a los dos electrodos de enzima, siendo muy similares para ambos. El límite de detección del lutecio es ligeramente mayor, pero sin grandes diferencias.

PIROGALOL				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
530	LUTECIO	2,14E-06	2,14	0,9886
	TIROSINASA	9,72E-07	0,97	0,9921
	LACASA	1,01E-06	1,01	0,9980

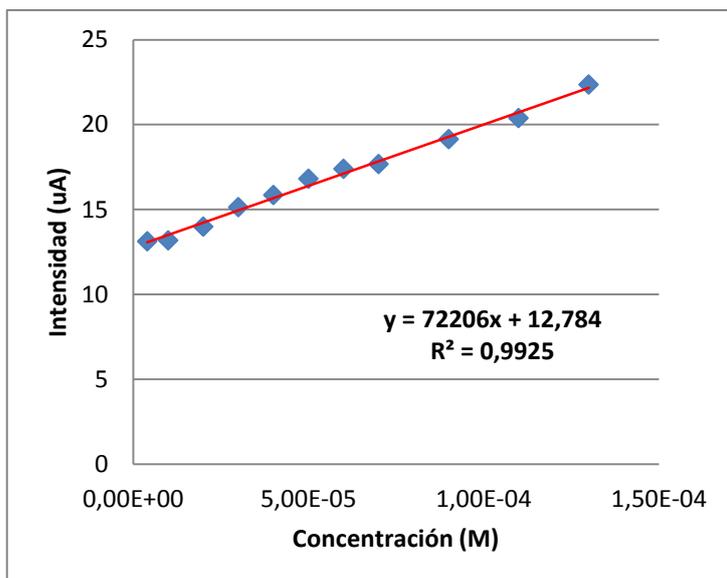
Tabla 4.18. Límites de detección para el pico situado a un potencial de 530 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 250 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

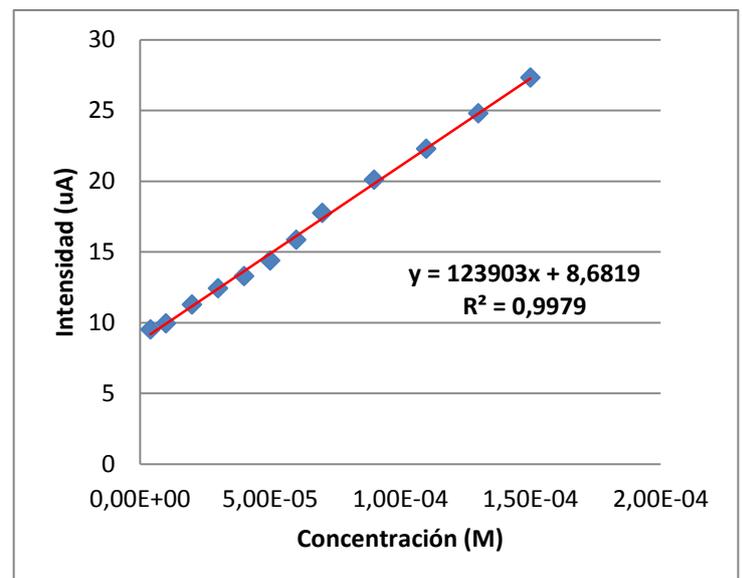


Fig. 4.73. Representación de la intensidad frente a la concentración de pirogalol del pico situado a 250 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

Los límites de detección obtenidos para este pico de intensidad, tal y como se puede observar en la tabla 4.19. son significativamente mayores que para el anterior. Cabe

destacar que si bien para el pico anterior el más sensible era el de tirosinasa, en este caso ocurre todo lo contrario.

PIROGALOL				
POTENCIAL	MOLÉCULA	LD (M)	LD (uM)	R2
250	LUTECIO	3,85E-06	3,85	0,9906
	TIROSINASA	2,28E-05	22,78	0,9925
	LACASA	4,30E-06	4,30	0,9979

Tabla 4.19. Límites de detección para el pico situado a un potencial de 530 mV.

Los límites de detección son de nuevo bastante bajos y son aproximadamente del mismo orden con excepción del electrodo de tirosinasa y el pico situado a 200 mV de potencial.

PIROGALOL				
MOLÉCULA	POTENCIAL (mV)	LD (M)	LD (uM)	R2
LUTECIO	250	3,85E-06	3,85	0,9906
	530	2,14E-06	2,14	0,9886
LACASA	360	4,30E-06	4,30	0,9979
	699	1,01E-06	1,01	0,9980
TIROSINASA	200	2,28E-05	22,78	0,9925
	500	9,72E-07	0,97	0,9921

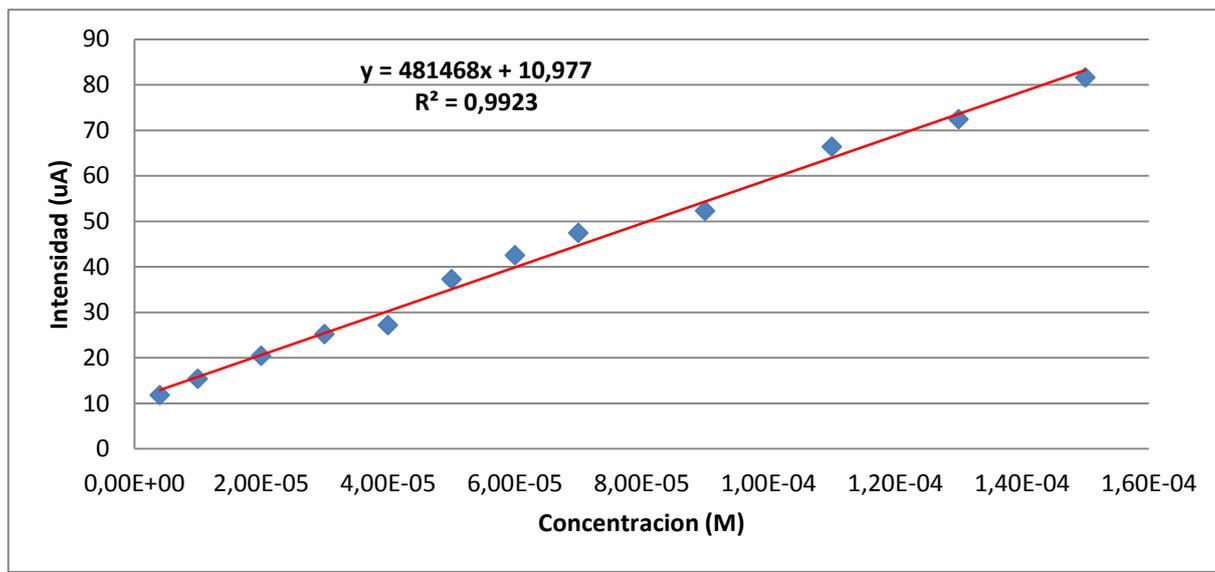
Tabla 4.20. Cuadro resumen de los límites de detección correspondientes al pirogalol.

3) Ácido gálico

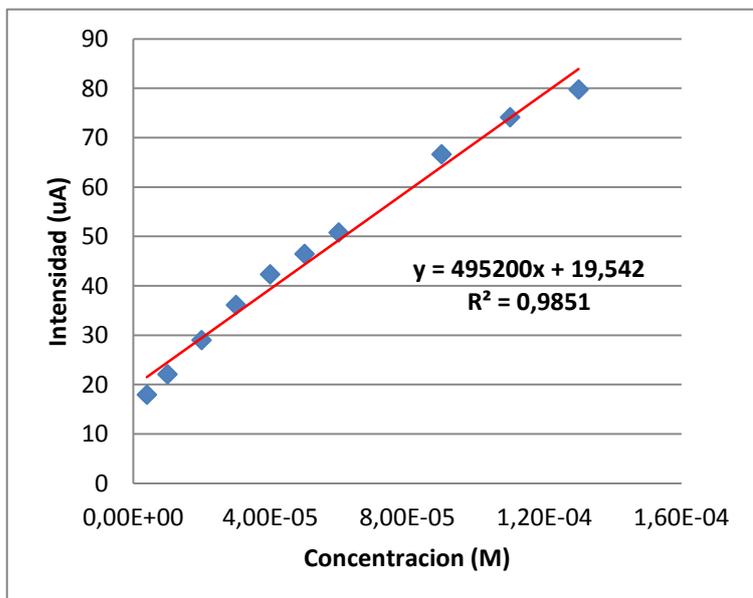
En el ácido gálico tan sólo vamos a analizar un único pico correspondiente a un potencial de 700 mV.

1) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

(A) Lutecio



(B) Tirosinasa



(C) Lacasa

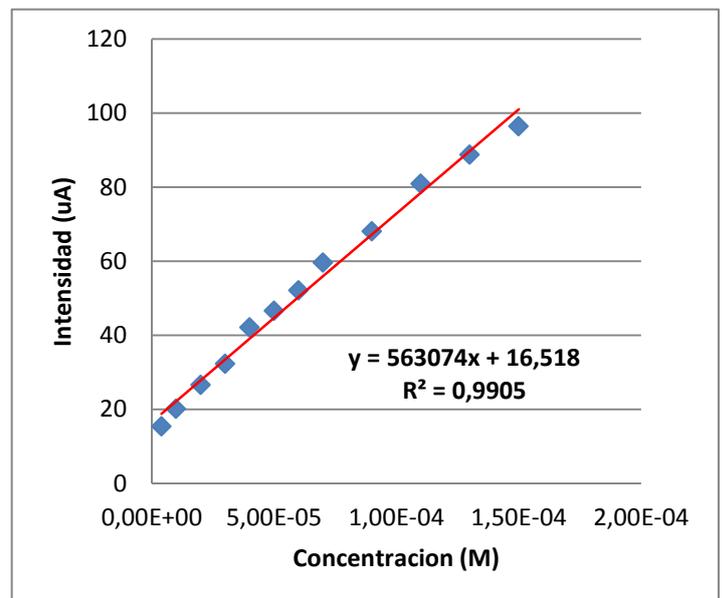


Fig. 4.74. Representación de la intensidad frente a la concentración de ácido gálico del pico situado a 700 mV para los electrodos de: (a) LuPc₂+AA (1:10), (b) LuPc₂+AA (1:10)/Tyr y (c) LuPc₂+AA (1:10)/Lac.

Tal y como se puede observar en la tabla 4.21. los límites de detección obtenidos son muy bajos, siendo los de la lacasa y la tirosinasa similares entre sí y considerablemente menores que el del lutecio.

ÁCIDO GÁLICO				
MOLÉCULA	POTENCIAL (mV)	LD (M)	LD (uM)	R2
LUTECIO	698	3,6877E-06	3,69	0,9922
LACASA	699	4,4019E-07	0,44	0,9905
TIROSINASA	700	4,97E-07	0,50	0,9851

Tabla 4.21. Límites de detección obtenidos para el ácido gálico.

4.3.3.4. Estudio cinético

4.3.3.4.1. Introducción

Hasta el momento hemos descrito el comportamiento de los electrodos obtenidos a partir de la deposición de Langmuir-Blodgett frente a disoluciones de antioxidantes de distintas concentraciones, al someterlos a una voltametría cíclica.

Como se ha podido ver, se han obtenido multitud de voltamogramas que nos permiten caracterizar voltaméricamente los electrodos de metaloftalocianina (bisftalocianina de lutecio) y de enzimas (lacasa y tirosinasa) depositados sobre cristal de ITO.

Se ha observado como los diversos electrodos estudiados dan distintas respuestas entre sí frente a un mismo antioxidante. También hemos podido observar como las respuestas de un mismo electrodo frente a los distintos antioxidantes de estudio son diferentes.

Las diferencias de interés se producen en los picos de intensidad de corriente, tanto en su magnitud como en su posición en la escala de potenciales. Estas diferencias sugieren que las reacciones redox que tienen lugar se rigen por cinéticas distintas.

Las reacciones redox se fundamentan en dos mecanismos de control; el mecanismo de difusión de cargas y el mecanismo de transferencia másica.

Los procesos controlados por **difusión de cargas** son los más rápidos. Se suelen conocer como “de especies confinadas” en la superficie del electrodo, y tiene lugar en aquellos casos en los cuales el material electroactivo está estrechamente asociado a la superficie conductora del electrodo.

Los procesos controlados por un mecanismo de **difusión o transferencia másica** de especies activas hacia la matriz conductora del electrodo, ya sea de especies electroactivas o bien de los iones de la sal electrolítica del medio, que neutralizan las cargas que se generan durante el barrido de potencial y que se caracteriza por manifestar cinéticas redox retardadas.

El mecanismo de difusión de cargas da lugar a una evolución lineal de la intensidad de corriente frente a la velocidad de barrido de potencial (I vs v). Mientras que el mecanismo de transferencia másica da lugar, en general, a evoluciones lineales de la intensidad con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial (I vs $v^{1/2}$).

Por esta razón, se ha realizado un estudio cinético en el que se persigue determinar cual es el mecanismo predominante en cada caso.

4.3.3.4.2. Monofenoles

A) Ácido vanílico

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

Antes de realizar las medidas se cicla el electrodo 10 veces a una velocidad de barrido de 100 mV/s para estabilizar la señal. Una vez estabilizada se realizan dos ciclos para velocidades de barrido de entre 25 y 200 mV/s.

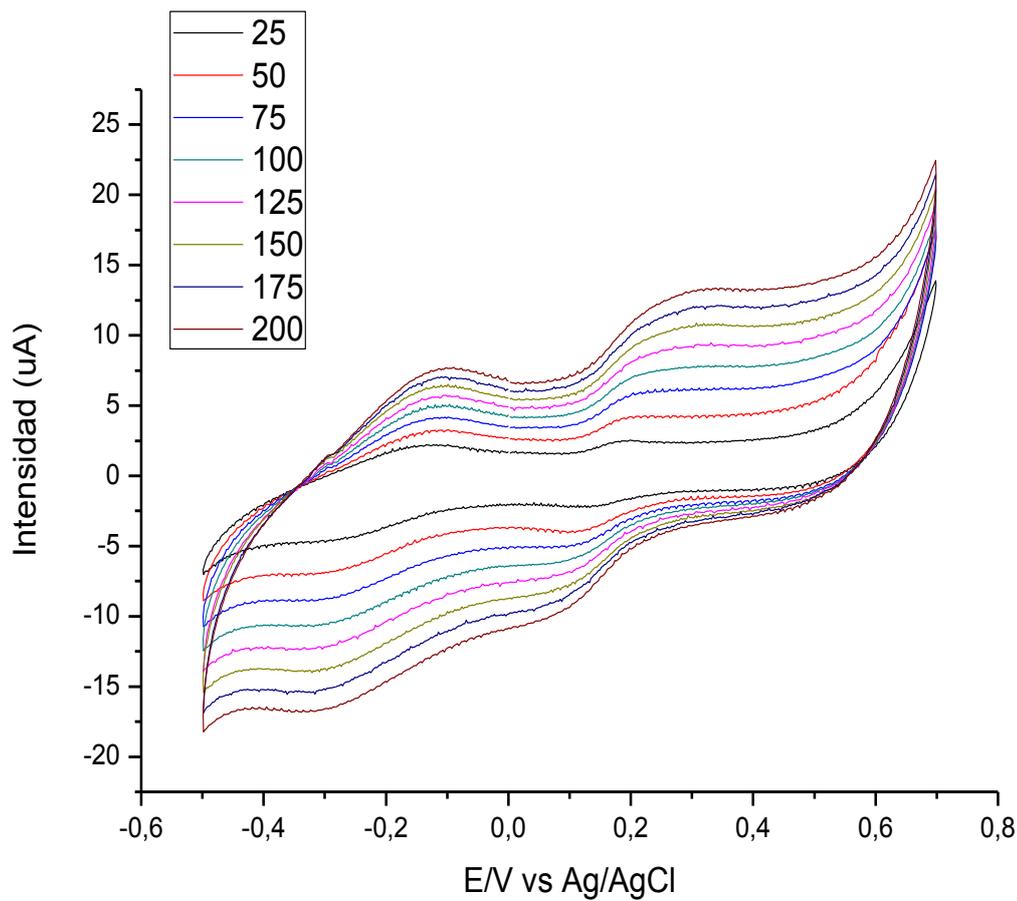


Fig. 4.75. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10) en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de ácido vanílico de $1 \times 10^{-4} \text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

Como se puede observar, cuanto mayor es la velocidad de barrido mayor es la señal de fondo y mayor es la magnitud de los picos.

Para tratar de observar cual es el mecanismo de control de la reacción predominante se analizan para cada uno de los picos de interés las relaciones “ I vs v ” e “ I vs $v^{1/2}$ ”.

1) Pico de intensidad a un potencial de 200 mV

Para el pico anódico de intensidad obtenido a 200 mV de potencial se analizan los datos de intensidad frente a velocidad y frente a la raíz de la velocidad que aparecen representados en la figura 4.76.

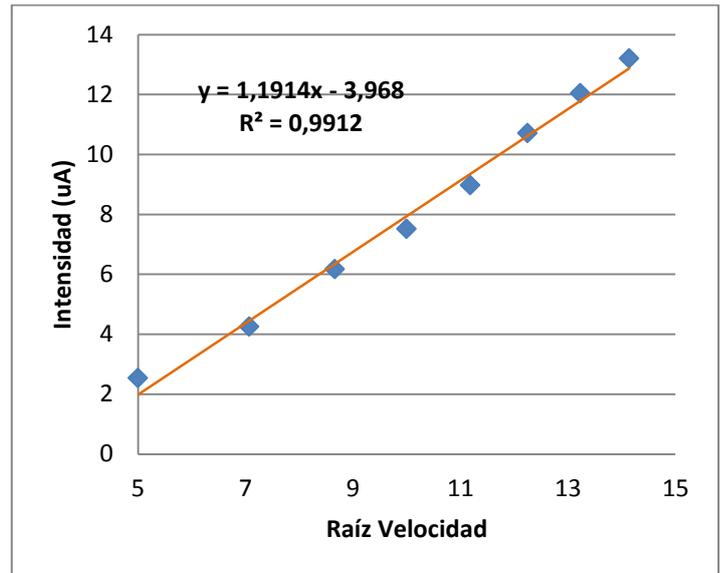
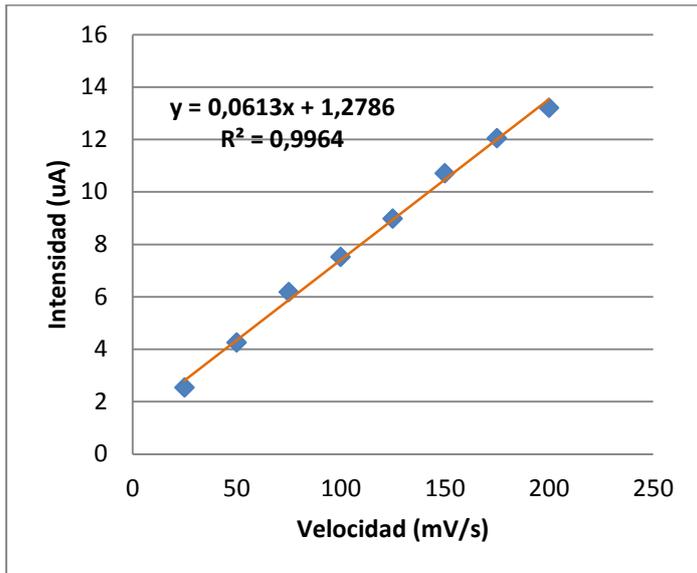


Fig. 4.76. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 200 mV.

Como se puede apreciar los valores de los ajustes tanto para la gráfica de la intensidad frente a la velocidad, como para la gráfica de la intensidad frente a la raíz de la velocidad son muy similares para este pico. Podría concluirse que no existe un mecanismo predominante.

2) Pico de intensidad a un potencial de 150 mV

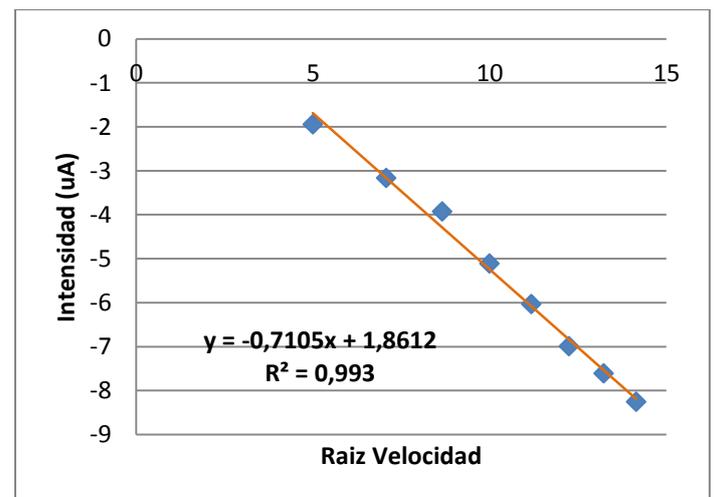
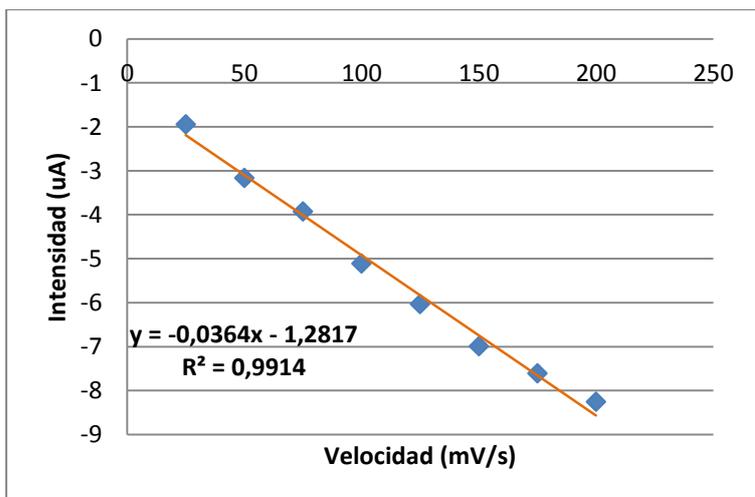


Fig. 4.77. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 150 mV.

De nuevo podemos apreciar como no hay diferencias significativas entre los dos ajustes.

3) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

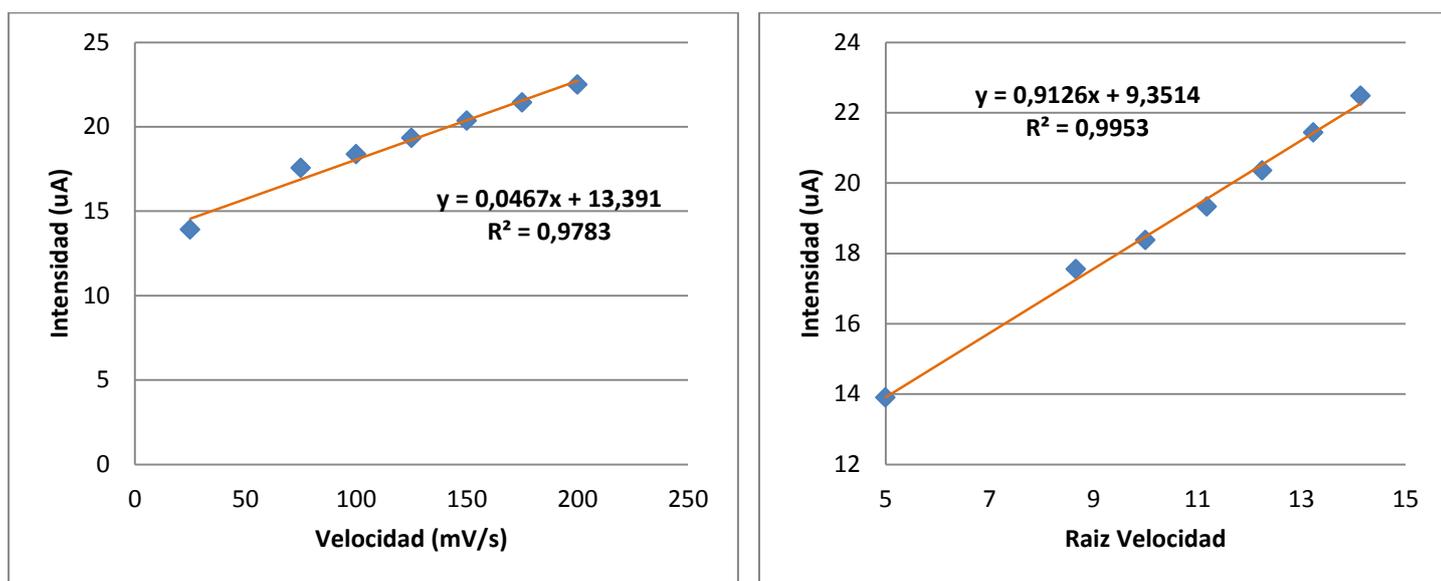


Fig. 4.78. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 700 mV.

En esta ocasión si que se pueden observar diferencias significativas. En el ajuste "I vs $v^{1/2}$ " tenemos un valor del coeficiente de determinación (R^2) mucho mayor. Esto hace indicar que la reacción que tiene lugar a este potencial se rige predominantemente por un mecanismo de transferencia de masa.

- **Electrodo modificado de tirosinasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

Se puede observar en la figura 4.79. como de nuevo el incremento de la velocidad de barrido conlleva un incremento en la magnitud de los picos.

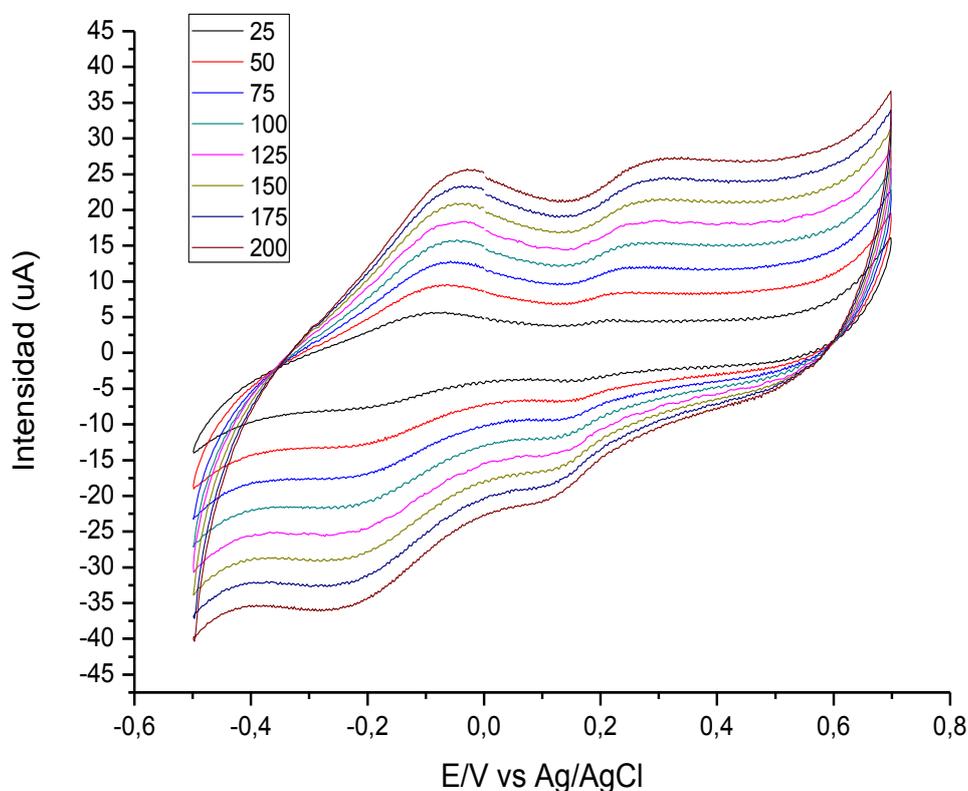


Fig. 4.79. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10)/Tyr en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de ácido vanílico de $1 \times 10^{-4}M$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

Al igual que antes se observa un notable incremento de la corriente de fondo y de la magnitud de los picos de intensidad conforme aumenta la velocidad de barrido de potencial.

De nuevo analizamos los resultados obtenidos para los ajustes de "I vs v" e "I vs v^{1/2}" en los electrodos de tirosinasa.

1) Pico de intensidad a un potencial de 200 mV

Si nos fijamos en la figura 4.80. se aprecia que ambos ajustes son buenos y que no existe un mecanismo predominante.

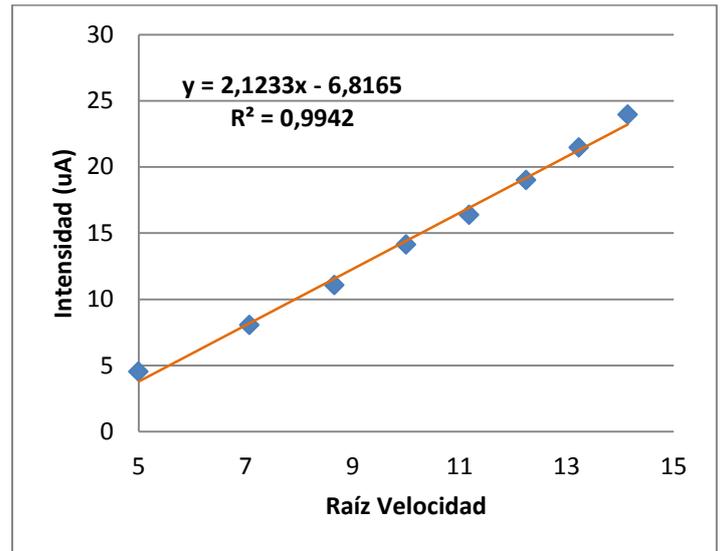
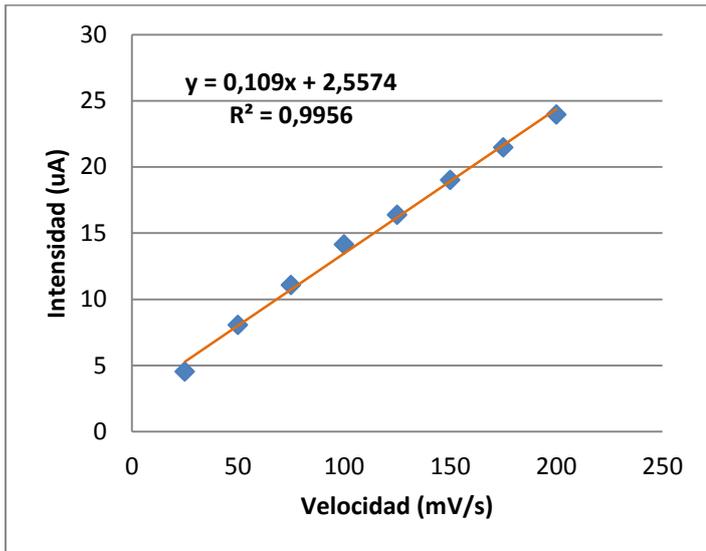


Fig. 4.80. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 200 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 170 mV

De nuevo ambos ajustes son muy similares, siendo igual que con el pico anterior un poco mejor el ajuste “I vs v” con lo cual no puede establecerse cuál es el mecanismo predominante.

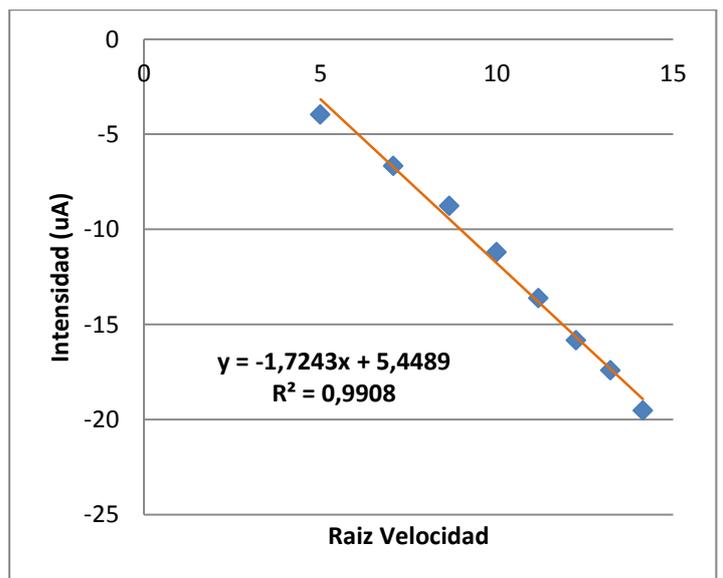
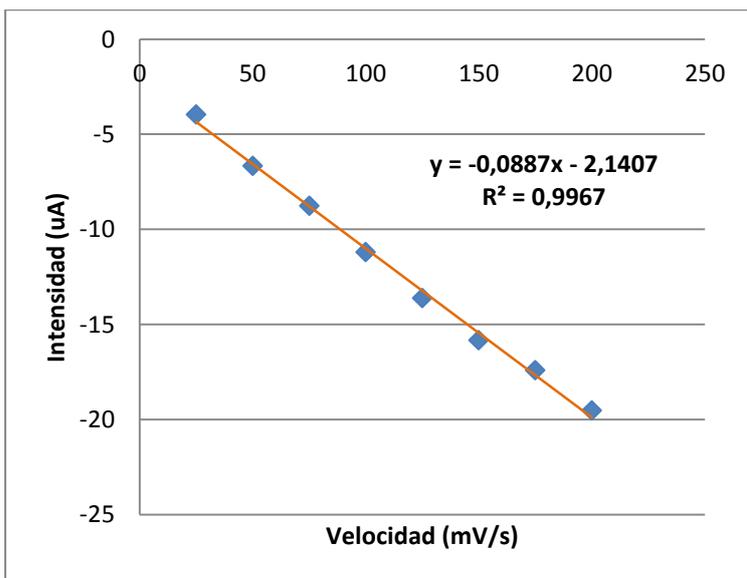


Fig. 4.81. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 170 mV.

3) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

Este tercer pico obtenido para la cinética de la tirosinasa proporciona resultados similares. Los ajustes son parecidos, si bien al igual que en los dos casos anteriores el ajuste "I vs v" es algo mejor.

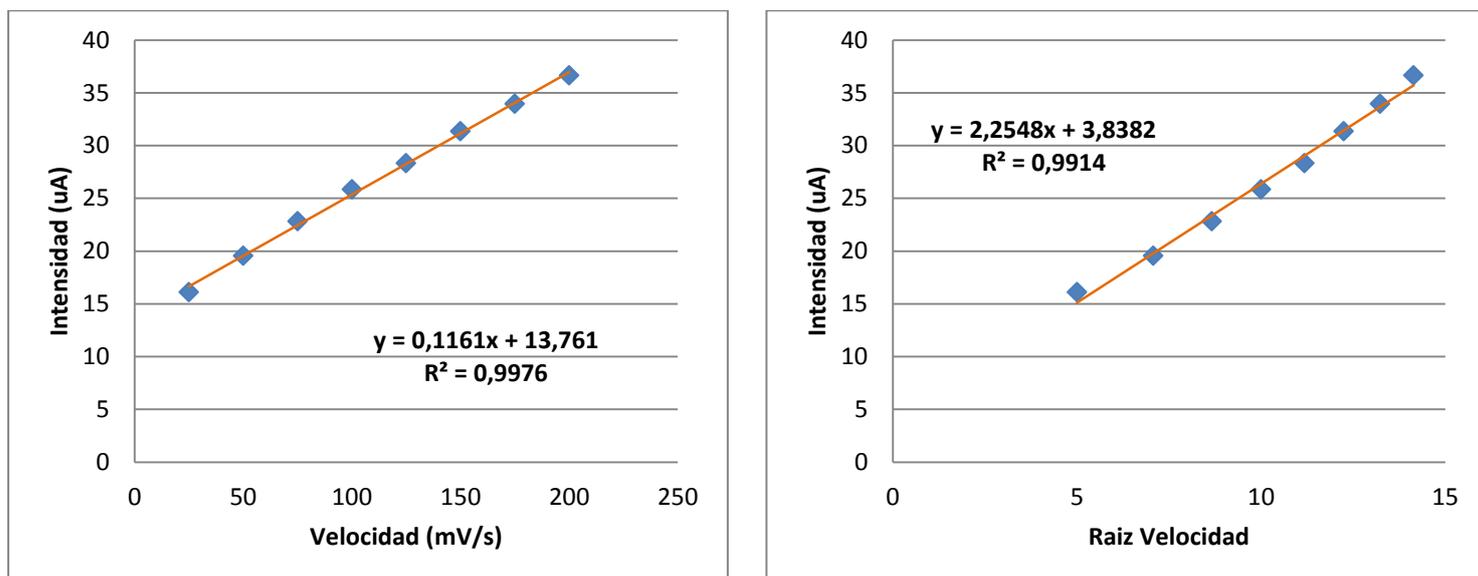


Fig. 4.82. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 700 mV.

- **Electrodo modificado de lacasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

La tendencia observada en los electrodos de lutecio y de tirosinasa se sigue cumpliendo con los resultados obtenidos para el electrodo de lacasa. Se produce el incremento esperado de los picos de intensidad al aumentar la velocidad de barrido de potencial.

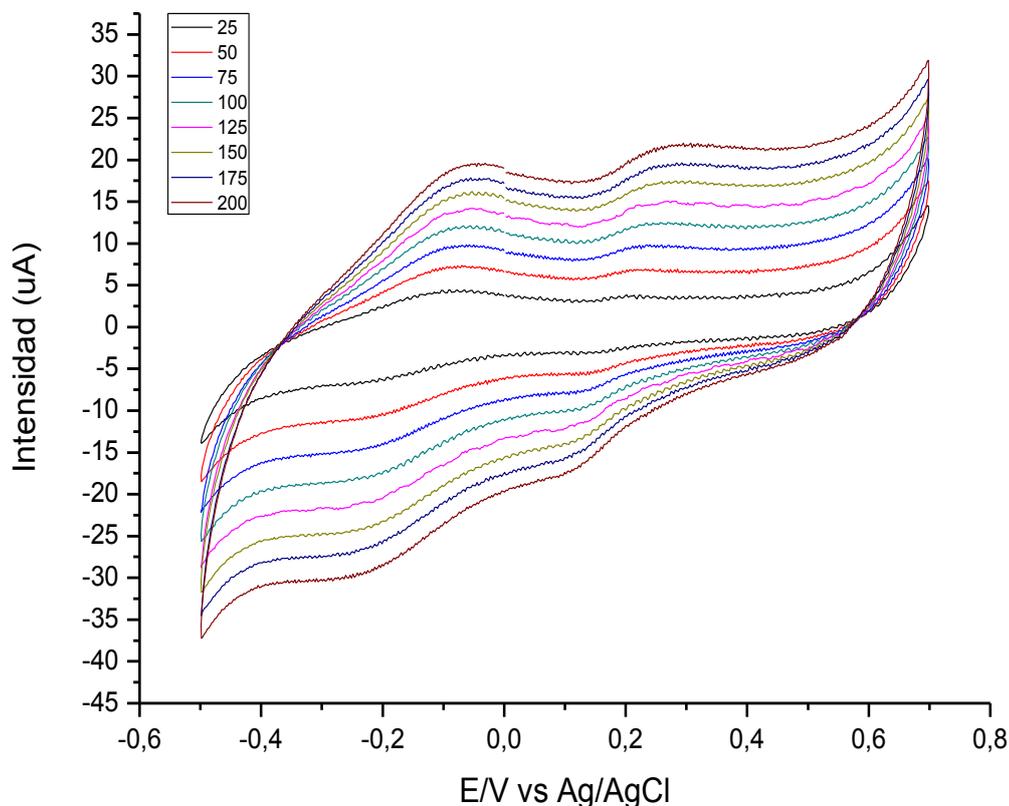


Fig. 4.83. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de ácido vanílico de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 200 mV

Se obtienen ajustes similares siendo ligeramente mejor el ajuste I vs $v^{1/2}$. Podría decirse que el mecanismo predominante es el de transferencia de masa sin embargo, dada la escasa diferencia sería más correcto afirmar que no existe ningún mecanismo predominante.

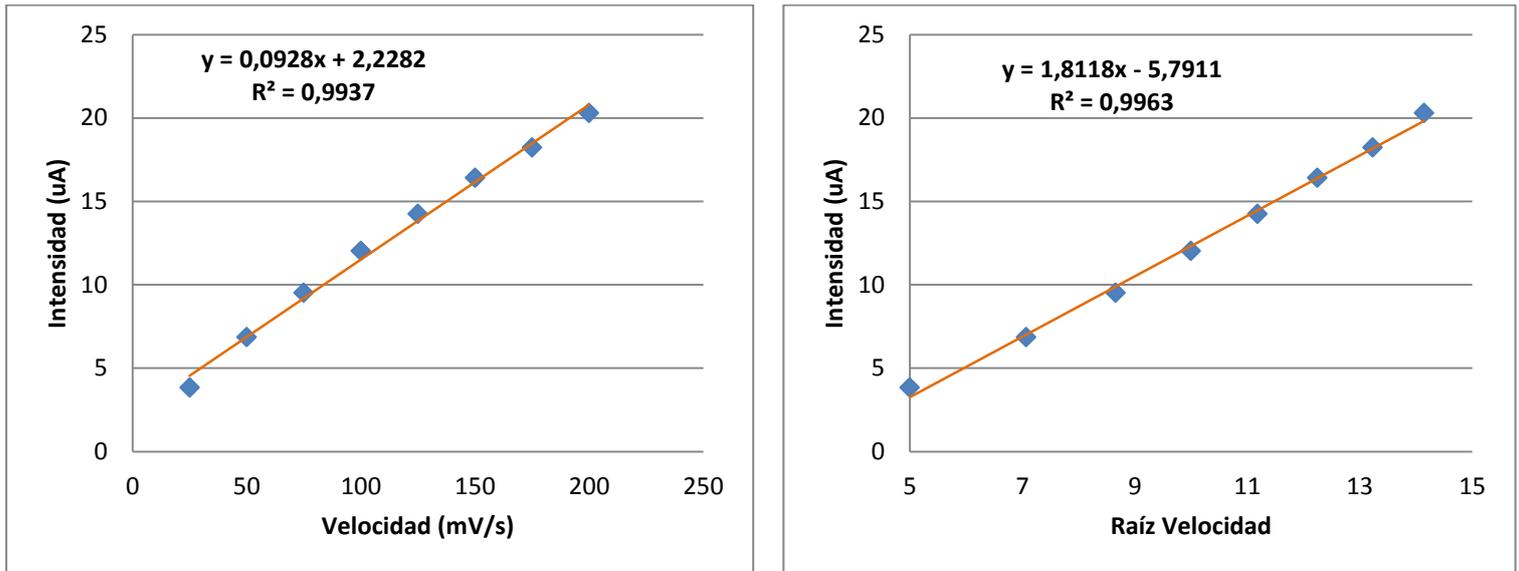


Fig. 4.84. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 200 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 170 mV

Los resultados obtenidos prácticamente coinciden con lo obtenido para el pico de 200 mV. Al igual que antes, no puede concluirse que exista un mecanismo predominante.

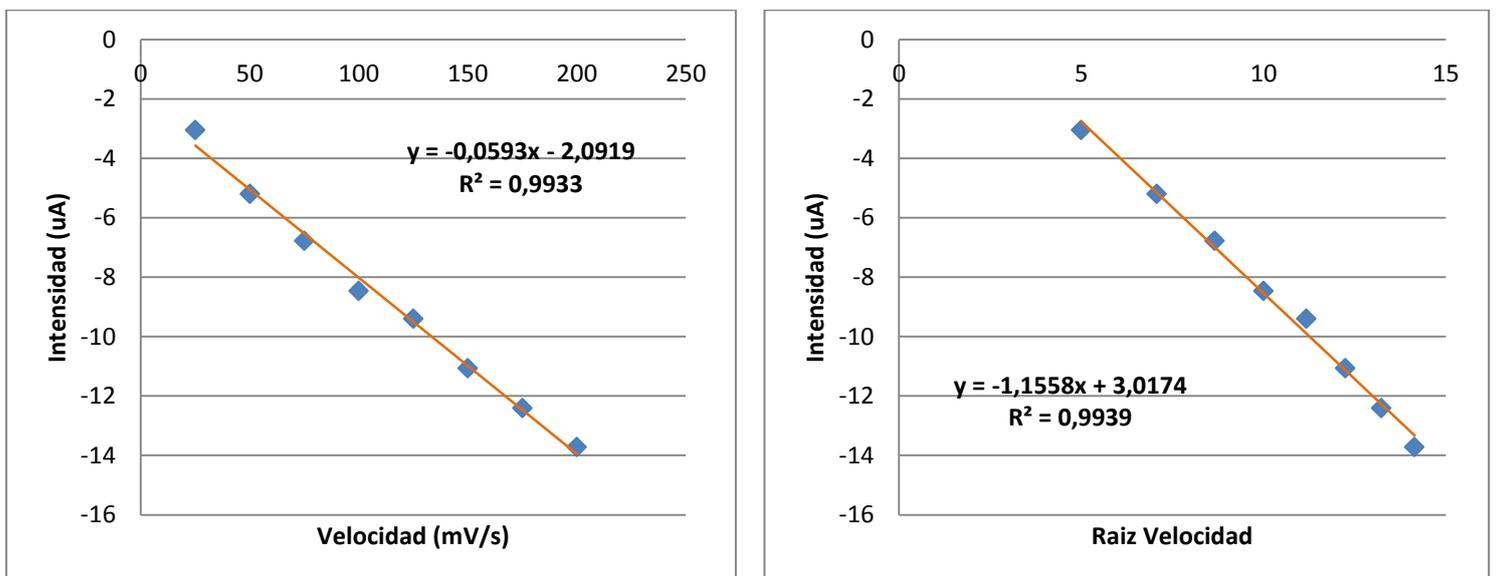


Fig. 4.85. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 170 mV.

3) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

A diferencia de lo observado para los picos de 200 y 170 mV, en este caso el ajuste es algo mejor para "I vs v".

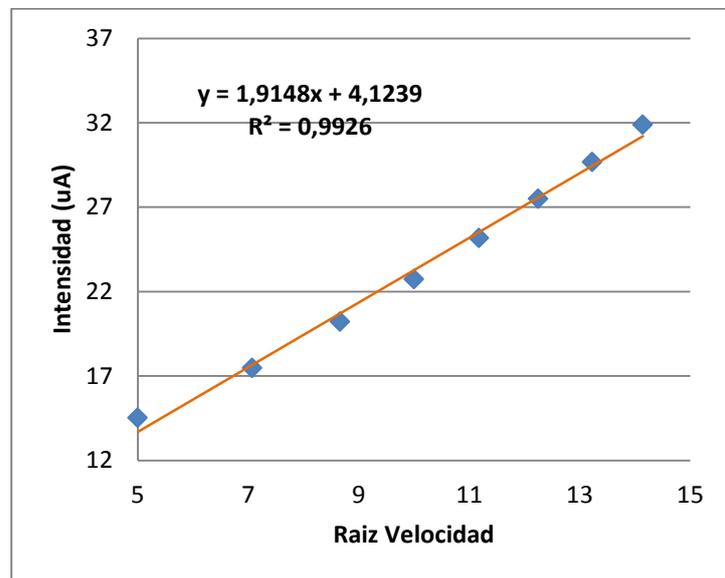
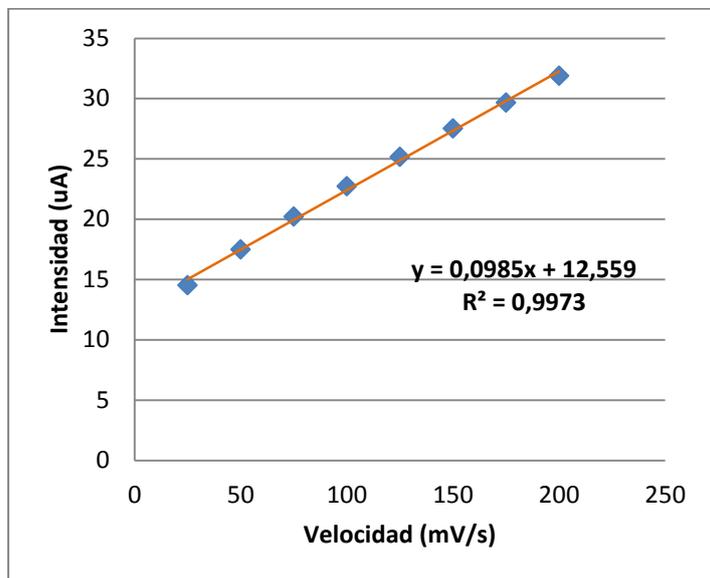


Fig. 4.86. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 700 mV.

4.3.3.4.3. Difenoles

B) Ácido Cafeico

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc₂) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

Conforme aumenta la velocidad de barrido se observan incrementos notables en la magnitud de la intensidad de corriente de los picos, especialmente para el obtenido a 600 mV. También puede observarse como el barrido de 50 mV/s prácticamente se solapa con el de 75 mV/s, lo cual supone una anomalía. Por ello, se han eliminado los puntos que corresponden a las medidas de 50 mV/s.

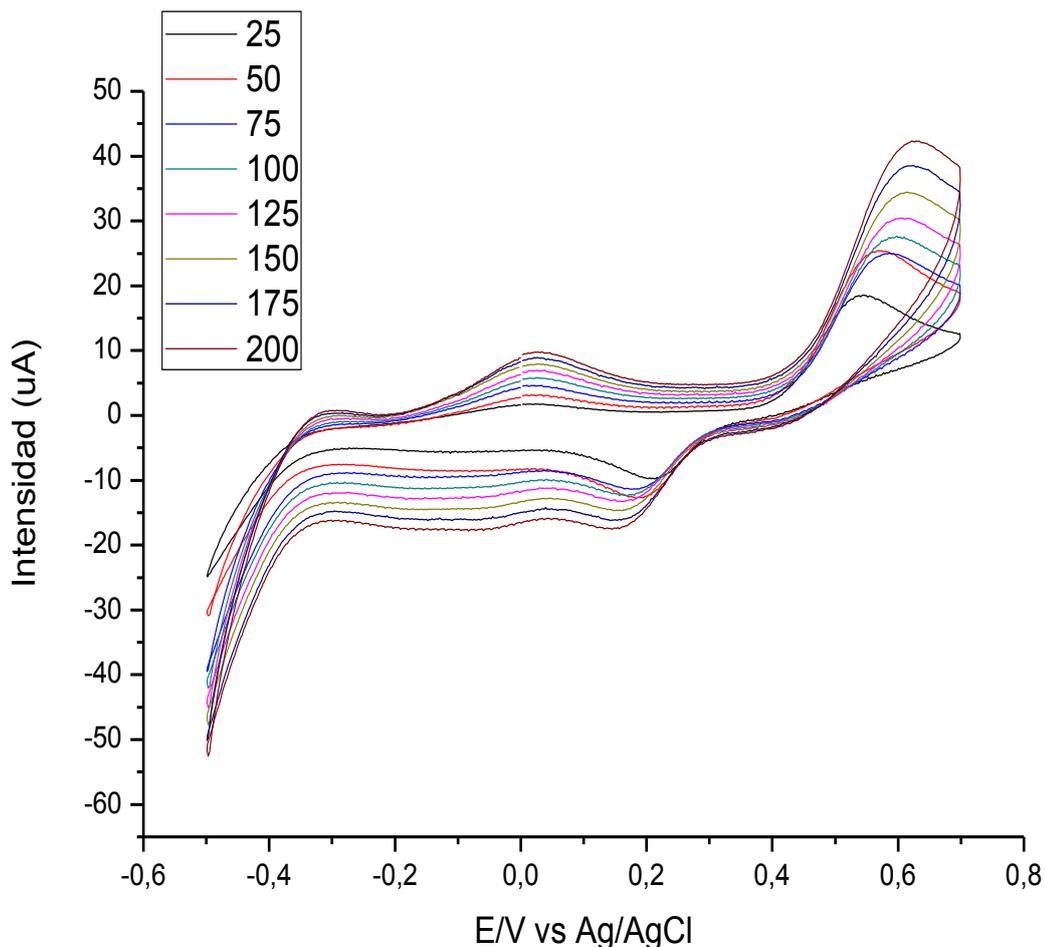


Fig. 4.87. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10) en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de ácido cafeico de 1x10⁻⁴M, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 600 mV

Como ya se ha comentado se ha obviado el valor obtenido para 50 mV/s debido a que descuadraba totalmente el ajuste, ya que claramente se trata de una medida anómala.

Sin dicho valor se puede observar como el ajuste "I vs v" es bueno y ciertamente mejor que el ajuste "I vs v^{1/2}", de lo cual se deduce que el mecanismo predominante es el de difusión.

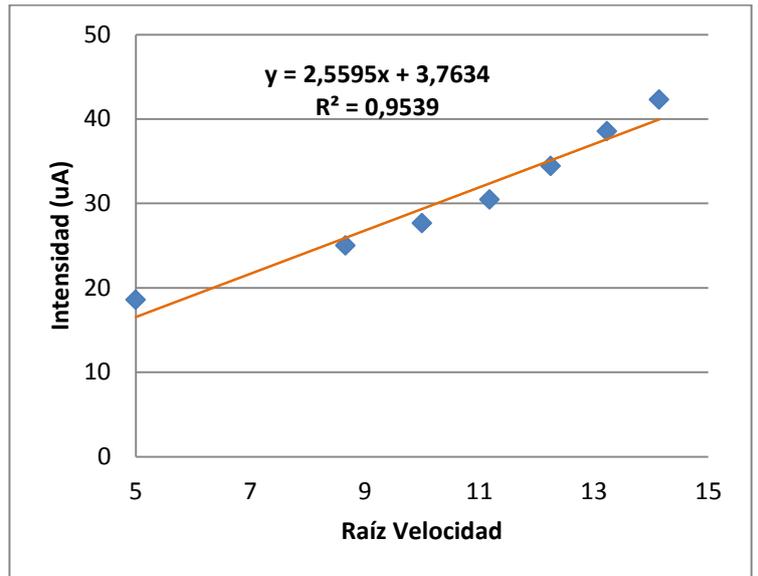
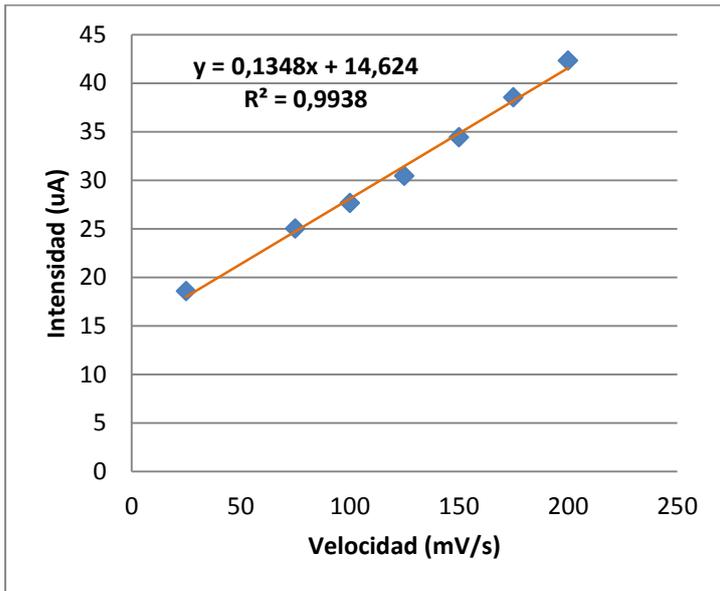


Fig. 4.88. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 600 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 170 mV

De nuevo se han obviado los valores obtenidos para 50 mV/s.

En ambos casos los ajustes no son tan buenos como los obtenidos para el pico anódico situado a 600 mV. A pesar de ello, la diferencia entre el ajuste “I vs v” y el ajuste “I vs $v^{1/2}$ ” se acentúa, pudiendo concluir que claramente el mecanismo predominante es el de difusión.

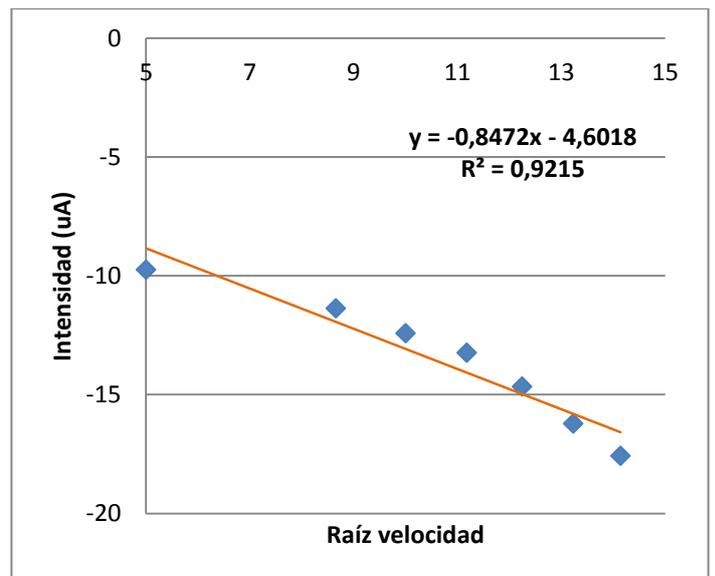
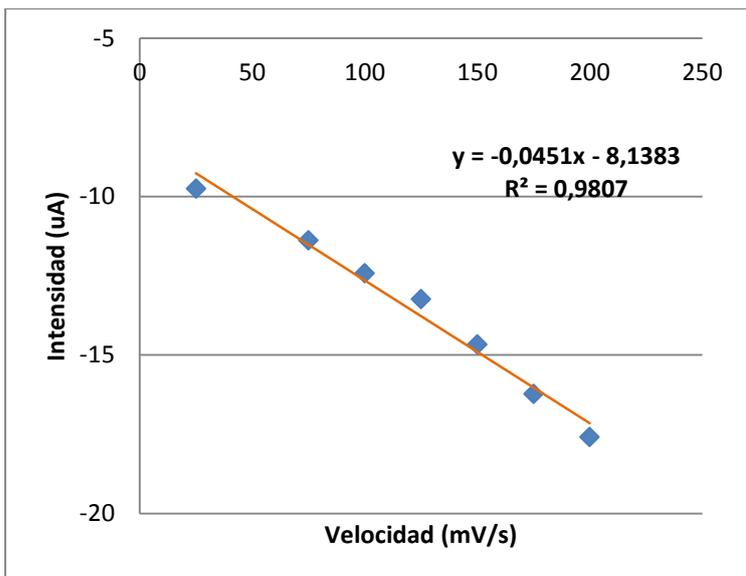


Fig. 4.89. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 170 mV.

▪ Electrodo modificado de tirosinasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

De nuevo vamos a analizar los picos situados a +170 mV y el pico situado a +550 mV. Este último pico podemos observar como está desplazado a potenciales menores respecto a lo obtenido para el electrodo de lutecio. La tendencia que se aprecia sigue los mismos cánones, ya que a mayor velocidad de barrido se obtiene una mayor intensidad de pico.

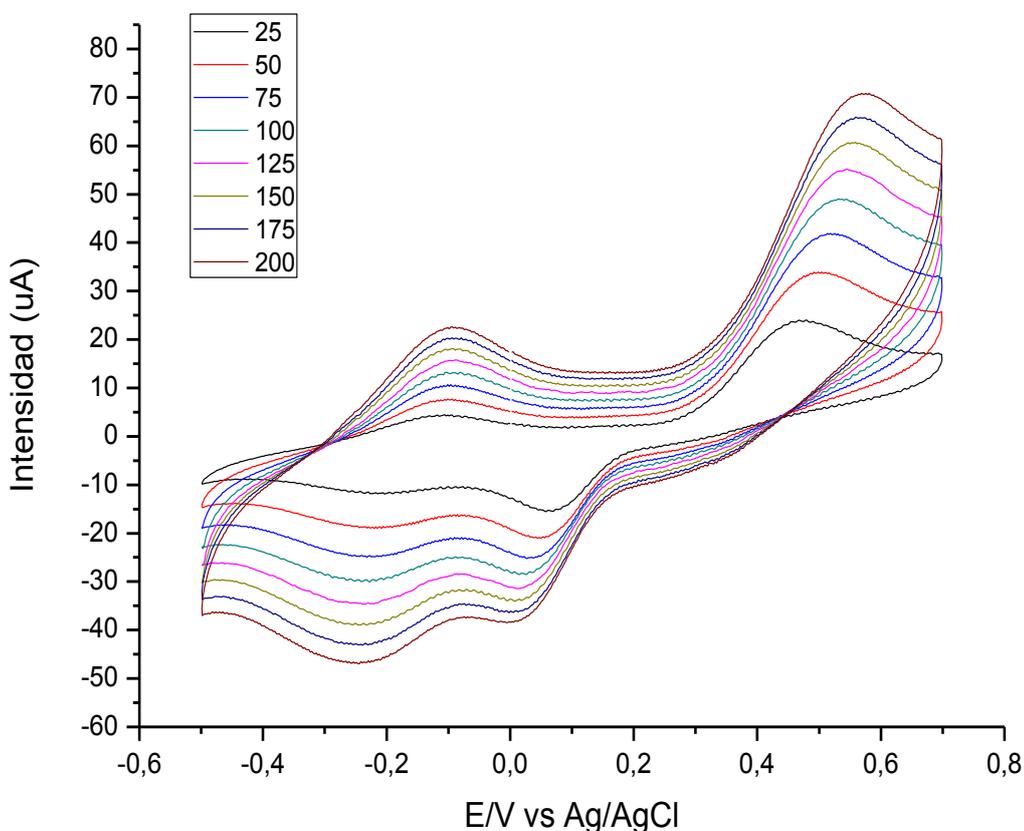


Fig. 4.90. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10)/Tyr en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de ácido cafeico de 1×10^{-4} M, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 550 mV

El ajuste obtenido para “ I vs $v^{1/2}$ ” es muy bueno y mejor que el obtenido para “ I vs v ”, con lo cual se puede deducir que el mecanismo de reacción predominante es el de transferencia másica.

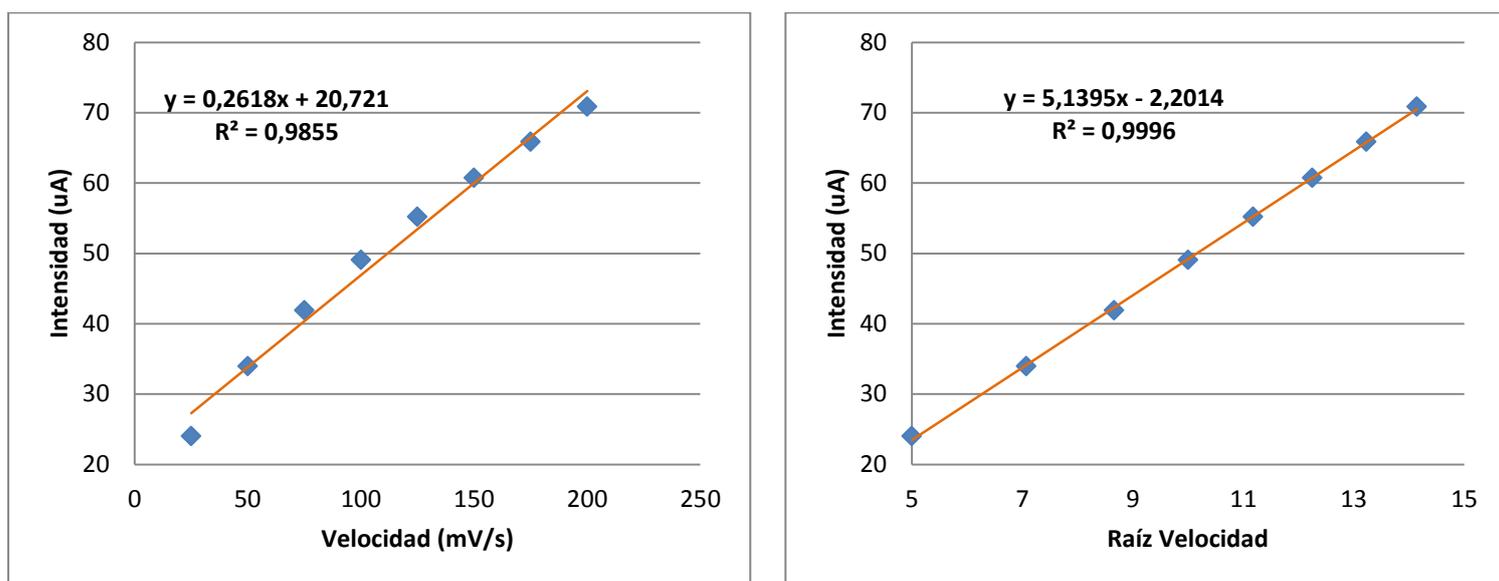


Fig. 4.91. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 550 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 170 mV

El ajuste obtenido para “ I vs $v^{1/2}$ ” es de nuevo muy bueno, mientras que el de “ I vs v ” ha empeorado de tal forma que para este pico las diferencias entre ambos se acentúan haciendo más patente si cabe la predominancia del mecanismo de transferencia de masa sobre el de difusión.

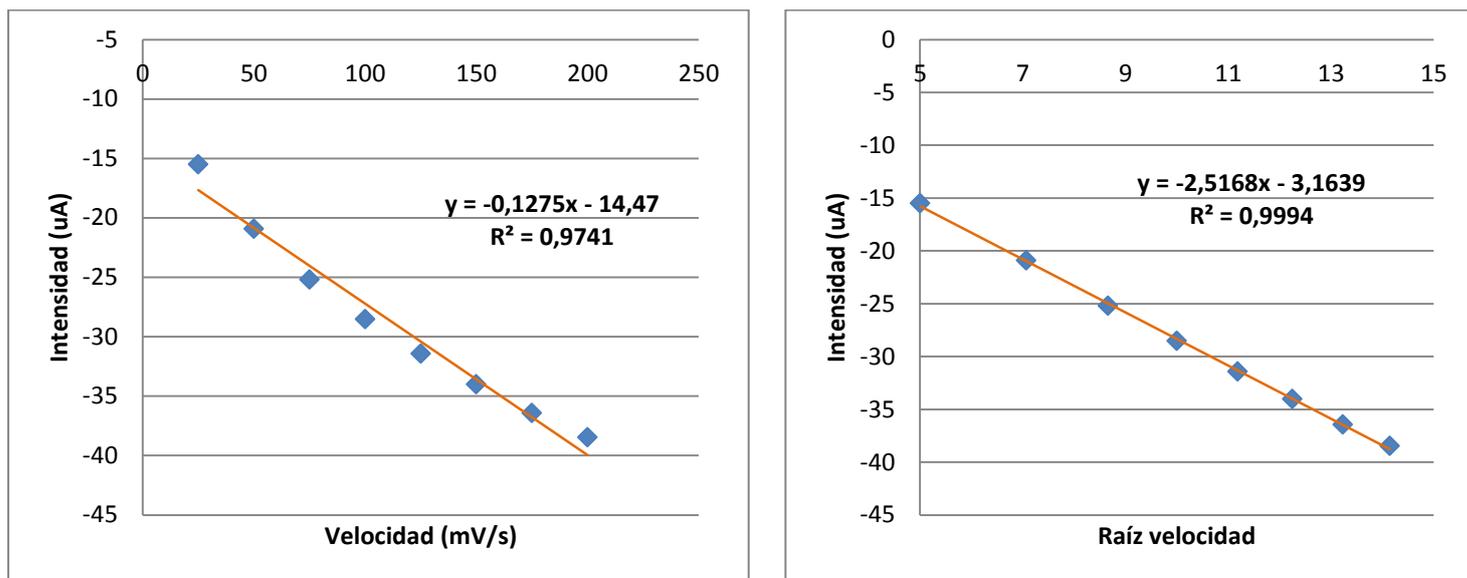


Fig. 4.92. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 550 mV.

- **Electrodo modificado de lacasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

En la figura 4.93. se puede ver que el pico anódico está desplazado hacia potenciales mayores, de tal forma que se corta. Por lo demás se sigue observando la tendencia normal de incremento de la intensidad con el incremento de la velocidad de barrido de potencial.

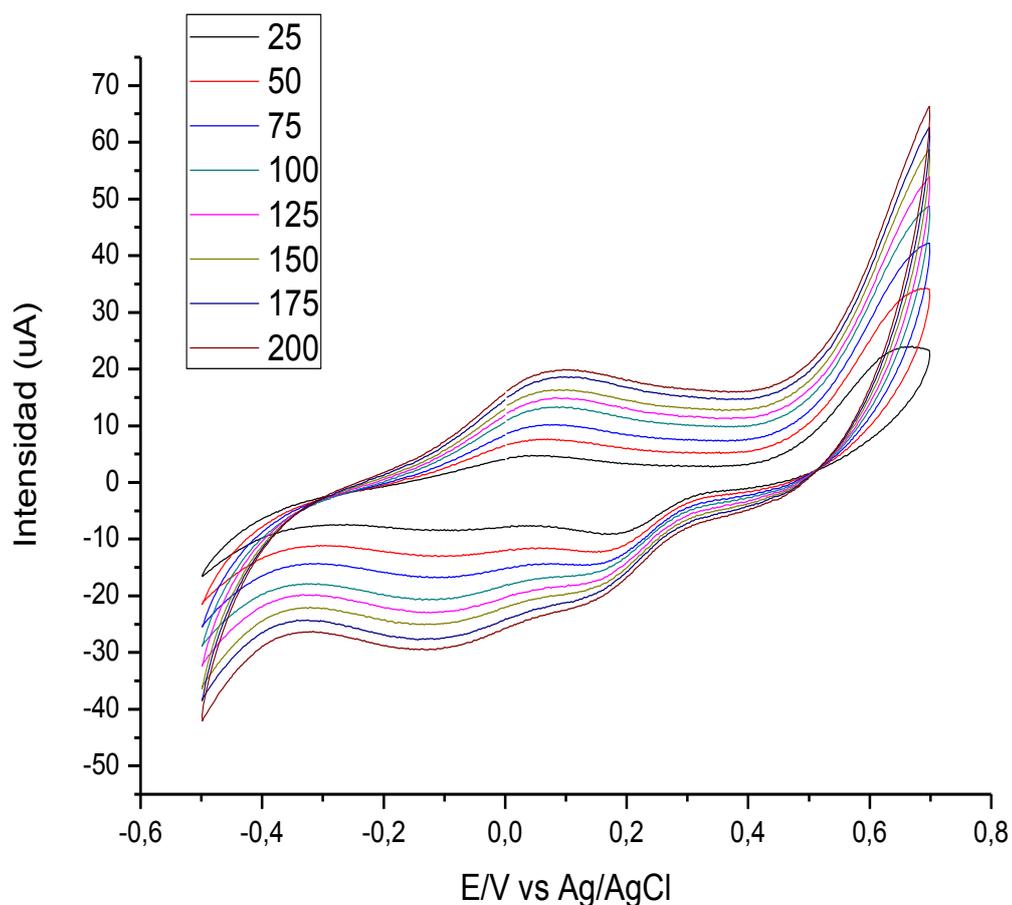


Fig. 4.93. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10)/Lac en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de ácido cafeico de 1×10^{-4} M, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

Los resultados son del mismo orden que los obtenidos para la tirosinasa, siendo el ajuste " I vs $v^{1/2}$ " muy bueno y mejor que el ajuste " I vs v ". Con lo cual, de nuevo se obtiene que el mecanismo de reacción predominante es el de transferencia másica.

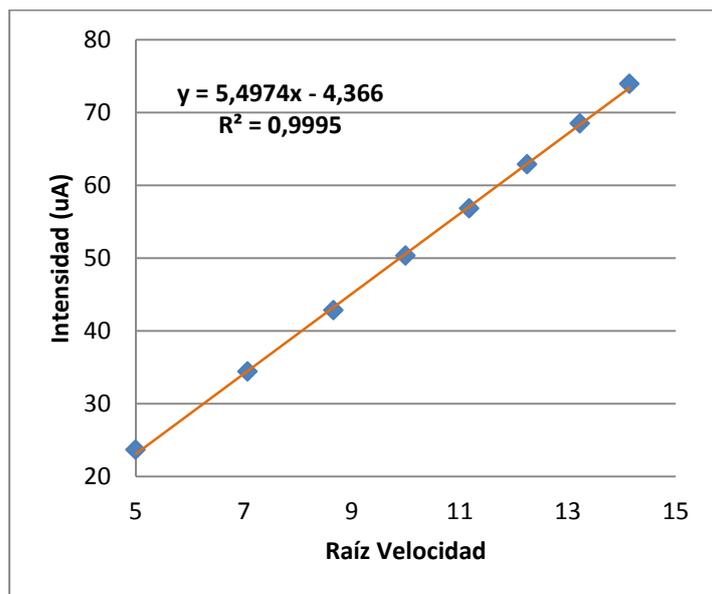
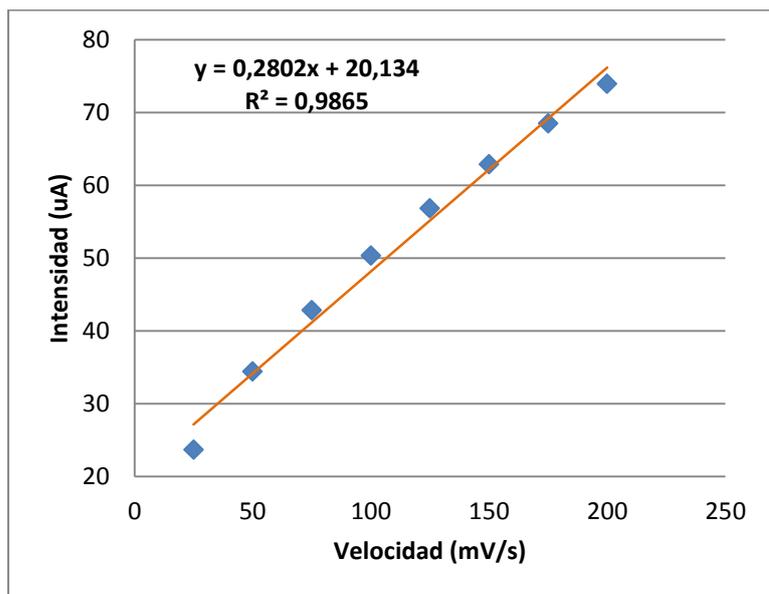


Fig. 4.94. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 700 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 170 mV

La tendencia observada previamente para la tirosinasa se vuelve a repetir para este pico. El ajuste “ I vs $v^{1/2}$ ” sigue siendo bueno y el ajuste “ I vs v ” ha empeorado considerablemente, con lo cual se hace aún más patente que el mecanismo predominante es el de transferencia de masas.

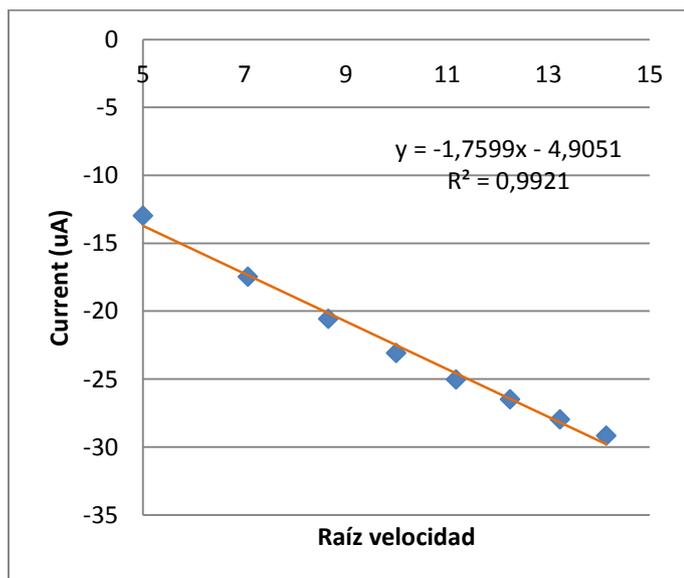
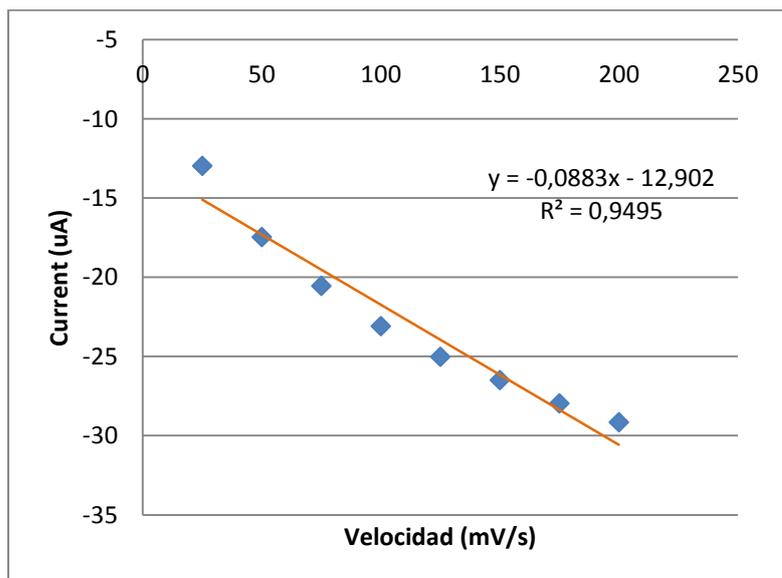


Fig. 4.95. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 170 mV.

C) Catecol

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

En la figura 4.96. se observan grandes incrementos de la intensidad conforme aumenta la velocidad de barrido para el pico de intensidad anódico situado a 550 mV. Estos incrementos son mayores a velocidades de barrido bajas. También aumenta la intensidad del pico catódico situado a 70 mV, aunque en menor medida. También se puede observar que para este pico los incrementos son mayores entre velocidades de barrido bajas, que entre velocidades de barrido altas.

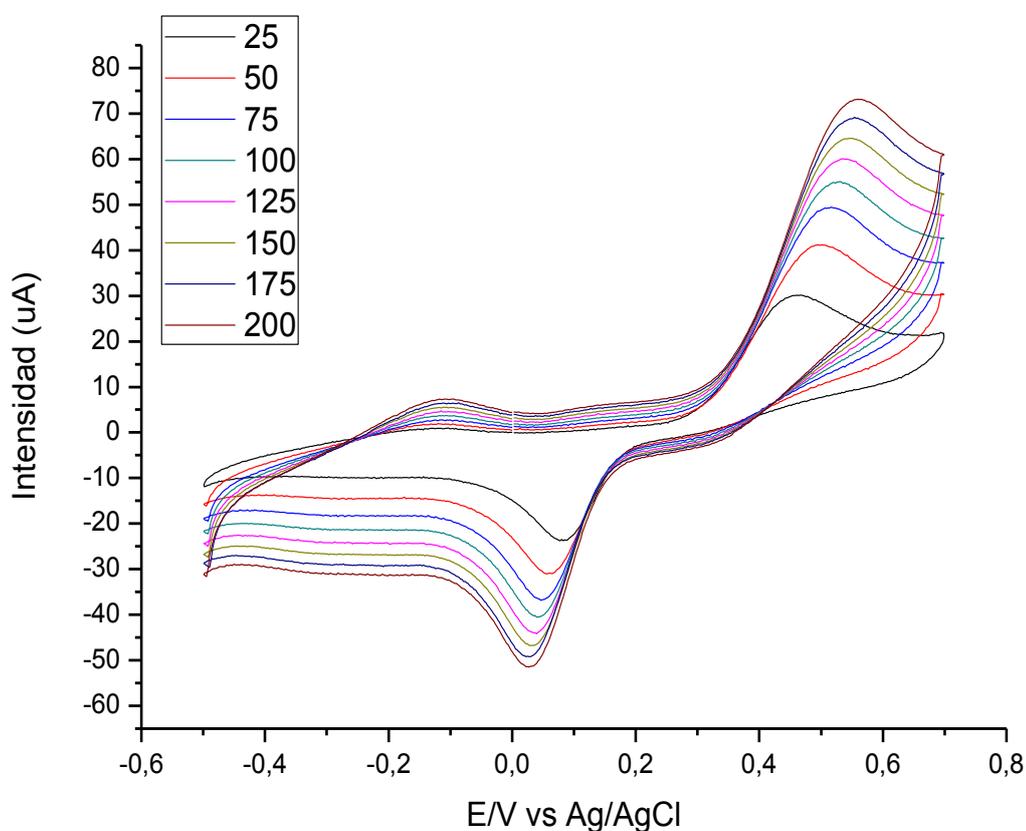


Fig. 4.96. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10) en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de catecol de $1 \times 10^{-4}M$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 500 mV

Se puede observar como en este caso el mecanismo predominante es el de transferencia másica, ya que el ajuste " I vs $v^{1/2}$ " es notablemente mejor que el ajuste " I vs v ".

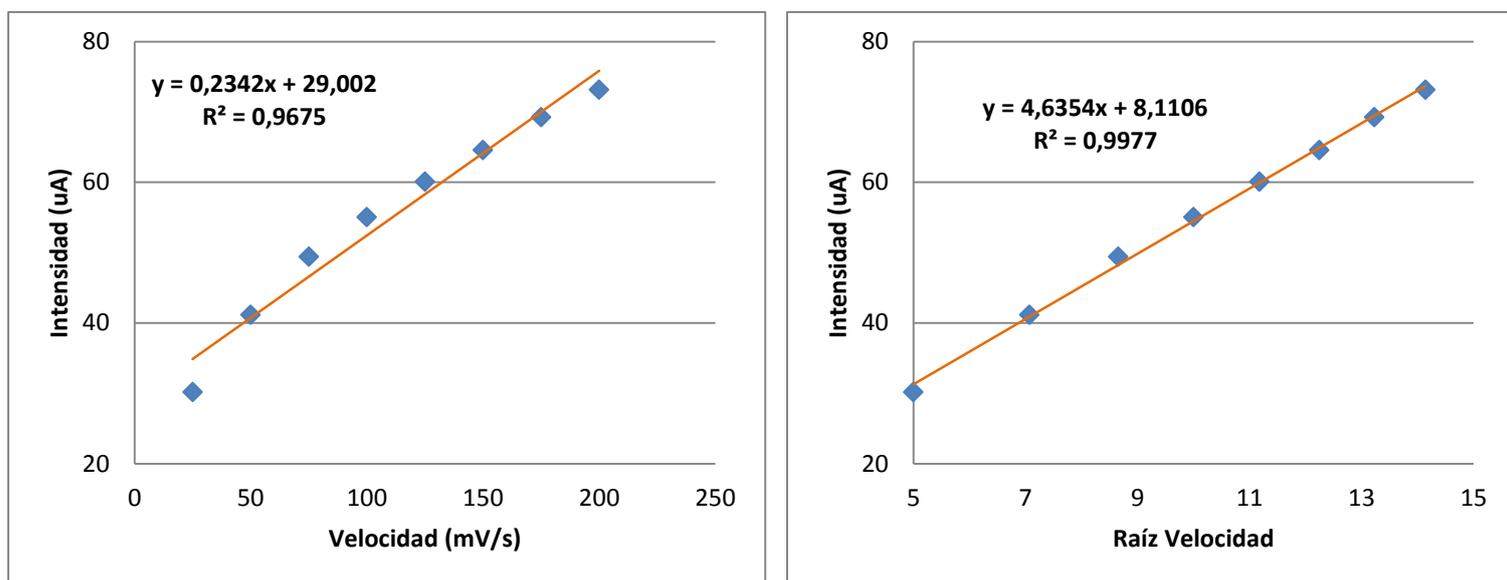


Fig. 4.97. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 550 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 70 mV

Ocurre, exactamente lo mismo que lo observado para el pico de 550 mV. El ajuste " I vs $v^{1/2}$ " es de nuevo notablemente mejor que el ajuste " I vs v ".

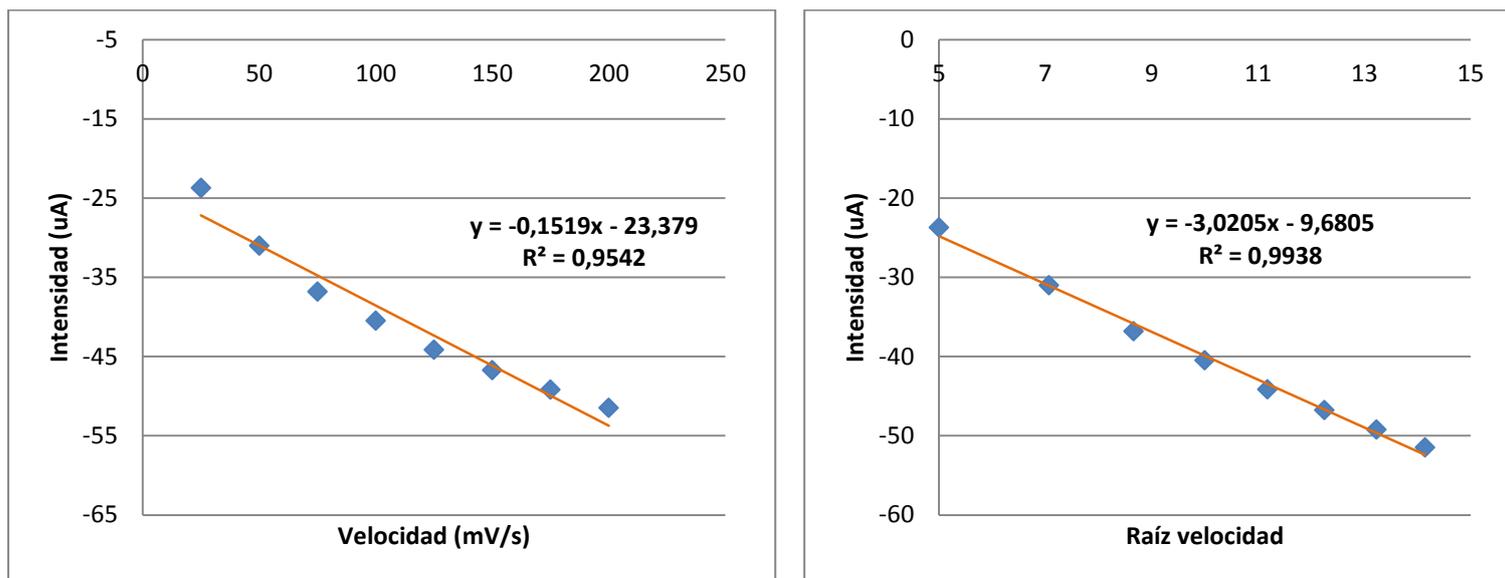


Fig. 4.98. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 70 mV.

- **Electrodo modificado de tirosinasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

Las tendencias observadas en este caso siguen los mismos criterios que en el del electrodo de lutecio con la salvedad de que el pico anódico principal está desplazado hacia la derecha y de hecho, conforme se incrementa la velocidad de barrido cada vez se desplaza más hacia la derecha.

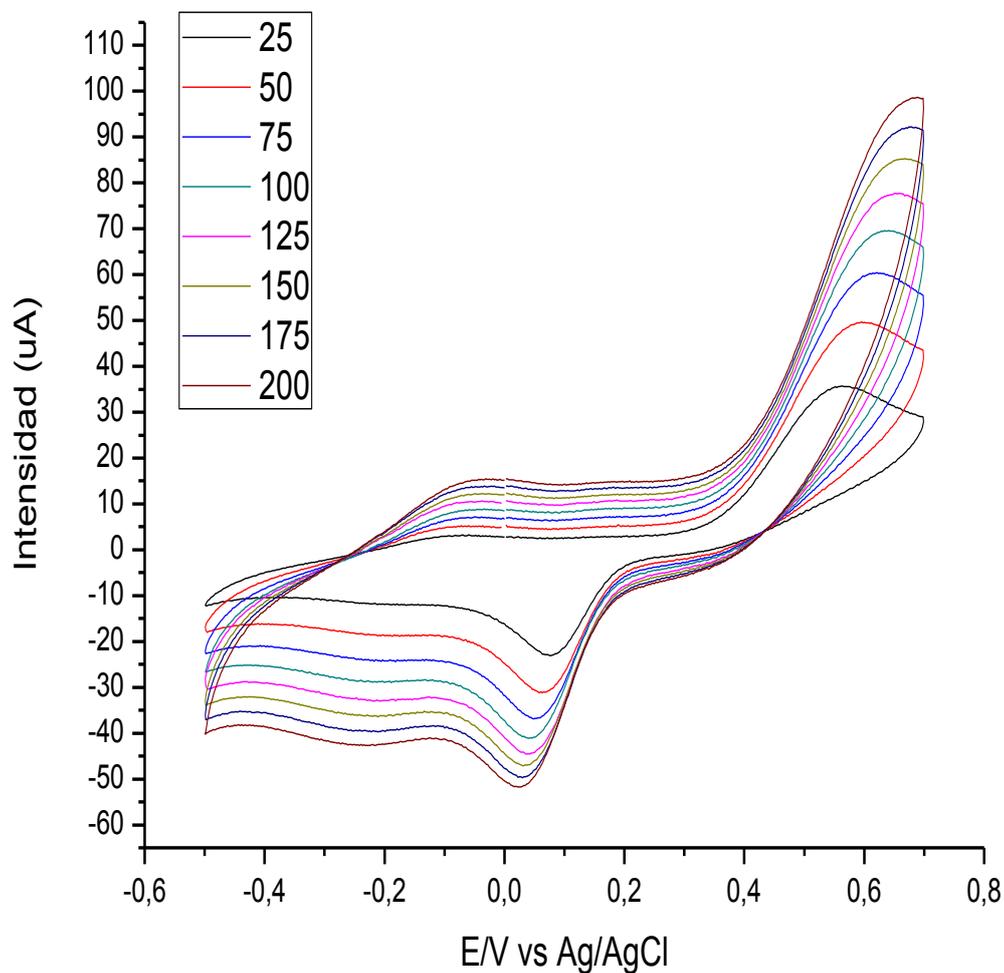


Fig. 4.99. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de catecol de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 650 mV

El ajuste obtenido para los datos de “ I vs $v^{1/2}$ ” es excelente, existiendo una diferencia muy notable entre este ajuste y el ajuste “ I vs v ”, lo cual nos lleva a pensar que el mecanismo predominante es el de transferencia de masa frente al de difusión.

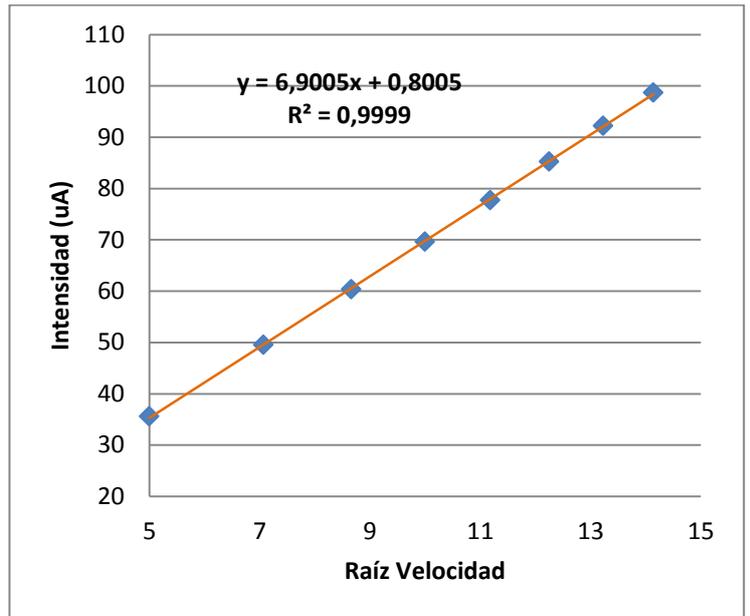
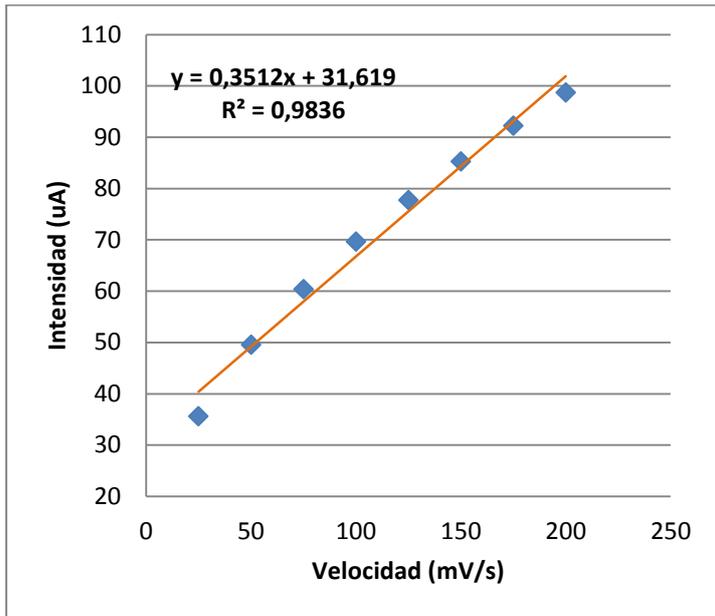


Fig. 4.100. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 650 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 70 mV

Ambos ajustes no son tan buenos como los anteriores, pero la diferencia entre ellos es aún más notable que en el pico anterior. Se aprecia claramente como el mecanismo predominante es el de transferencia másica.

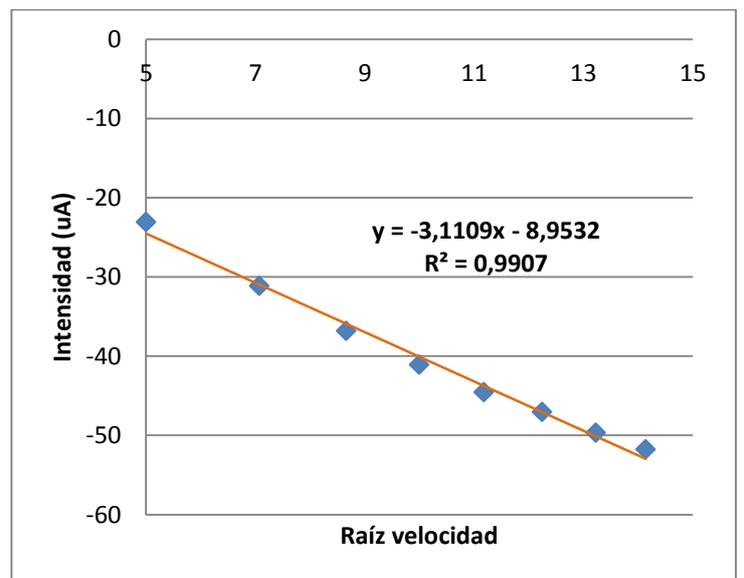
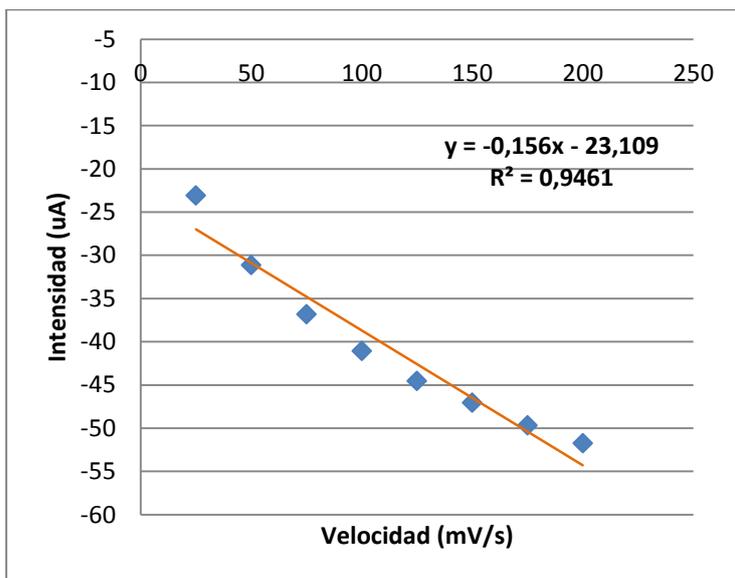


Fig. 4.101. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 70 mV.

▪ Electrodo modificado de lacasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

La situación es similar a la observada en los dos electrodos anteriores. En este caso se puede ver como el pico situado a 550 mV se desplaza a la derecha conforme se incrementa la velocidad de barrido, igual que ocurriría con el electrodo de tirosinasa. De nuevo se puede ver como los incrementos de la intensidad del pico anódico son mucho mayores que los del pico catódico.

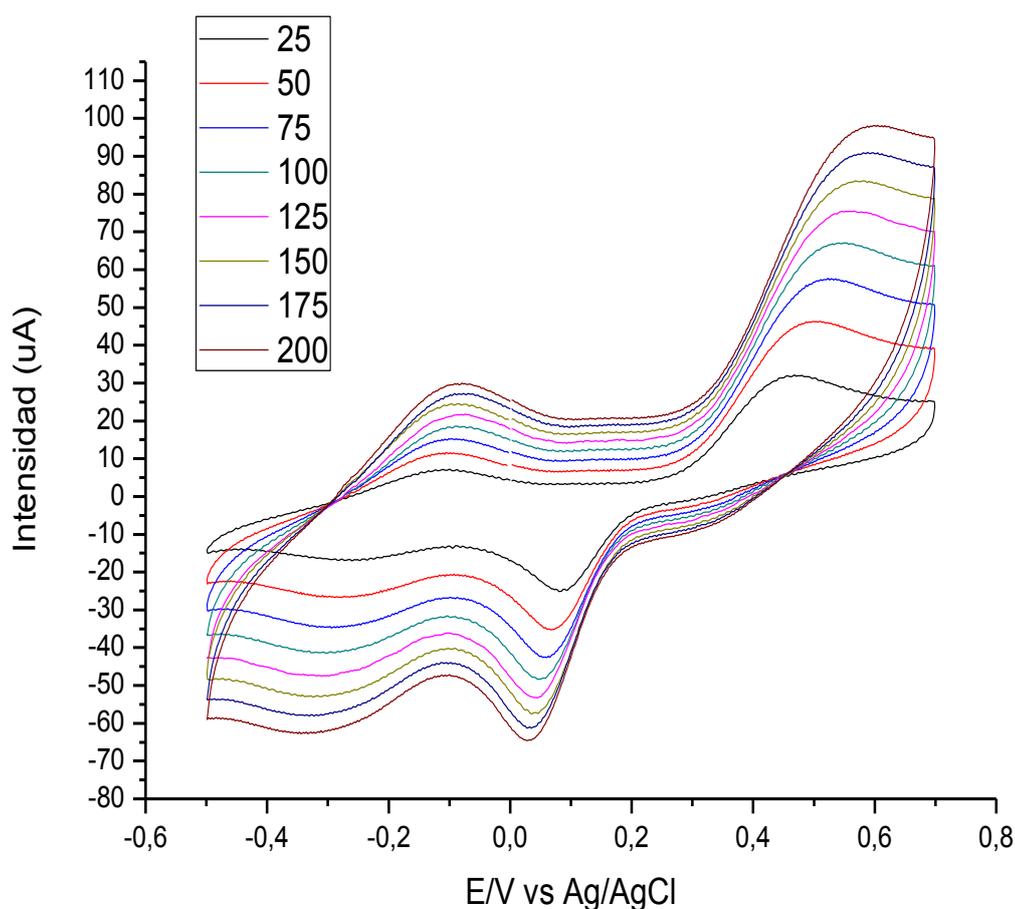


Fig. 4.102. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10)/Lac en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de catecol de 1x10⁻⁴M, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 550 mV

El ajuste de los datos "I vs v^{1/2}" es considerablemente mejor que el ajuste "I vs v", con lo cual se puede llegar a la conclusión de que el mecanismo predominante es el de transferencia de masas. Al igual que lo observado en el electrodo de tirosinasa, el ajuste "I vs v^{1/2}" es excelente.

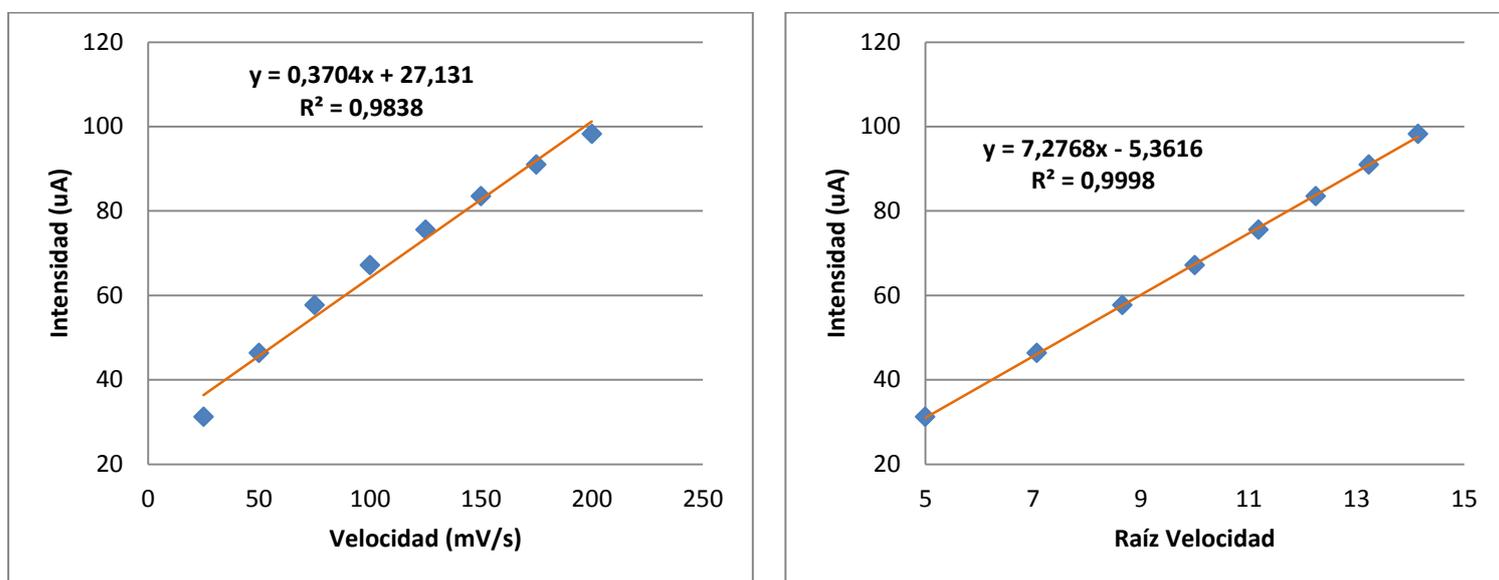


Fig. 4.103. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 550 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 70 mV

Tal y como se pudo observar en los resultados obtenidos para el electrodo de tirosinasa, la calidad de los ajustes es menor, pero las diferencias entre un ajuste y otro de nuevo son mayores, siendo mucho mejor el ajuste "I vs v^{1/2}" que el ajuste "I vs v".

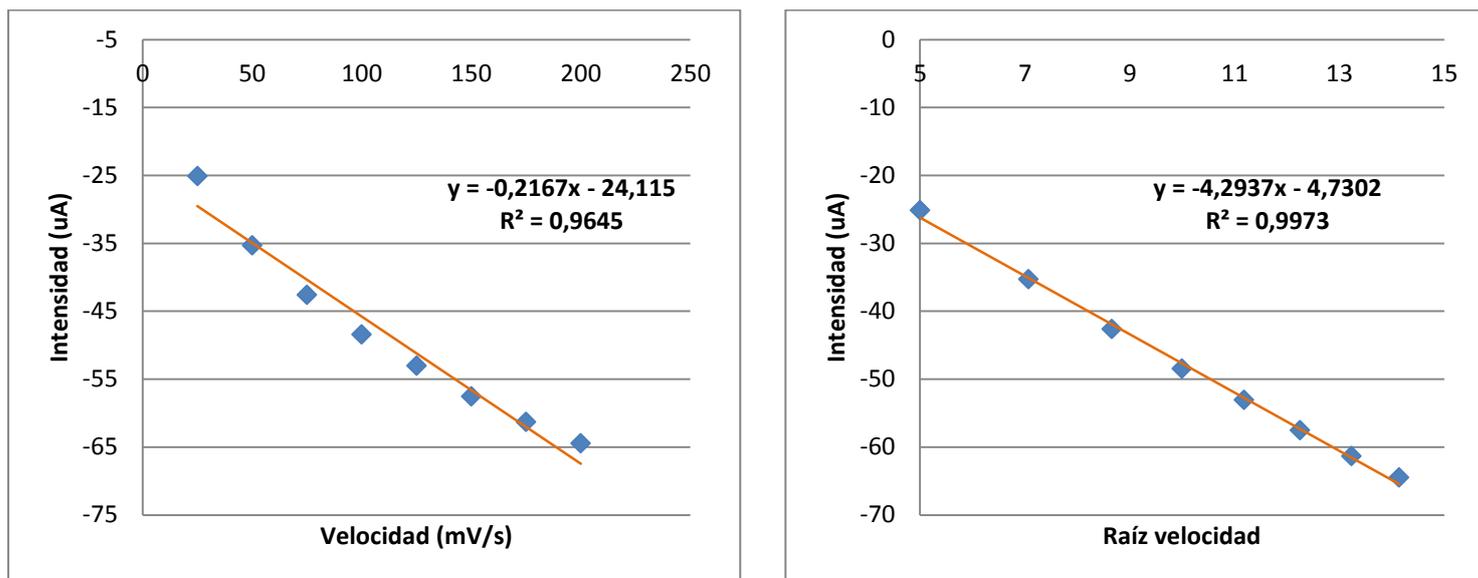


Fig. 4.104. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 70 mV.

D) Hidroquinona

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc₂) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

La tendencia observada en la figura 4.105. es la misma que la obtenida para los otros difenoles. Se producen incrementos muy notables de la intensidad en los tres picos que se pueden observar con claridad, los picos anódicos situados a +0,1V y +0,6V y el pico catódico situado a +0,05V. Los incrementos en la intensidad de la corriente con respecto a la velocidad de barrido de potencial son especialmente notables para el pico situado a +0,6V.

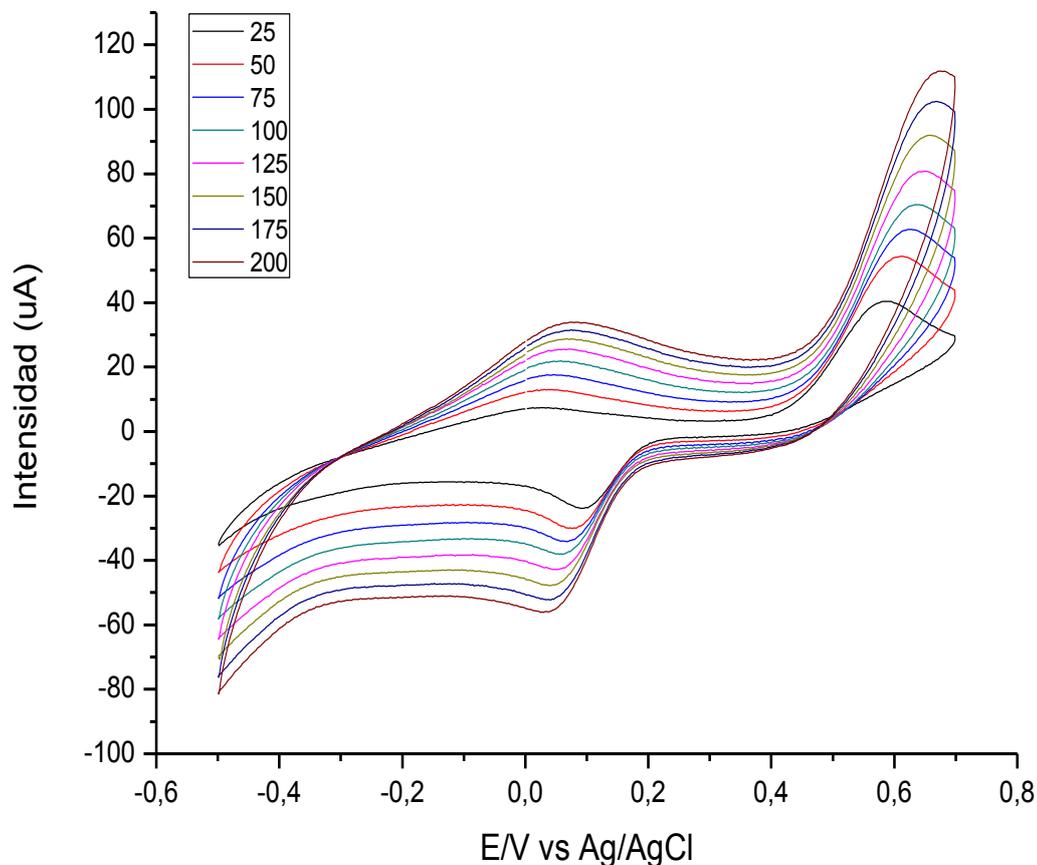


Fig. 4.105. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de hidroquinona de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 600 mV

El mecanismo predominante en este pico es el de difusión, ya que el ajuste es claramente mejor para la gráfica de “ i vs v ”. Este resultado contrasta con lo obtenido en el catecol, en el cual habíamos obtenido que para este pico el mecanismo predominante era el de transferencia másica.

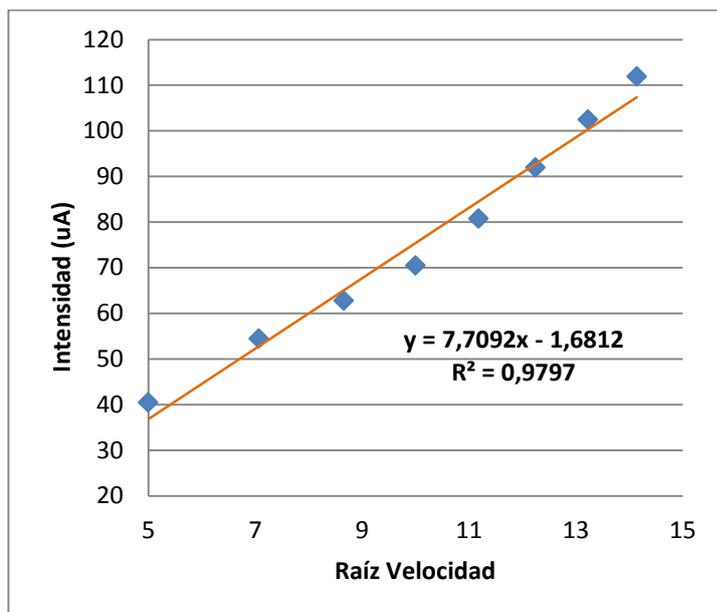
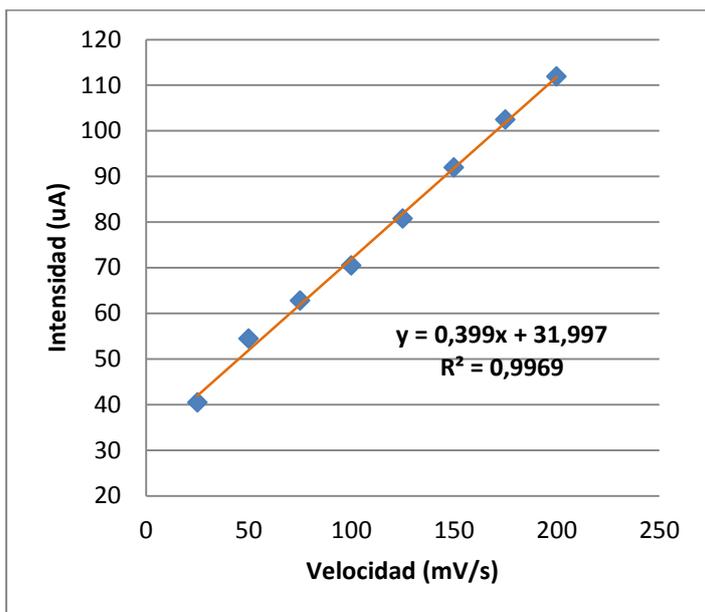


Fig. 4.106. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 600 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 50 mV

De nuevo obtenemos que el mecanismo predominante es el de difusión. Lo cual, al igual que para el caso anterior, contrasta con lo obtenido para el catecol. Por otra parte, estos resultados coinciden con lo obtenido para el ácido cafeico, sin embargo, cabría esperar que se obtuviesen resultados similares para el catecol y la hidroquinona, siendo el ácido cafeico el que mostrase un comportamiento distinto debido a la presencia de un grupo ácido además de los dos grupos hidroxilos.

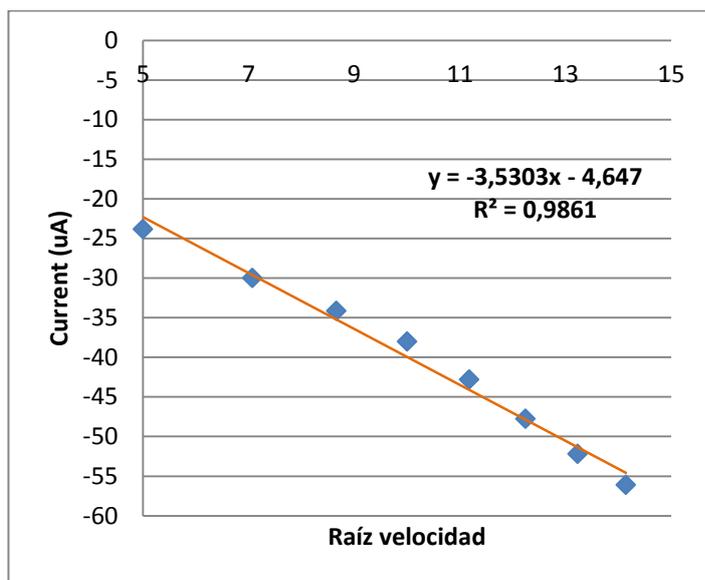
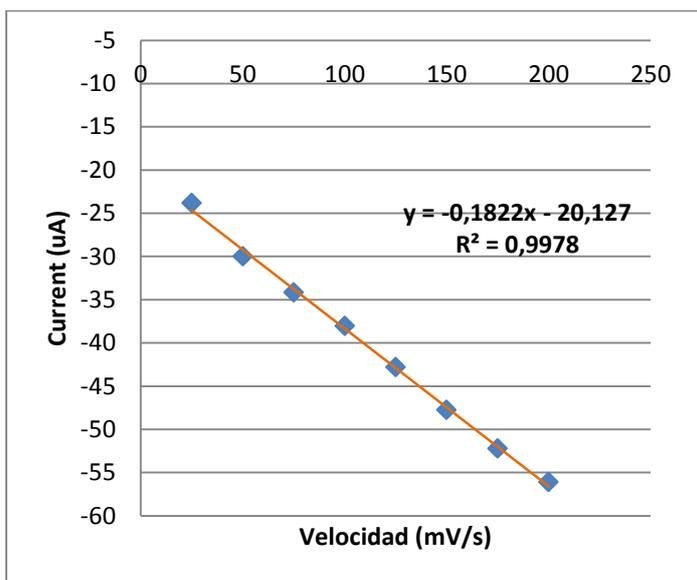


Fig. 4.107. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 50 mV.

▪ Electrodo modificado de tirosinasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

De nuevo se produce un incremento de la intensidad de corriente al aumentar la velocidad de barrido de potencial. También se puede observar que, como ya se comentara en el apartado de concentraciones para la hidroquinona, los picos están desplazados hacia potenciales menores debido a que las enzimas ejercen un efecto electrocatalítico. También se puede observar como el pico anódico situado a 0,5V se desplaza hacia potenciales mayores, mientras que el pico catódico situado a -0,1V se desplaza hacia potenciales menores.

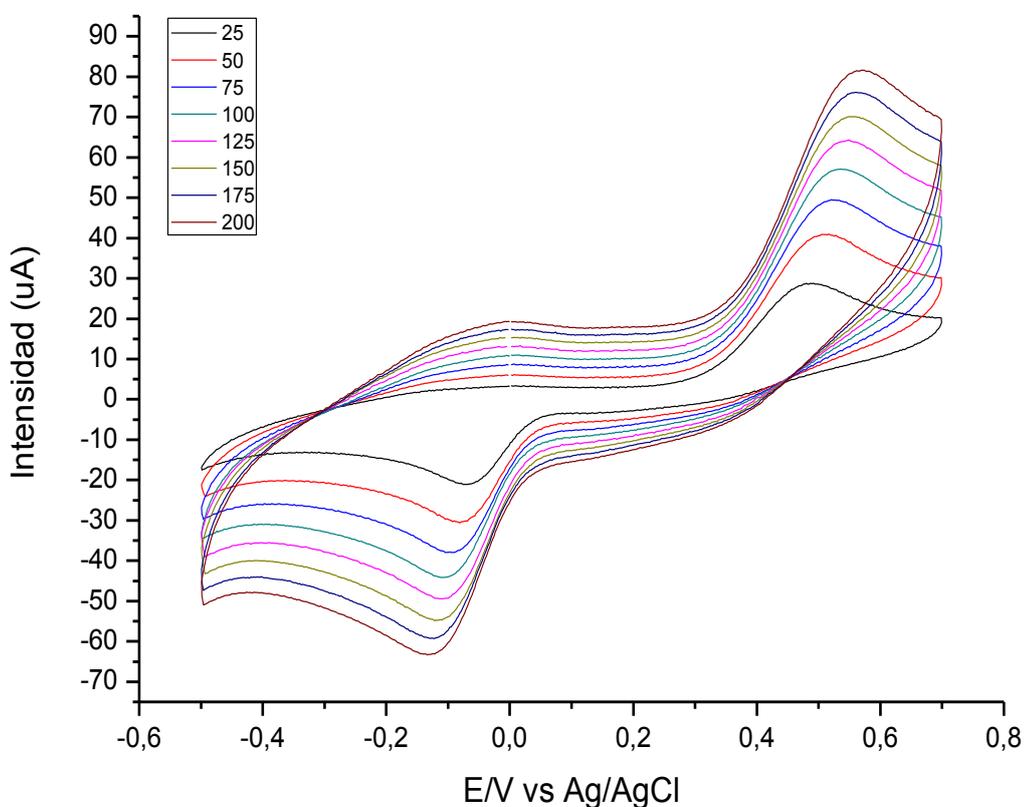


Fig. 4.108. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de hidroquinona de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 550 mV

El ajuste obtenido para los datos de " I vs $v^{1/2}$ " es muy bueno y claramente mejor que el obtenido para la gráfica " I vs v ". Con lo cual, a diferencia de lo obtenido para el electrodo de lutecio la reacción que tiene lugar en este pico se rige por el mecanismo de transferencia másica. Lo cual en este caso si que está en consonancia con lo obtenido para el catecol, siendo además los resultados del ajuste muy similares. También coincide con lo obtenido para el cafeico.

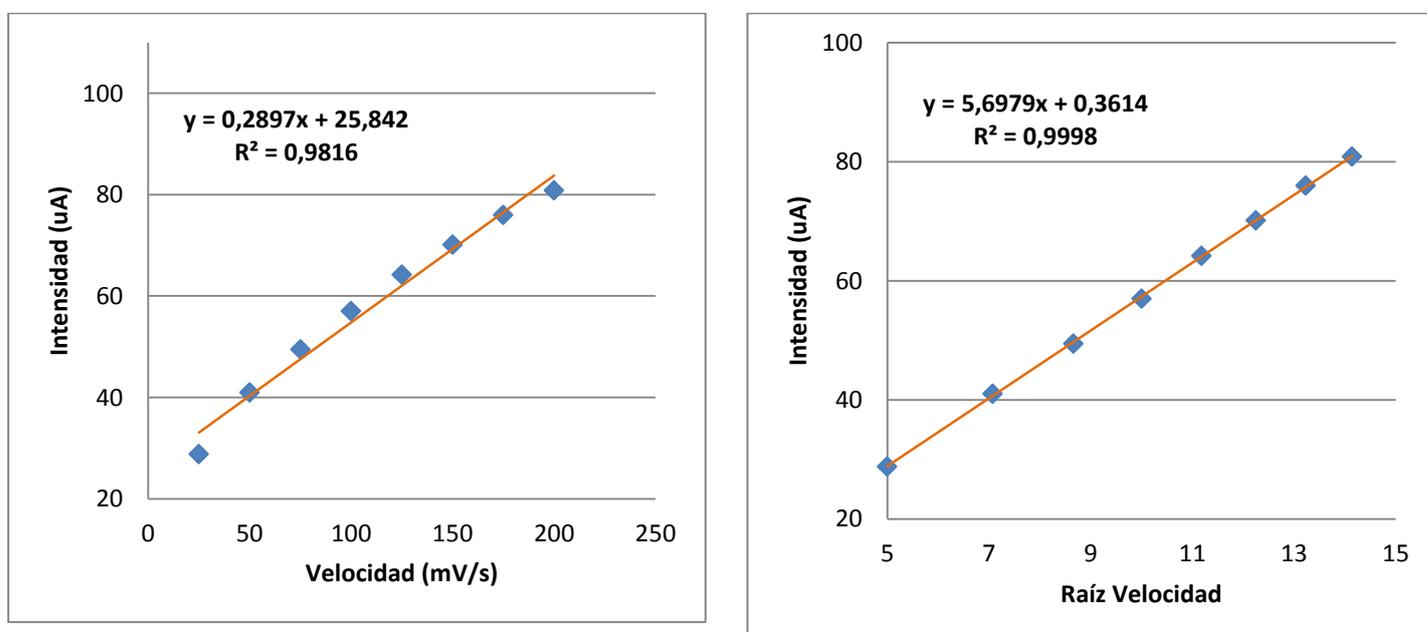


Fig. 4.109. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 550 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de -100 mV

En este pico se obtiene un ajuste " I vs $v^{1/2}$ " excelente, netamente superior al obtenido para los datos de " I vs v ". Con lo cual, también este pico está regido predominantemente por el mecanismo de transferencia de masa. Coincidiendo este comportamiento con el obtenido para los otros dos difenoles.

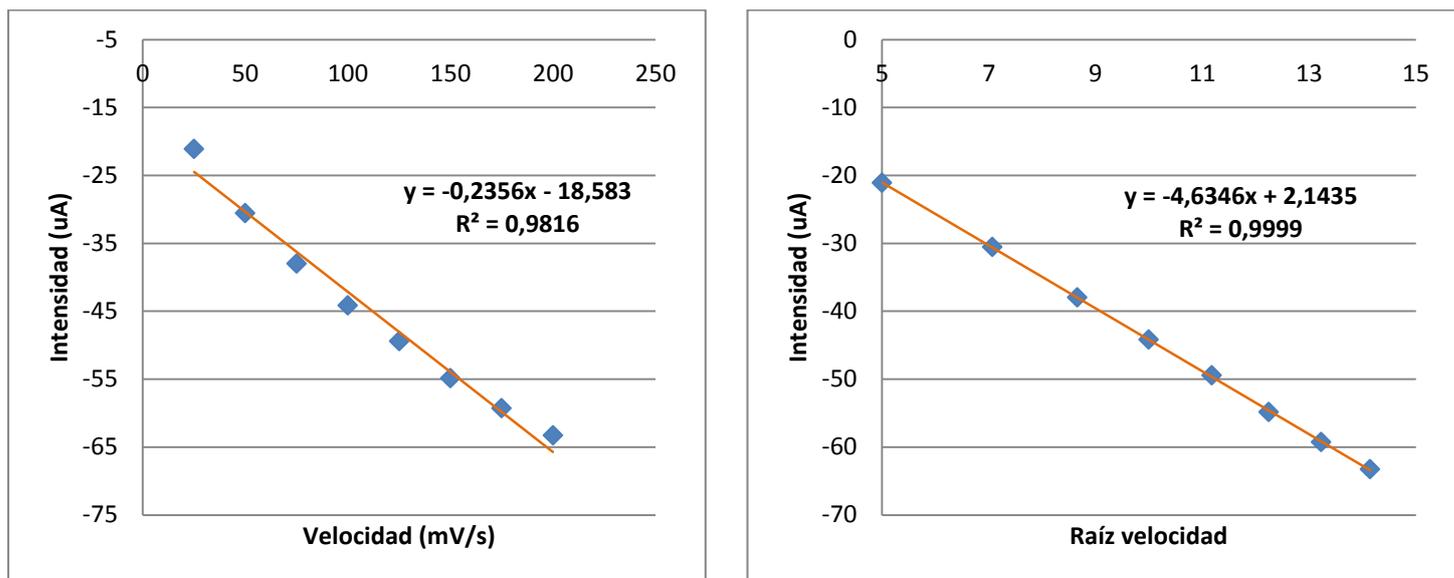


Fig. 4.110. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de -100 mV.

▪ Electrodo modificado de lacasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

Se sigue observando como al incrementar la velocidad de barrido se incrementa la intensidad de la respuesta y como además se produce un desplazamiento de los picos similar al observado para el electrodo de tirosinasa.

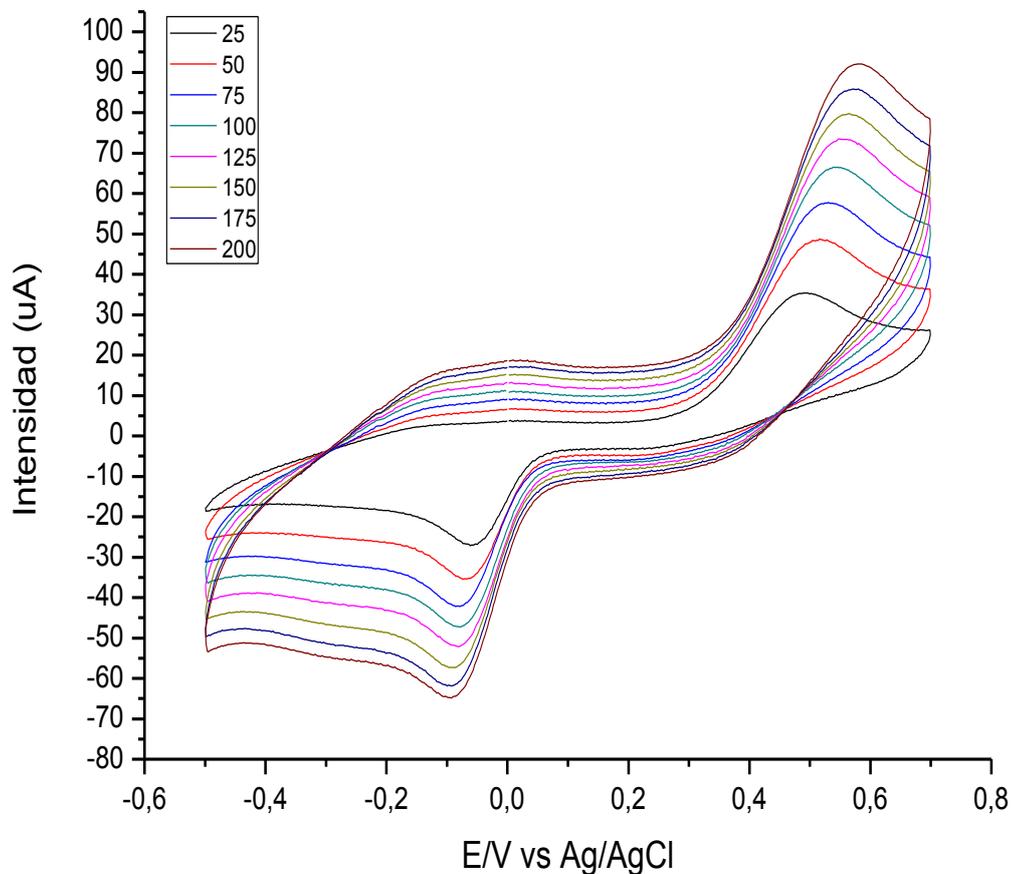


Fig. 4.111. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2 + \text{AA}(1:10)/\text{Lac}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de hidroquinona de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 550 mV

El ajuste de los datos " i vs $v^{1/2}$ " es muy bueno y además es considerablemente mejor que el ajuste " i vs v ", con lo cual se puede llegar a la conclusión de que el mecanismo predominante es el de transferencia de masas.

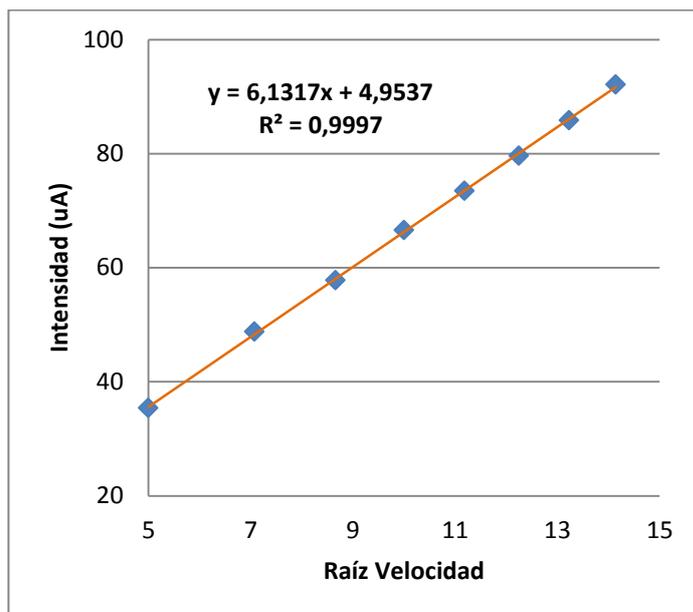
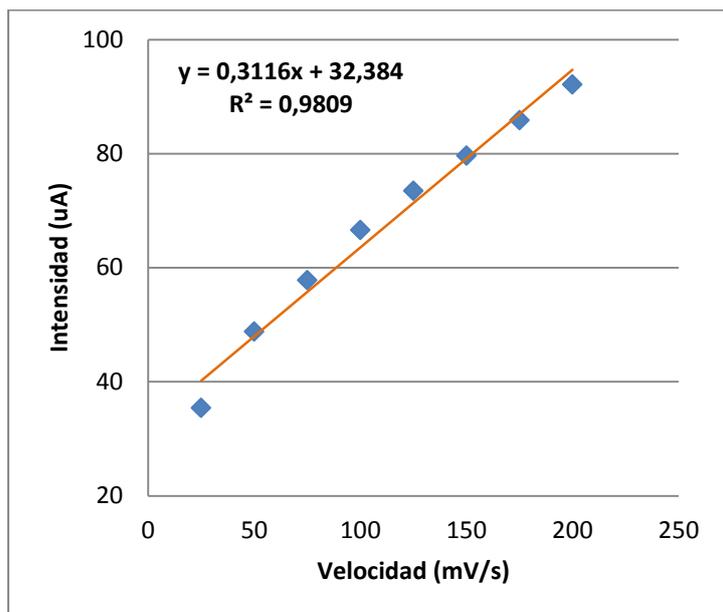


Fig. 4.112. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 550 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de -70 mV

No existen variaciones con respecto al mecanismo predominante con respecto a lo obtenido en el electrodo de tirosinasa. El ajuste de los datos “ I vs $v^{1/2}$ ” es muy bueno y además es considerablemente mejor que el ajuste “ I vs v ”, con lo cual se puede llegar a la conclusión de que el mecanismo predominante es efectivamente el de transferencia de masas.

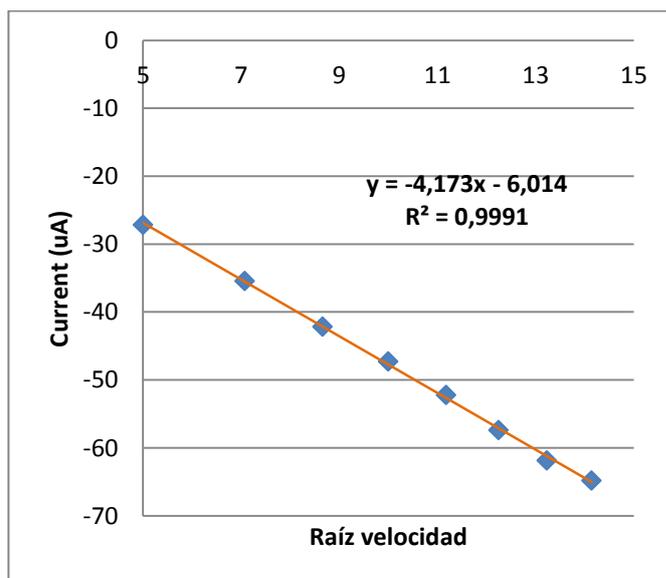
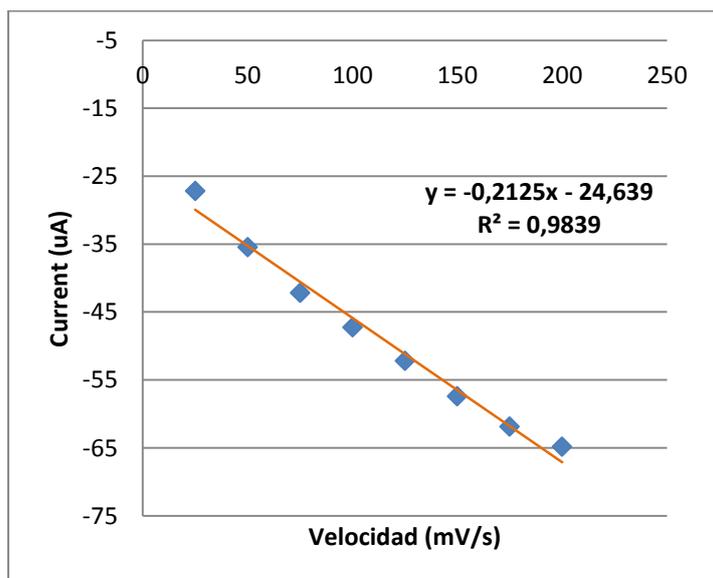


Fig. 4.113. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de -70 mV.

4.3.3.4.4. Trifenoles

E) Pirogalol

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

Para el pirogalol se realiza un estudio cinético de los picos anódicos situados a 300 mV y a 600 mV. Podemos ver como de nuevo se cumple que a mayor velocidad de barrido de potencial se obtienen mayores intensidades.

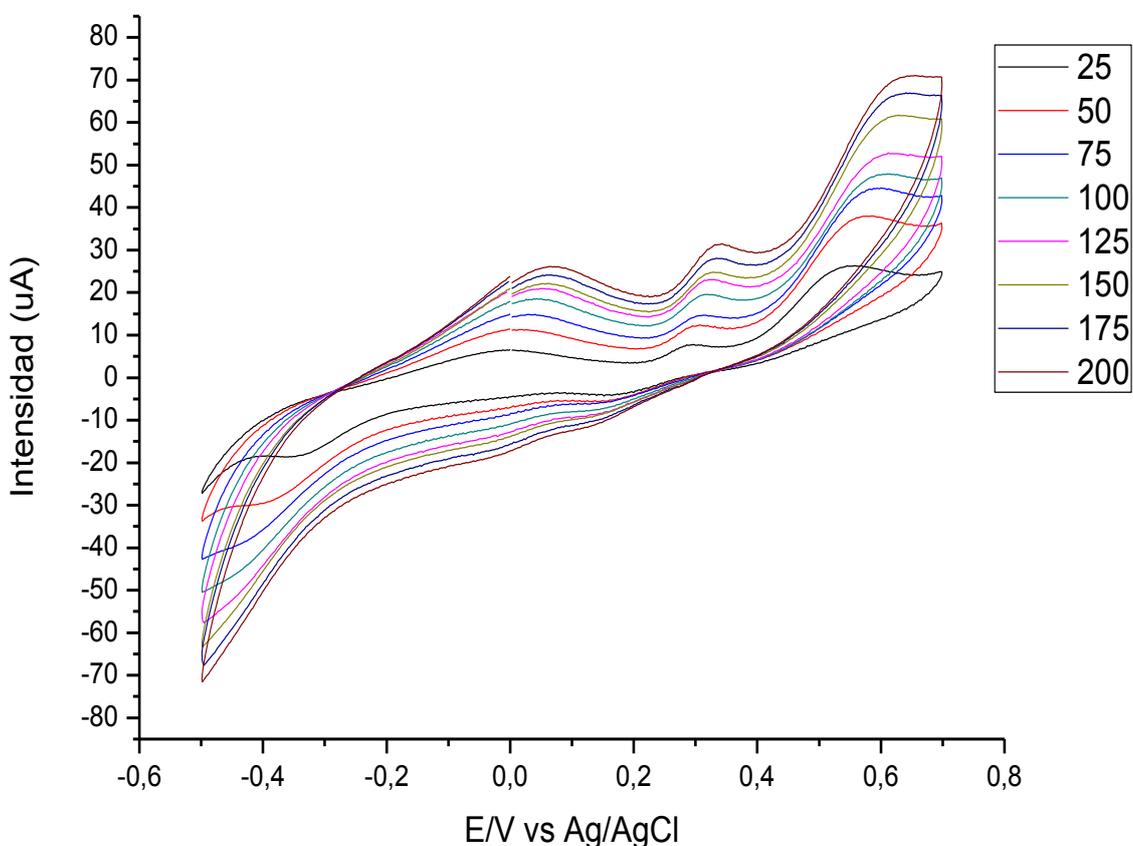


Fig. 4.114. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10) en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de pirogalol de $1 \times 10^{-4}M$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 300 mV

Las diferencias entre ambos ajustes no son demasiado amplias, siendo algo mejor el ajuste "I vs v" que el ajuste "I vs $v^{1/2}$ ".

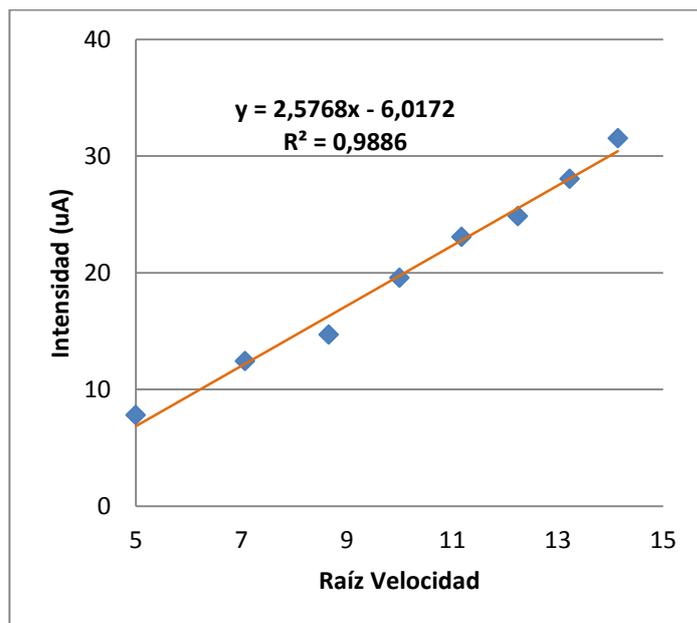
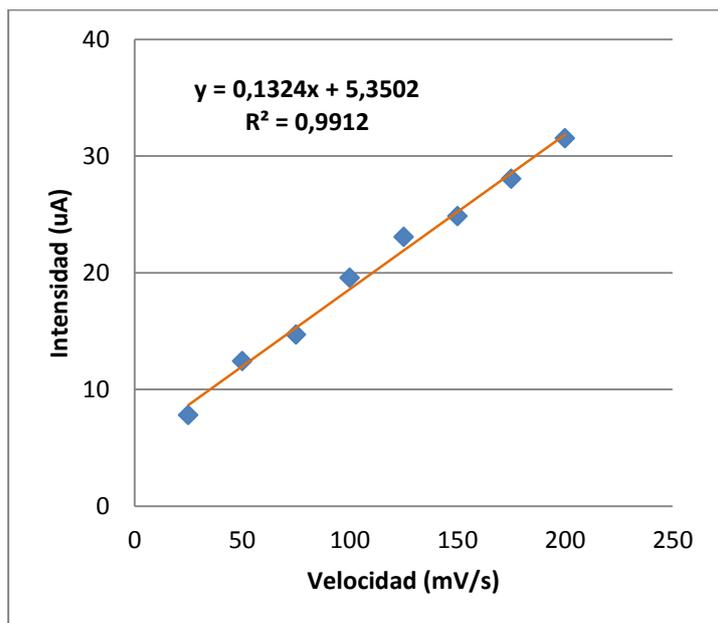


Fig. 4.115. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 300 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 600 mV

En este pico se observa, a diferencia del pico situado a +300 mV, que el ajuste "I vs $v^{1/2}$ " es algo mejor.

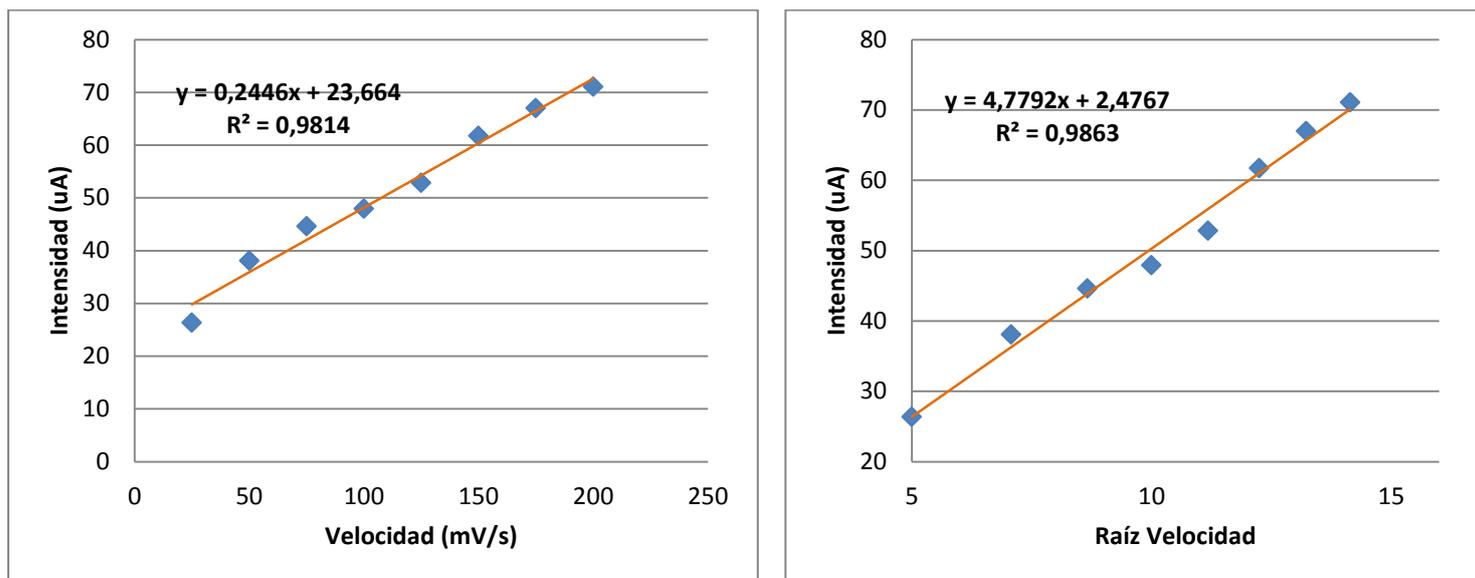


Fig. 4.116. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 600 mV.

▪ Electrodo modificado de tirosinasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

Los dos picos sobre los cuales analizamos la cinética se han desplazado aproximadamente unos 100 mV hacia la izquierda, es decir, los picos se han desplazado hacia potenciales menores.

Por lo demás la tendencia sigue siendo la misma y se observan incrementos de intensidad con respecto a los aumentos de velocidad de barrido de potencial.

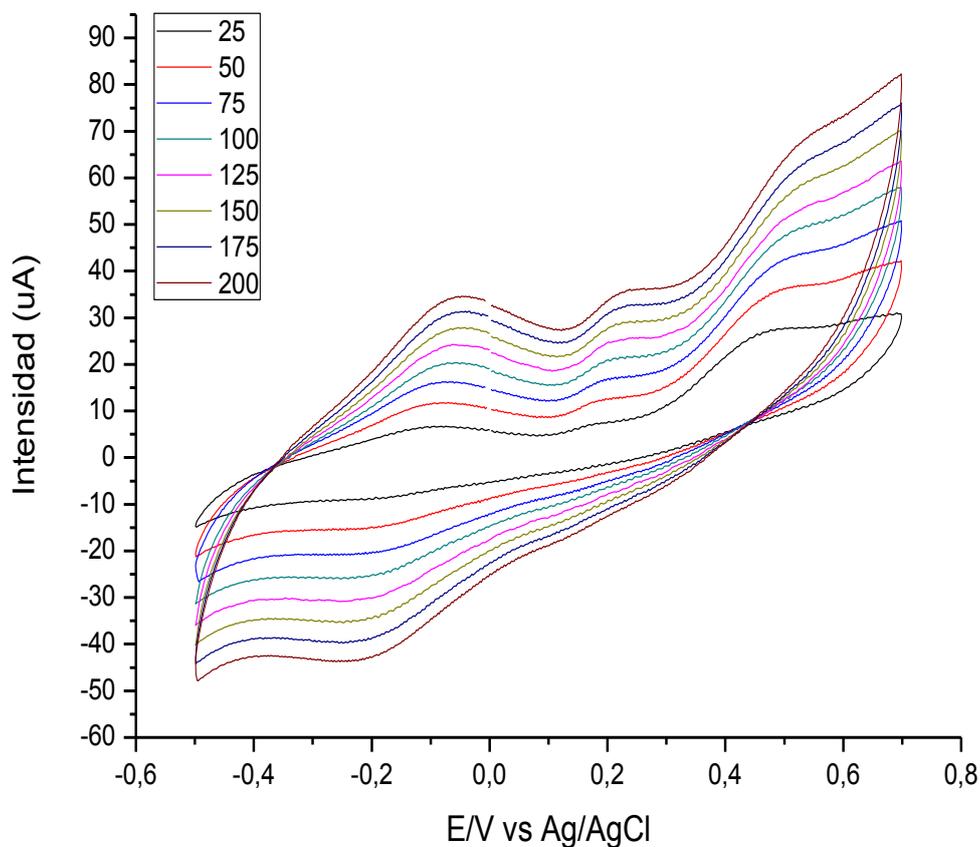


Fig. 4.117. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de pirogalol de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 200 mV

Los dos ajustes son buenos y al igual que ocurría para el electrodo de lutecio el ajuste de "I vs v" es ligeramente mejor que el de "I vs $v^{1/2}$ ".

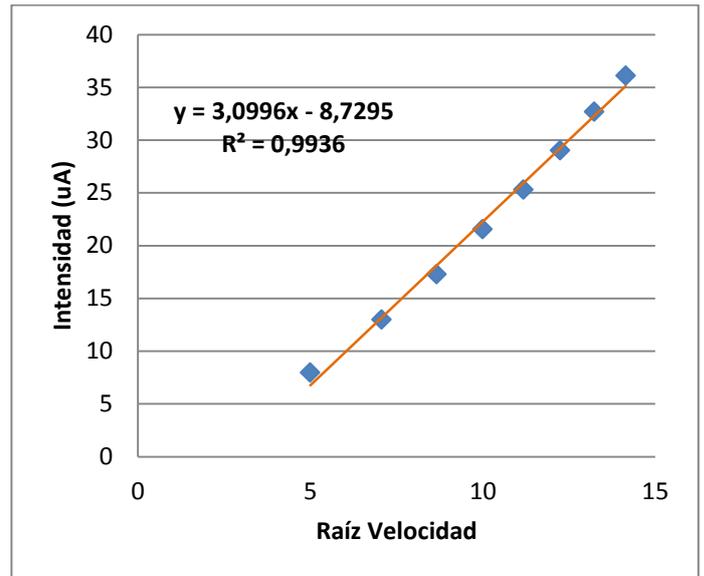
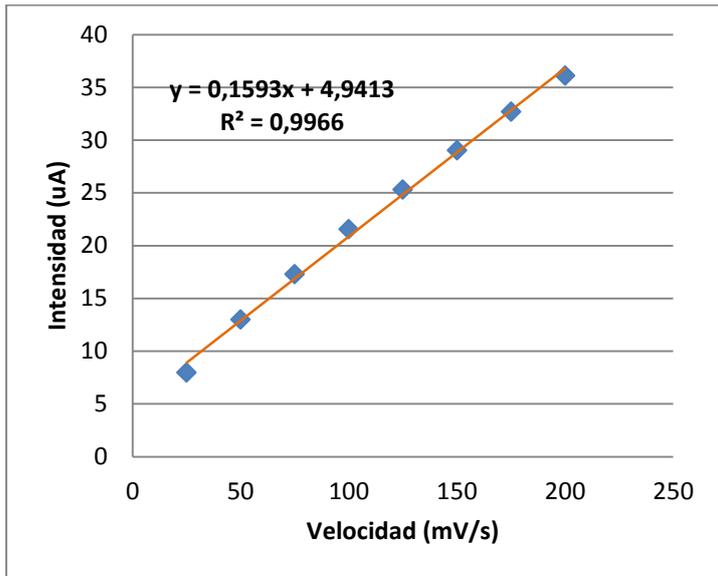


Fig. 4.118. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 200 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 500 mV

Los ajustes son prácticamente iguales en este caso.

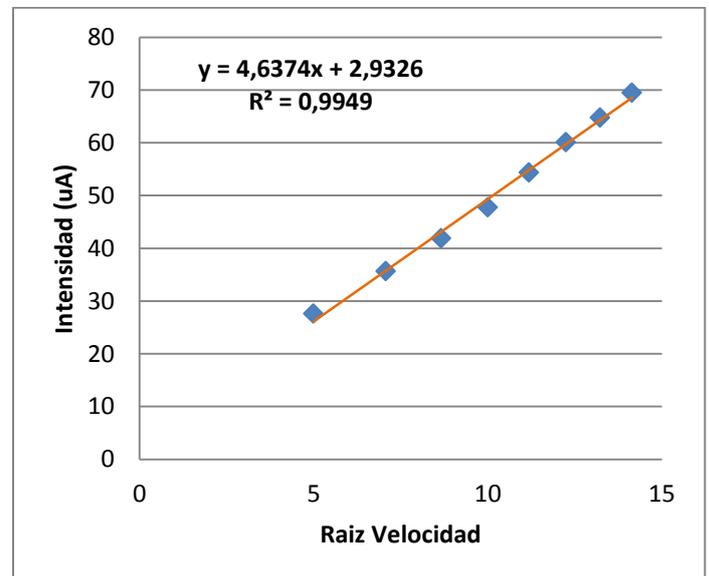
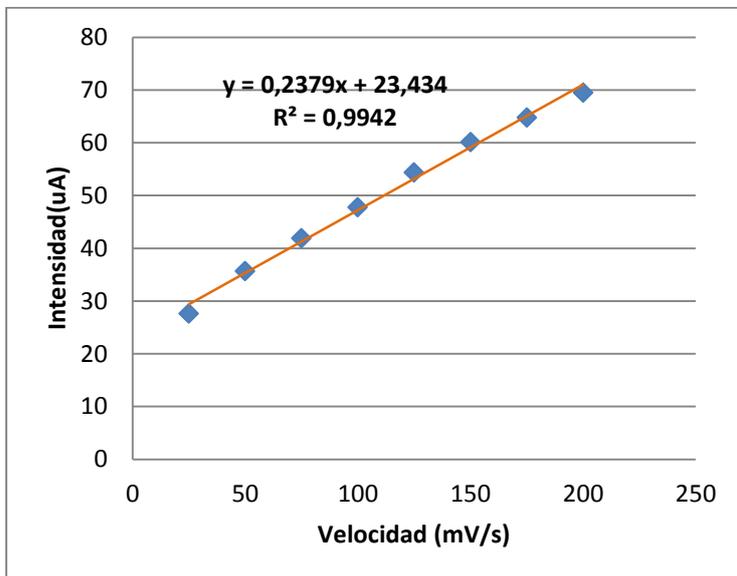


Fig. 4.119. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 500 mV.

- Electrodo modificado de lacasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

Los picos de intensidad a potenciales intermedios entre los observados para el electrodo de lutecio y el de tirosinasa. De nuevo se observa esa tendencia habitual de incremento de intensidad con respecto al incremento de la velocidad de barrido. También se puede apreciar como el pico situado en este caso a +550 mV es aún más difícil de observar que en la tirosinasa para velocidades de barrido altas debido al pico de la ftalocianina situado a 700 mV.

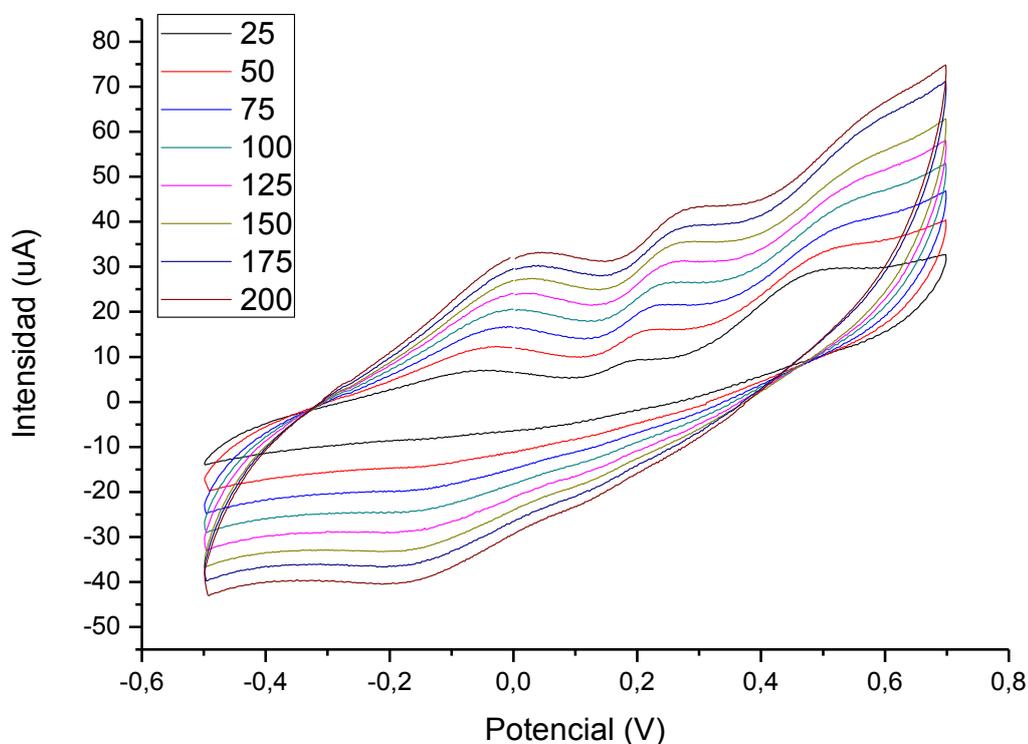


Fig. 4.120. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Lac}$ en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de pirogalol de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 250 mV

De nuevo se repiten los resultados obtenidos para los dos electrodos anteriores, obteniendo un mejor ajuste para "I vs v" que para "I vs v^{1/2}". Sin embargo, en este caso las diferencias apreciadas si que son notables, con lo cual puede concluirse que el mecanismo que rige de forma predominante la reacción que tiene lugar a este potencial es el mecanismo de difusión.

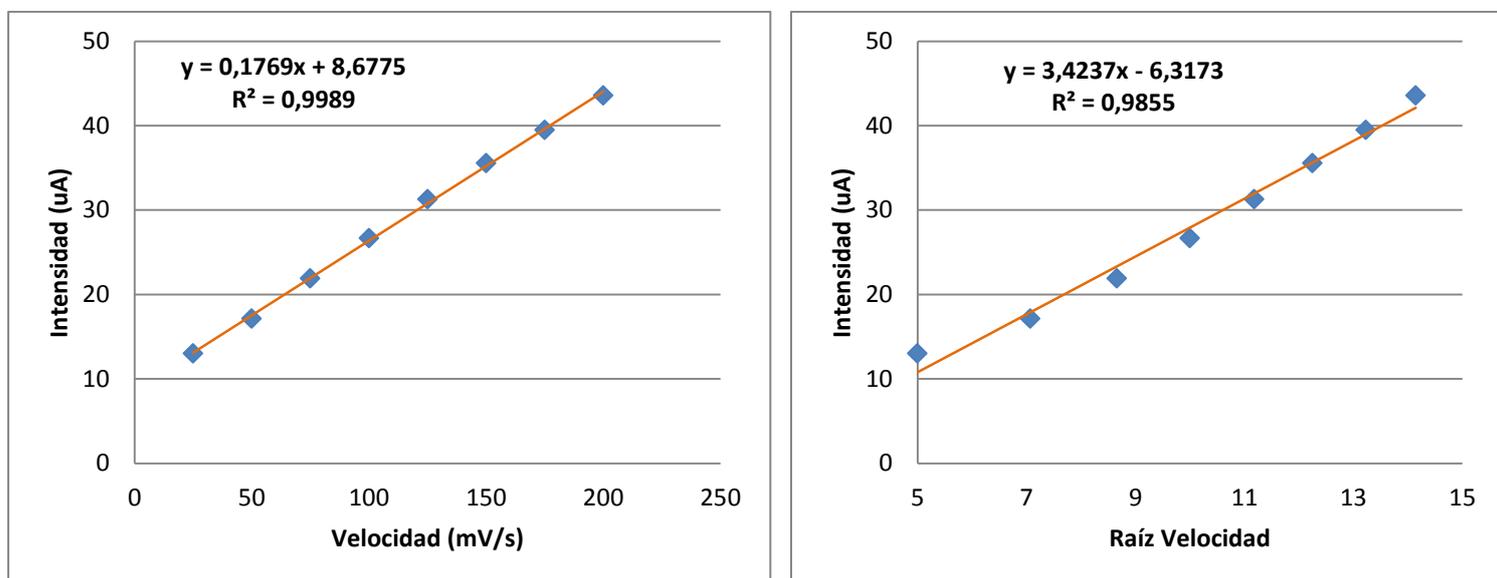


Fig. 4.121. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 300 mV.

2) Pico de intensidad a un potencial de 550 mV

En este pico vuelve a predominar el mecanismo de difusión ya que el ajuste "I vs v" es sensiblemente mejor que el "I vs v^{1/2}".

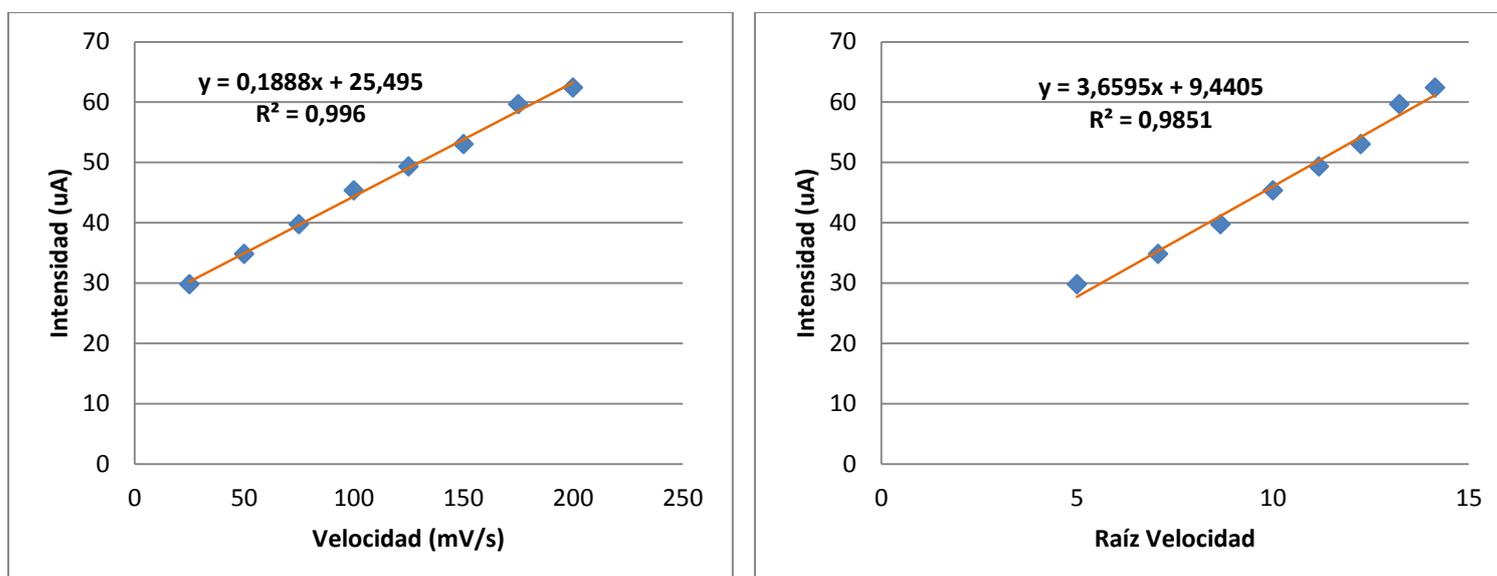


Fig. 4.122. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 600 mV.

F) Ácido gálico

▪ Electrodo modificado de bisftalocianina de lutecio

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 sobre un cristal de ITO.

Para el ácido gálico vamos a analizar el pico situado a un potencial de +700 mV, pico que aparece incompleto pero del cual se pueden observar perfectamente los incrementos de la magnitud de la intensidad de la corriente con respecto al aumento de la velocidad de barrido de potencial.

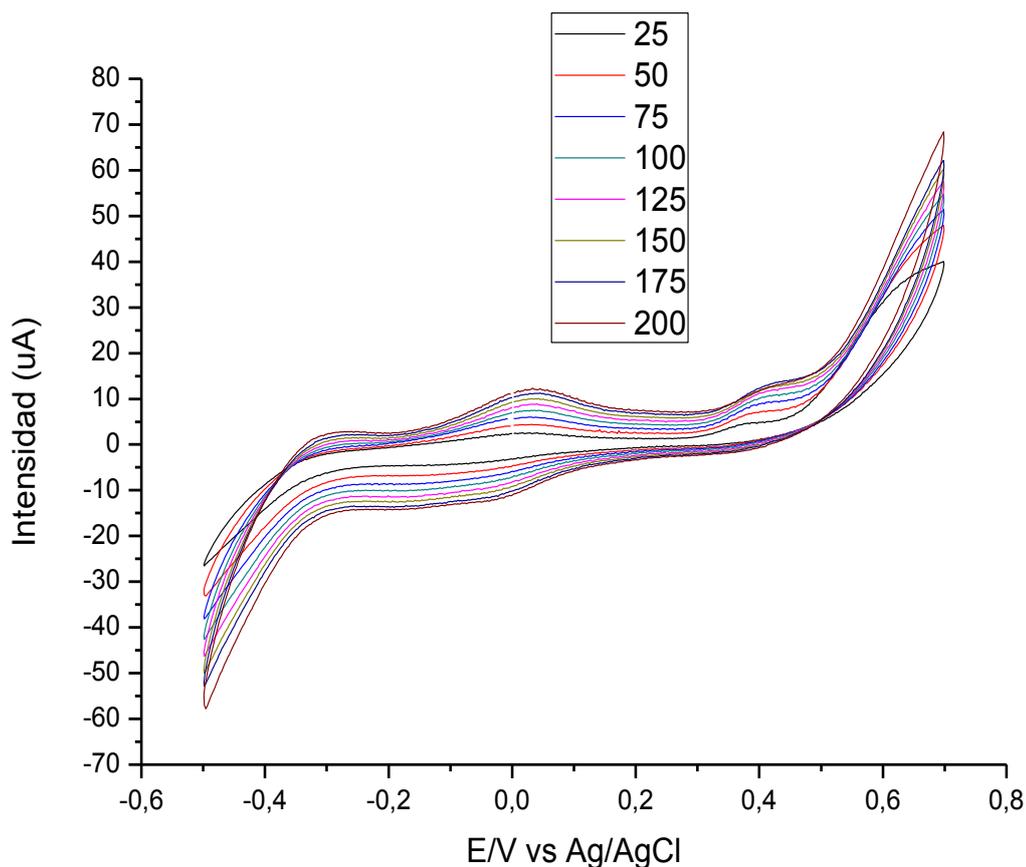


Fig. 4.123. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de LuPc₂+AA(1:10) en una disolución buffer de fosfato 0,01M, pH=7, con una concentración de ácido gálico de 1x10⁻⁴M, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

Cabe destacar que a un potencial de 450 mV se observa un pico anódico extraño que no aparece en los electrodos de enzima. Dicho pico puede deberse a alguna impureza y no es representativo.

1) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

Los dos ajustes obtenidos no son muy buenos, sin embargo, puede observarse que es notablemente mejor el ajuste obtenido para “I vs v^{1/2}”. Con lo cual podría afirmarse que el mecanismo principal es el de transferencia másica.

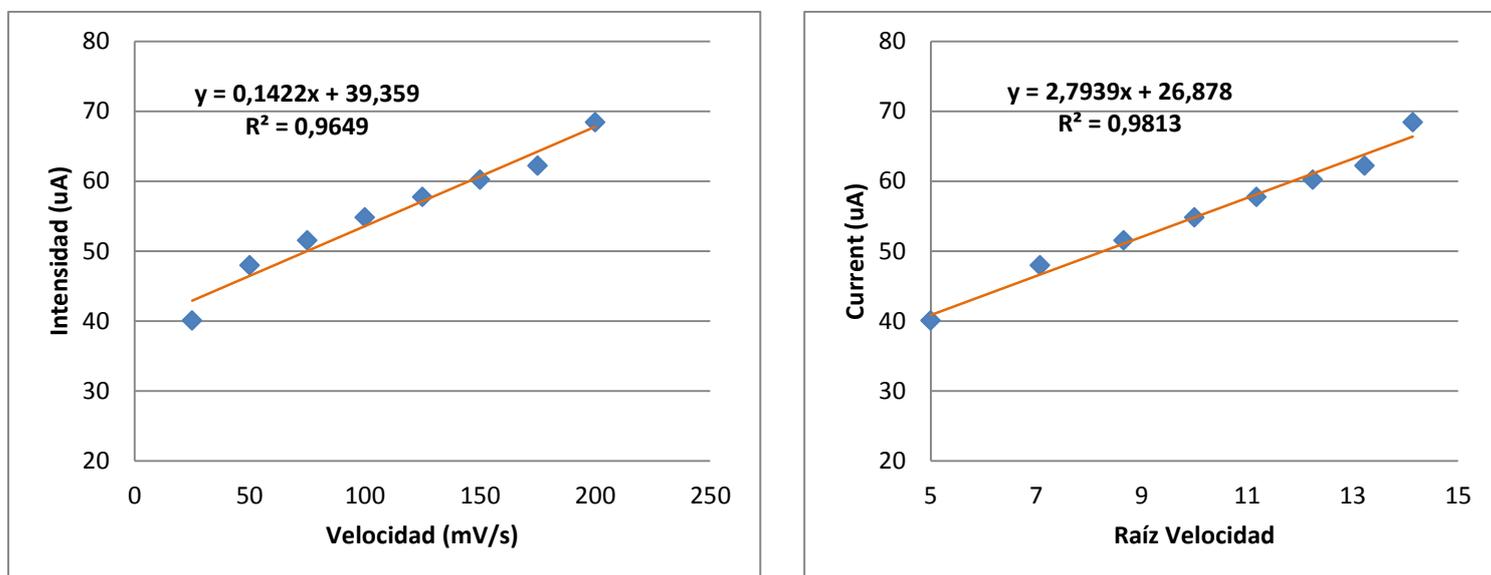


Fig. 4.124. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 700 mV.

▪ Electrodo modificado de tirosinasa

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc₂) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima tirosinasa (Tyr), sobre un cristal de ITO.

En este electrodo los incrementos de intensidad son aparentemente mayores y más regulares, con lo cual cabría esperar que se obtuvieran mejores ajustes.

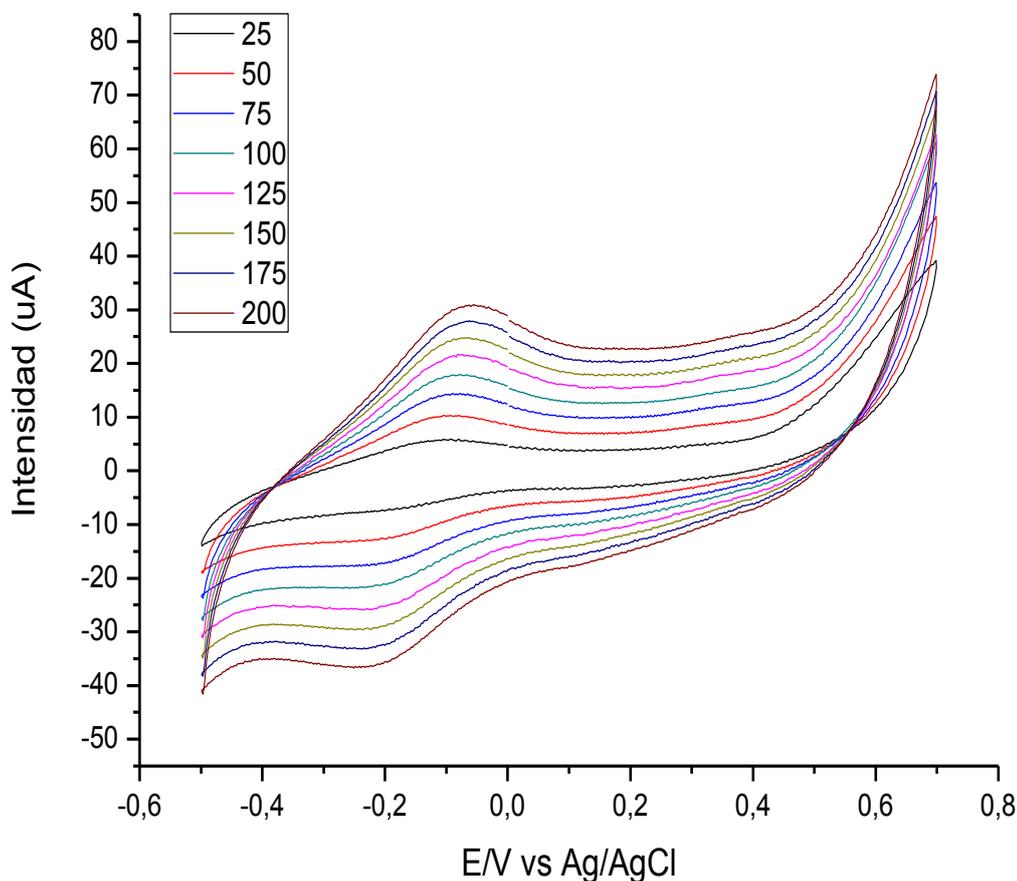


Fig. 4.125. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de ácido gálico de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

El ajuste obtenido para los datos " I vs $v^{1/2}$ " es considerablemente mejor que en el caso anterior y considerablemente mejor que el ajuste " I vs v ", con lo cual de nuevo se puede concluir que el mecanismo que rige esta reacción de forma predominante es el de transferencia de masa.

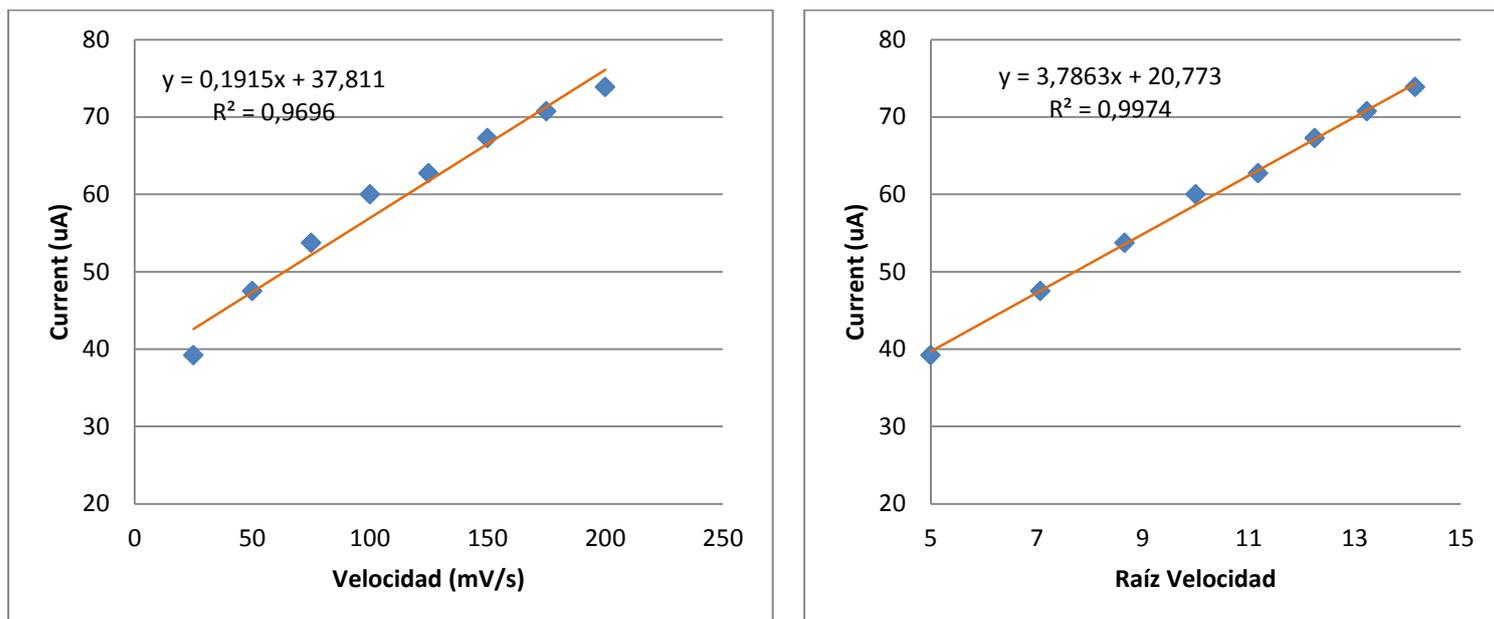


Fig. 4.126. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 700 mV.

- **Electrodo modificado de lacasa**

El electrodo empleado para realizar esta voltametría cíclica fue preparado por deposición mediante la técnica de Langmuir-Blodgett de 11 capas de bisftalocianina de lutecio (LuPc_2) y ácido araquídico (AA) en proporción 1:10 y de 9 capas del enzima lacasa (Lac), sobre un cristal de ITO.

El patrón observado es el mismo que antes, de nuevo tal y como ha ocurrido a lo largo de todas las experiencias de la cinética se observa un incremento de la intensidad con respecto a la velocidad de barrido de potencial.

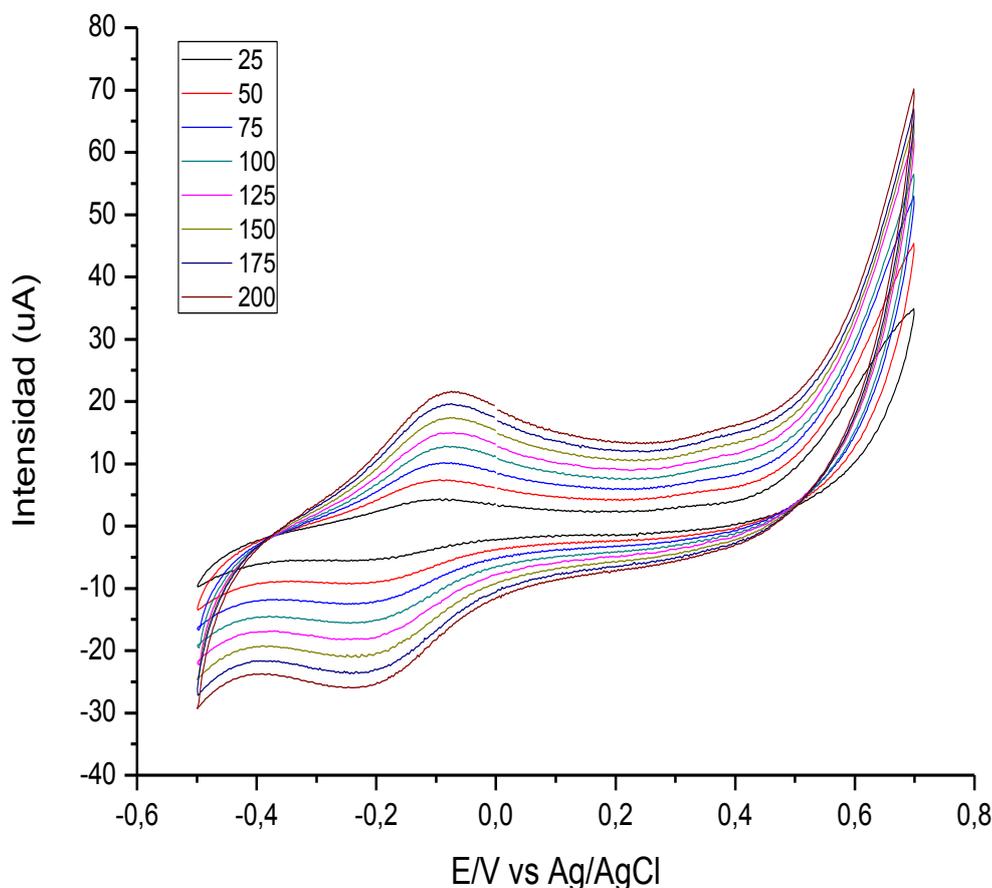


Fig. 4.127. Respuesta voltamétrica de un electrodo modificado de $\text{LuPc}_2+\text{AA}(1:10)/\text{Tyr}$ en una disolución buffer de fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pH}=7$, con una concentración de ácido gálico de $1 \times 10^{-4}\text{M}$, empleando distintas velocidades de barrido de potencial.

1) Pico de intensidad a un potencial de 700 mV

Sin que ninguno de los ajustes sea bueno, si que se puede observar como el ajuste “ I vs $v^{1/2}$ ” es mucho mejor que el ajuste “ I vs v ”. Esto coincide con lo que se ha venido observando para los electrodos anteriores.

Según esto el mecanismo predominante es el de transferencia másica.

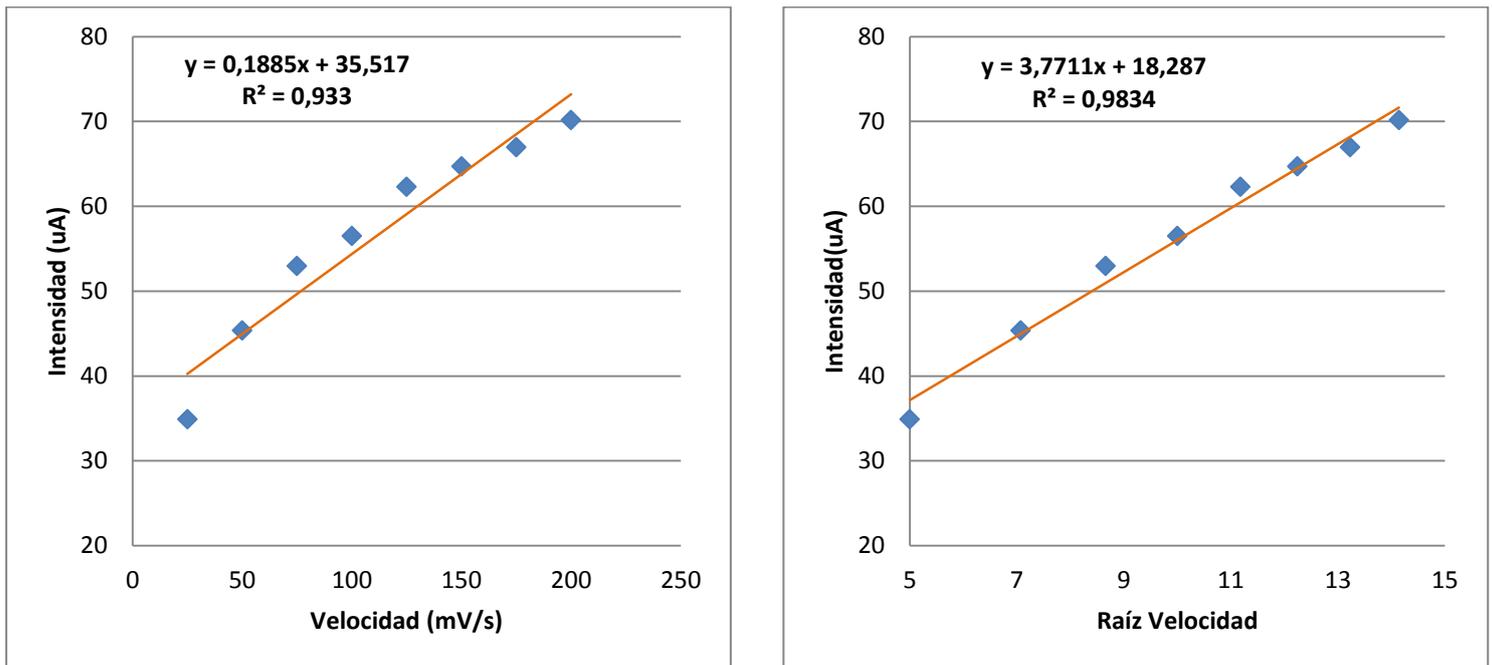


Fig. 4.128. Ajuste lineal de: (a) Intensidad frente a velocidad de barrido de potencial y (b) intensidad frente a raíz de la velocidad de barrido de potencial para el pico de intensidad situado a un potencial de 700 mV.

4.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

4.4.1. Introducción

A la hora de recoger información de una muestra de datos, lo más frecuente es tomar el mayor número posible de variables. Sin embargo, cuando se toman en consideración variables sobre un conjunto de objetos también hay que tener en cuenta los posibles coeficientes de correlación entre ellas y a mayor número de variables se obtiene un mayor número de correlaciones entre ellas. Por ejemplo, para 20 variables habría que considerar $\binom{20}{2} = 180$ posibles coeficientes de correlación. Si en lugar de 20 son 40 las variables consideradas dicho número aumenta hasta 780. Lo cual, es absolutamente inabordable, ya que es prácticamente imposible poder vislumbrar las relaciones existentes entre las distintas variables.

Existe además otro problema que se presenta al trabajar con demasiadas variables. Dicho problema viene dado por la fuerte correlación que muchas veces se presenta

entre las variables al tomar demasiadas, lo normal es que estén relacionadas o que midan lo mismo bajo distintos puntos de vista.

Por ejemplo, en estudios médicos, la presión sanguínea a la salida del corazón y a la salida de los pulmones, están fuertemente relacionadas.

Por lo tanto, reducir el número de variables se convierte en un objetivo prioritario. Es importante resaltar el hecho de que el concepto de mayor información se relaciona con el de mayor variabilidad o varianza. Cuanto mayor sea la variabilidad de los datos (varianza) se considera que existe mayor información, lo cual está relacionado con el concepto de entropía.

Para estudiar las relaciones que se presentan entre “**p**” **variables correlacionadas** (que miden información común) se puede transformar el conjunto original de variables en otro conjunto de nuevas variables incorreladas entre sí (que no tenga repetición o redundancia en la información) llamado conjunto de **componentes principales**.

Las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra.

De modo ideal, se buscan “**m < p**” variables que sean combinaciones lineales de las “**p**” originales y que estén incorreladas, recogiendo la mayor parte de la información o variabilidad de los datos. Este será el objetivo del análisis de componentes principales.

El **análisis de componentes principales (PCA)** es una técnica de análisis estadístico que se utiliza para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, es decir, esta técnica se encarga de hallar las causas de variabilidad de un conjunto de datos y ordena dichas causas de variabilidad según su grado de importancia.

Básicamente lo que hace un PCA es construir una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (llamado el Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente.

Para construir esta transformación lineal debe construirse primero la matriz de covarianza o matriz de coeficientes de correlación. Debido a la simetría de esta matriz existe una base completa de vectores propios de la misma. La transformación que lleva de las antiguas coordenadas a las coordenadas de la nueva base es precisamente la transformación lineal necesaria para reducir la dimensionalidad de datos. Además las coordenadas en la nueva base dan la composición en factores subyacentes de los datos iniciales.

Una de las ventajas de la PCA para reducir la dimensionalidad de un grupo de datos, es que retiene aquellas características del conjunto de datos que contribuyen más a su varianza, manteniendo un orden de bajo nivel de los componentes principales e ignorando los de alto nivel. El objetivo es que esos componentes de bajo orden a veces contienen el aspecto "más importante" de esa información.

Se han realizado varios PCA que permiten comparar los resultados obtenidos entre pares de electrodos y entre los tres tipos de electrodos respecto de las medidas realizadas con antioxidantes.

4.4.2. Lutecio y tirosinasa

Primero se hace un PCA que compare los resultados obtenidos para los electrodos de lutecio [LuPc2+AA(1:10)] y los electrodos de tirosinasa [LuPc2+AA(1:10)/Tyr].

En la gráfica de la figura 4.129. se puede ver como dos componentes principales explican el 90% de la varianza total. Resulta sin embargo, harto complejo determinar que información resume cada componente principal.

Se puede observar como los puntos asociados a cada antioxidante están agrupados en fila, ordenados del ciclo 1 al ciclo 7, de izquierda a derecha, excepto la hidroquinona,

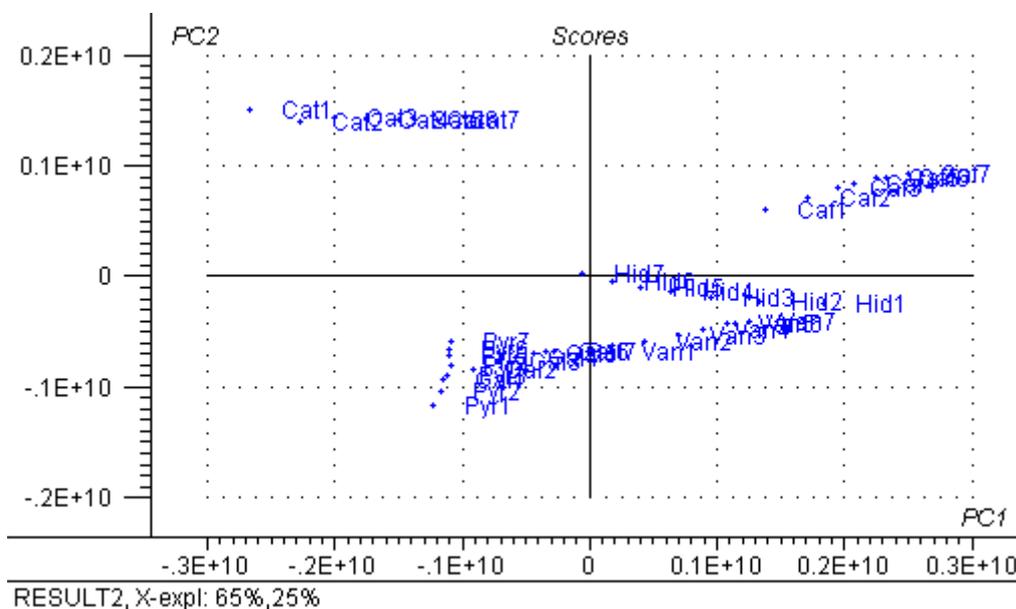
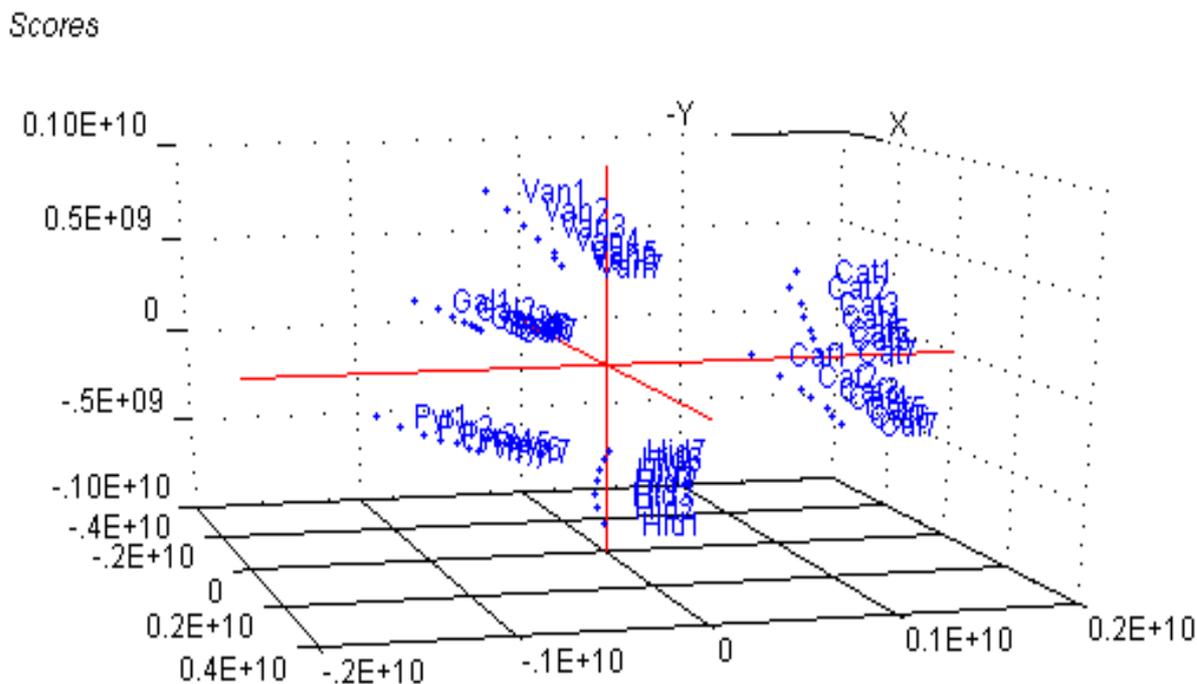


Fig. 4.129. Resultado 2D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio y de tirosinasa.

En la figura 4.130. aparecen representados los resultados de las tres componentes principales más importantes que en este caso responden al 97% de la varianza.



RESULT2, X-expl: 65%,25%,7%

Fig. 4.130. Resultado 3D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio y de tirosinasa.

En la figura 4.131. se representan las cargas de correlación obtenidas para la componente principal 1 (PC1) frente a la componente principal 2 (PC2). Las **cargas de correlación** son las correlaciones existentes entre las variables y las componentes principales.

Se puede ver como todos los resultados obtenidos para ambos electrodos están separados entre sí. Los resultados de los electrodos de tirosinasa ocupan la zona central de la mitad superior del rosco, mientras que los asociados al electrodo de lutecio están hacia la mitad en la parte derecha del mismo.

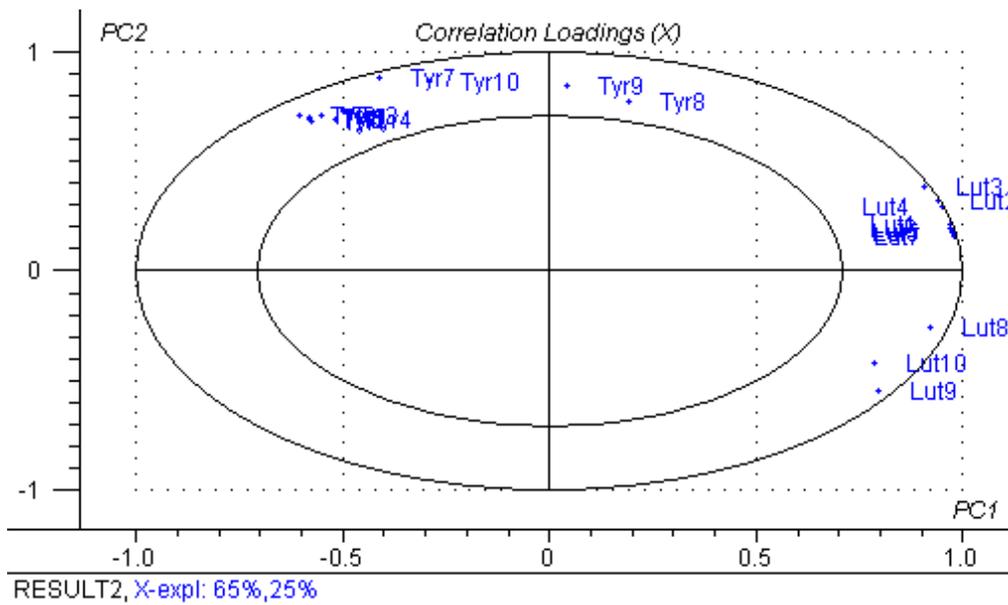


Fig. 4.131. Cargas de correlación obtenidas para los electrodos de lutecio y tirosinasa.

4.4.3. Lutecio y lacasa

En este caso se ha realizado una PCA que analiza los resultados obtenidos para 2 sensores; los electrodos de lutecio [LuPc2+AA(1:10)] y los electrodos de lacasa [LuPc2+AA(1:10)/Lac], respecto de los 6 antioxidantes de estudio y con 7 repeticiones.

En la gráfica de la figura 4.132. se puede ver como dos componentes principales explican el 88% de la varianza total.

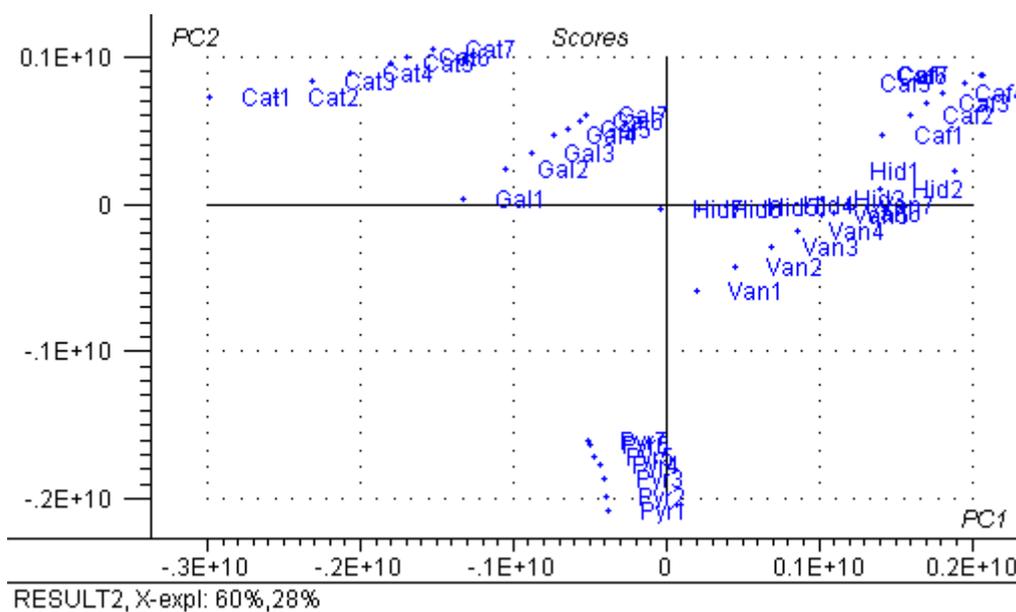
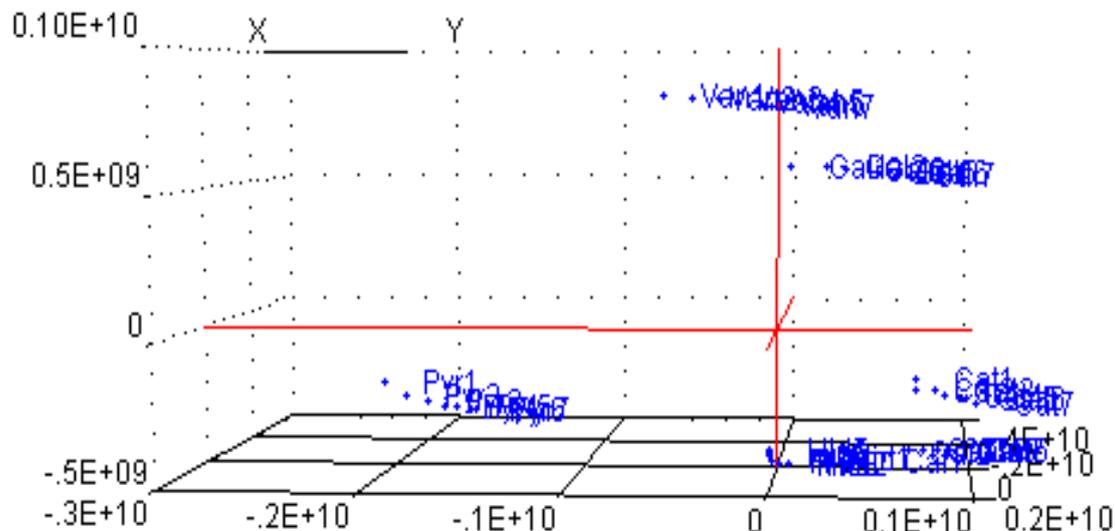


Fig. 4.132. Resultado 2D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio y de lacasa.

En la figura 4.133. aparecen representados los resultados de las tres componentes principales más importantes que en este caso responden al 96% de la varianza.

Scores



RESULT2, X-expl: 60%,28%,8%

Fig. 4.133. Resultado 3D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio y de lacasa.

En la figura 4.134. se representan las cargas de correlación obtenidas para la componente principal 1 (PC1) frente a la componente principal 2 (PC2).

Se puede ver como todos los resultados obtenidos para ambos electrodos están perfectamente separados entre sí. Los resultados de los electrodos de lacasa ocupan el cuarto cuadrante del rosco, mientras que los asociados al electrodo de lutecio están hacia la mitad en la parte derecha del mismo, ocupando las mismas posiciones que ocupaban en la PCA realizada para los datos del lutecio y de la tirosinasa.

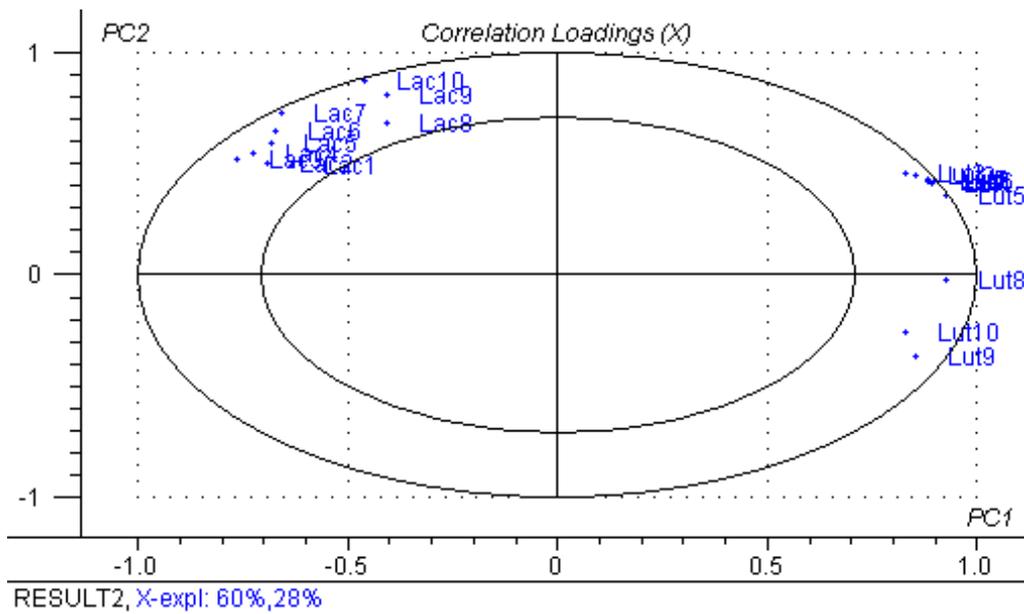


Fig. 4.134. Cargas de correlación obtenidas para los electrodos de lutecio y lacasa.

4.4.4. Tirosinasa y lacasa

En este caso se ha realizado una PCA que analiza el conjunto de los resultados obtenidos para 2 electrodos; los electrodos de lacasa [LuPc₂+AA(1:10)/Tyr] y los electrodos de lacasa [LuPc₂+AA(1:10)/Lac], respecto de 6 antioxidantes y con 7 repeticiones.

El 97% de la varianza está explicado por las dos componentes principales más relevantes.

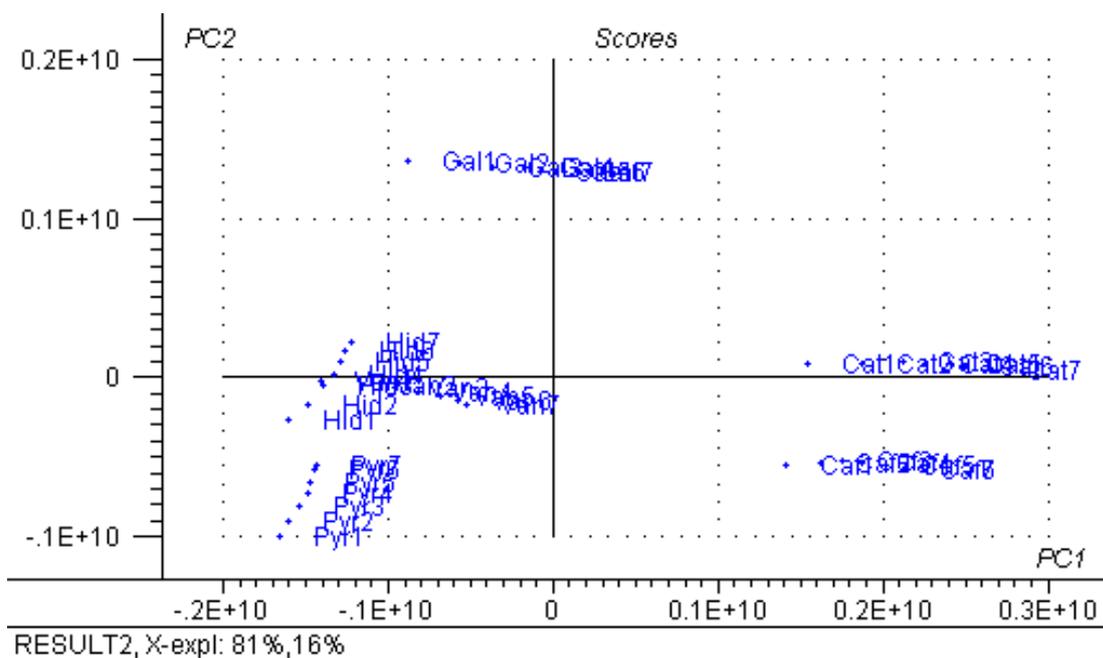
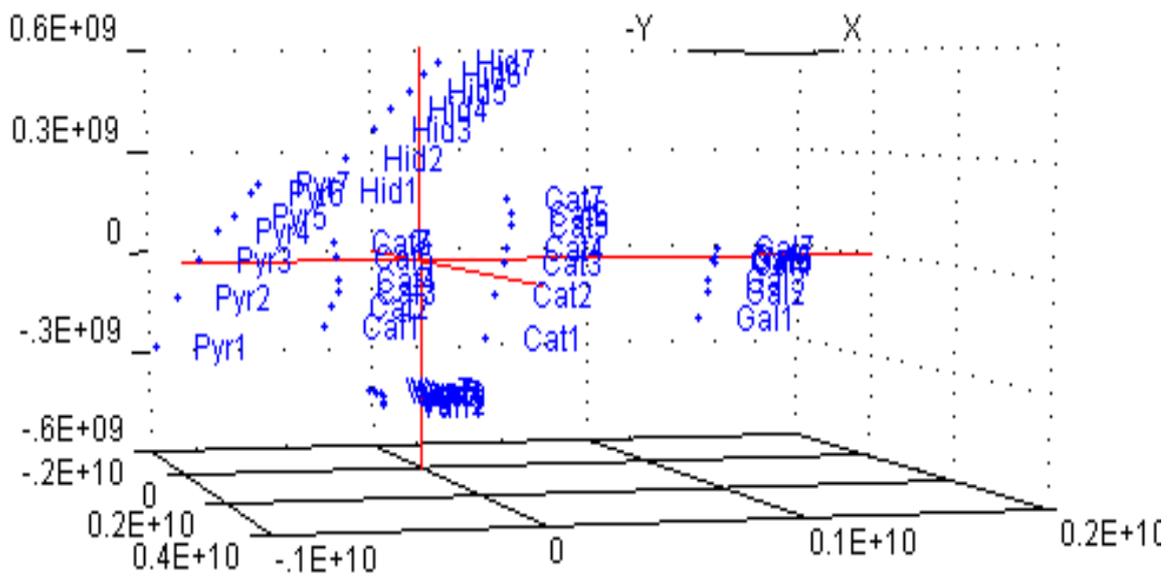


Fig. 4.135. Resultado 2D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio y de lacasa.

Las tres primeras componentes principales explican el 99% de la varianza.

Scores



RESULT2, X-expl: 81%,16%,2%

Fig. 4.136. Resultado 3D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio y de lacasa.

Los datos asociados a la lacasa y a la tirosinasa están separados entre sí, sin embargo, mientras que los datos de la tirosinasa están concentrados en la parte derecha del rosco, los de la lacasa están dispersos por la parte superior del mismo.

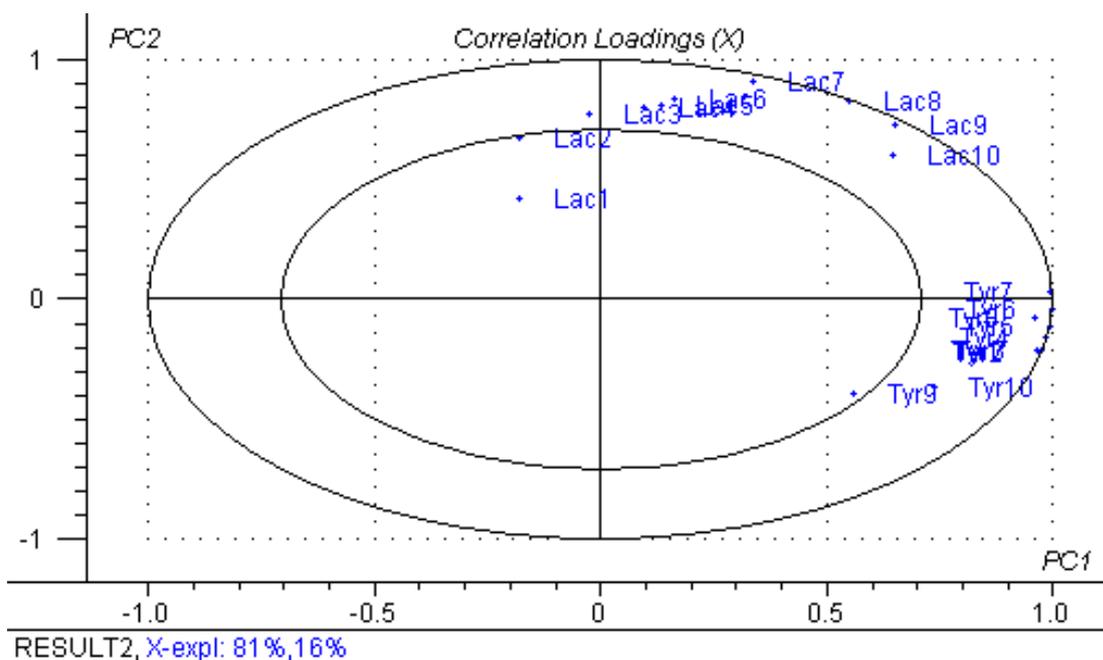


Fig. 4.137. Cargas de correlación obtenidas para los electrodos de lutecio y lacasa.

4.4.5. Lutecio, tirosinasa y lacasa

Finalmente, se ha realizado una PCA tomando datos de 3 sensores (LuPc₂+AA(1:10), LuPc₂+AA(1:10)/Tyr y LuPc₂+AA(1:10)/Lac), para 6 antioxidantes y 7 repeticiones para cada uno.

En el gráfico que se presenta a continuación se puede observar como las dos componentes principales más representativas explican un total del 88% de la variabilidad.

Sin embargo, a simple vista resulta complicado lograr establecer que criterios globales rigen ambas componentes principales.

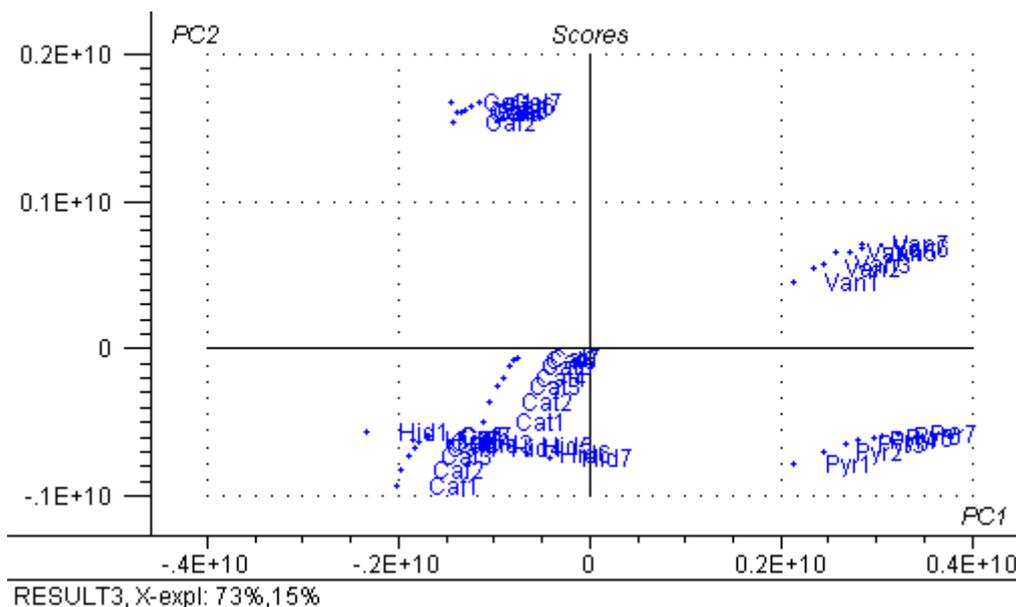


Fig. 4.138. Resultado 2D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio, tirosinasa y lacasa.

En la vista 3D se observa como las 3 componentes principales más representativas proporcionan información relativa al 98% de la varianza total. En este caso si que se puede observar como se separan los antioxidantes agrupados según su número de grupos hidroxilo. A la izquierda del gráfico se encuentran los bifenoles (hidroquinona, ácido cafeico y catecol), en el centro-derecha se encuentran los trifenoles (pirogalol y ácido gálico) y en la parte derecha se encuentra el monofenol (ácido vanílico).

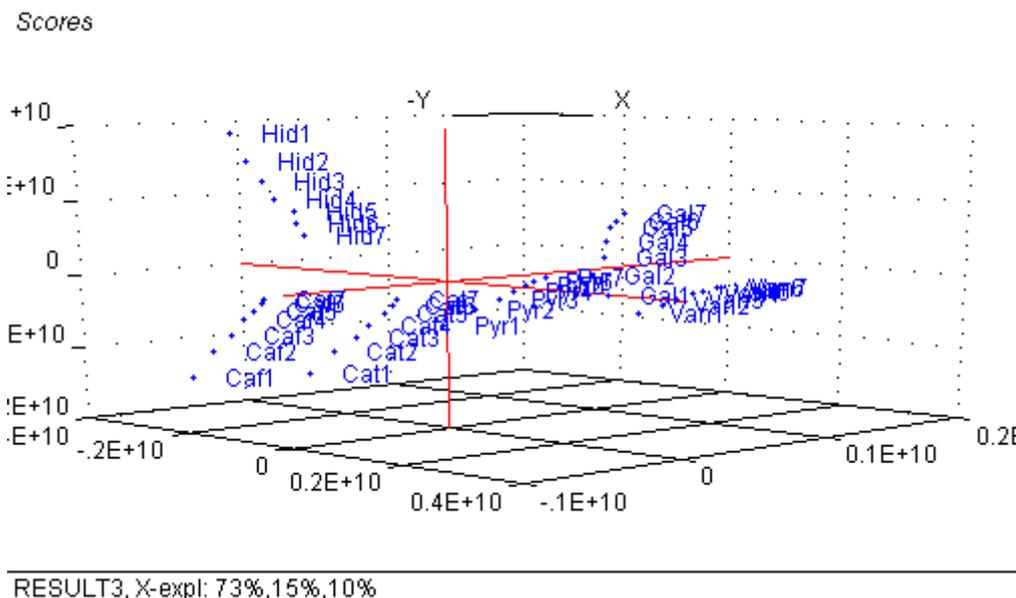


Fig. 4.139. Resultado 3D de la PCA realizada sobre los resultados de las medidas de antioxidantes de los electrodos de lutecio, tirosinasa y lacasa.

En la vista detallada se puede apreciar con mayor claridad la separación existente entre los distintos antioxidantes y como se encuentran agrupados los resultados asociados a difenoles, trifenoles y monofenoles.

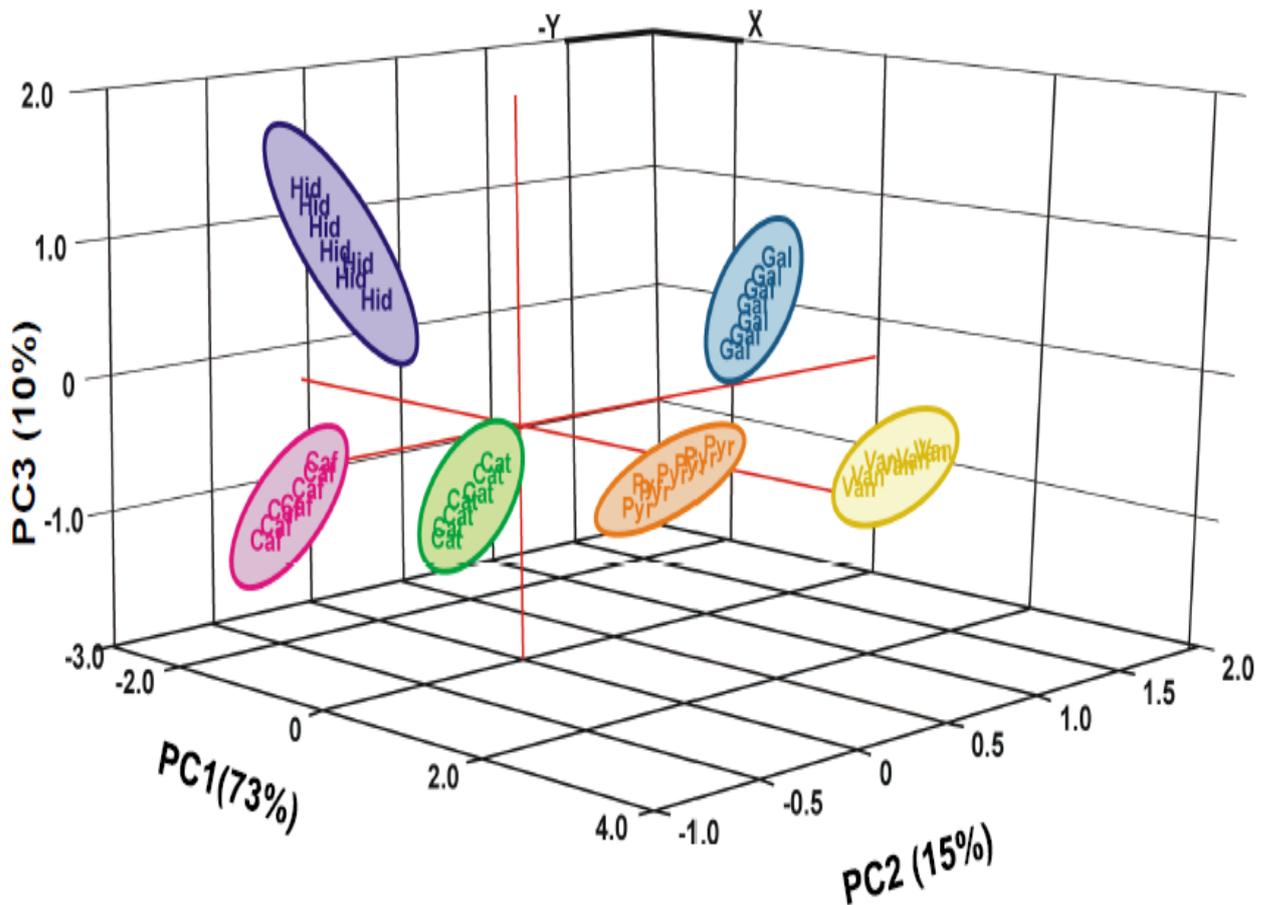


Fig. 4.140. Vista 3D detallada de la PCA.

Se puede concluir por lo tanto que la red de tres sensores: LuPc₂+AA(1:10), LuPc₂+AA(1:10)/Tyr y LuPc₂+AA(1:10)/Lac, es capaz de distinguir y discriminar los distintos antioxidantes y además de hacerlo en función del número de grupos hidroxilo que poseen.

CONCLUSIONES FINALES

5

Capítulo

El objetivo del presente proyecto ha consistido en primer lugar en el diseño y obtención de biosensores enzimáticos nanoestructurados mediante la técnica de deposición de capas de moléculas ordenadas de Langmuir-Blodgett, empleando como sustrato cristal de ITO.

El segundo gran objetivo del proyecto ha consistido en la detección y discriminación de antioxidantes de interés a nivel industrial, comparando el comportamiento de dichos biosensores frente a dichos antioxidantes respecto al de sensores de bisftalocianina de lutecio que ya han sido empleados para la realización de análisis de antioxidantes por parte de otros investigadores.

Siendo el objetivo global del proyecto el de lograr obtener una red de sensores que actúen a modo de lengua electrónica pudiendo analizar muestras en disolución. Los sensores constituyentes de esta lengua electrónica han de ser capaces de proporcionar respuestas diferentes al analizar distintos antioxidantes siendo capaces de discriminar los resultados en función a la concentración en la que se encuentran presentes los mismos.

A lo largo del proyecto se han logrado obtener las condiciones óptimas para la deposición sobre cristal de ITO de las dos enzimas; la tirosinasa y la lacasa, empleando la técnica de Langmuir-Blodgett, que permiten obtener sensores capaces de ser empleados para realizar medidas experimentales. Se ha logrado mimetizar, mediante las bicapas lipídicas, las membranas celulares en las cuales se introducen los enzimas, permitiendo que dichos enzimas se conserven en un estado ideal para poder realizar las mediciones voltamperométricas. En definitiva se puede afirmar que se ha logrado obtener los biosensores nanoestructurados basados en enzimas.

Para determinar la funcionalidad de los sensores y su capacidad para discriminar entre los distintos antioxidantes se han realizado ensayos de voltamperometrías cíclicas que a través de la magnitud de los picos de intensidad nos permiten observar los distintos procesos redox que tienen lugar.

Los ensayos se han realizado sobre seis antioxidantes: ácido vanílico (monofenol); ácido cafeico, catecol, hidroquinona (difenoles); pirogalol y ácido gálico (trifenoles).

Se ha observado como cada sensor es capaz de proporcionar una señal diferente para cada antioxidante, presentando cada uno de los voltamogramas asociados a cada antioxidante sus particularidades, pero también pudiendo observarse puntos en común en el caso de los difenoles y también para los trifenoles. Es decir, los sensores nos permiten discernir si nos encontramos frente a un grupo que presenta uno, dos o más grupos hidroxilo, algo que ha quedado demostrado en la realización del análisis de componentes principales (PCA).

Además, los sensores son capaces de proporcionar señales de distinta intensidad en función de la concentración de antioxidante presente en la disolución electrolito. De tal forma, que a una mayor concentración de antioxidante se obtiene una mayor intensidad de corriente en la respuesta voltamétrica.

Finalmente, se ha demostrado como cada tipo de sensor obtenido y analizado es capaz de proporcionar una señal diferente frente a un mismo antioxidante. Existe por lo tanto un cierto grado de selectividad en las respuestas obtenidas. Siendo los sensores enzimáticos capaces de proporcionar información adicional en muchos casos, relativa a picos de intensidad asociados a procesos enzimáticos no observables para los sensores de bisftalocianina de lutecio.

También se ha podido observar que los sensores enzimáticos proporcionan en general respuestas de mayor intensidad que las obtenidas para los sensores de bisftalocianina de lutecio y en algunos casos incluso actúan como electrocatalizadores desplazando hacia potenciales menores, los potenciales a los cuales tienen lugar los picos . Con lo cual, se puede concluir que la bisftalocianina de lutecio es un mediador electrónico eficaz cuando se combina con enzimas.

Todas estas observaciones realizadas a raíz de los resultados experimentales junto con los resultados obtenidos a través del análisis de componentes principales, nos indican que efectivamente se ha tenido éxito a la hora de obtener una red de tres sensores constituida por dos biosensores de tirosinasa y de lacasa, y un sensor electroquímico de bisftalocianina de lutecio, que sea capaz de detectar y discriminar distintos tipos de antioxidantes.

La estabilidad a largo plazo de los electrodos es uno de los dos objetivos principales que debe de cumplir un sensor. Cabe reseñarse sin embargo, que la vida útil de los biosensores enzimáticos es mucho menor que la de los sensores electroquímicos de bisftalocianina de lutecio y que para trabajar con enzimas debe de hacerse a un pH=7. Esto se debe a que las enzimas se mueren y agotan si se trabaja en otras condiciones y si transcurre demasiado tiempo. Sin embargo, los electrodos de bisftalocianina de lutecio tienen una vida útil mucho mayor y a pesar de que las intensidades registradas en los voltamogramas son menores conforme transcurre el tiempo, esta circunstancia no es ni de lejos tan notable como en el caso de los biosensores enzimáticos.

La reproductibilidad de las medidas obtenidas es el otro objetivo principal que debe de cumplir un sensor. En este sentido, las sucesivas medidas obtenidas por un sensor son muy similares. Exceptuando el primer ciclo, los ciclos subsiguientes guardan una gran similitud, si bien, a medida que se incrementa el número de ciclos aumenta la intensidad registrada. A partir del quinto ciclo, este incremento es cada vez menos notable. Con lo cual, una solución consiste en realizar 5 ciclos para cualquier medida que se desee tomar.

La reproductibilidad de las medidas obtenidas para distintos sensores construidos de la misma forma es buena. Las señales obtenidas para dos electrodos constituidos de la misma forma no son exactamente iguales y es probable que existan pequeñas diferencias entre las intensidades obtenidas, sin embargo, no son en absoluto lo suficientemente grandes como para considerar las medidas irreproducibles. De hecho, las diferencias son extremadamente ínfimas, pero dado que se trabaja a una escala tan pequeña de intensidades, detectando concentraciones muy bajas, cualquier modificación en las condiciones de la celda, el electrodo, etc, pueden dar lugar a alteraciones en los resultados. De cualquier forma, se han realizado varias experiencias repetidas y los resultados, a pesar de estas pequeñas diferencias, son prácticamente coincidentes.

ESTUDIO ECONÓMICO



6

Capítulo

ÍNDICE

6.1. INTRODUCCIÓN.....	237
6.2. COSTES DIRECTOS.....	238
6.2.1. Costes de material.....	238
6.2.2. Costes de amortización.....	239
6.2.3. Costes de personal.....	241
6.3. COSTES INDIRECTOS.....	242
6.4. RESUMEN DE COSTES.....	242

6.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este capítulo consiste en realizar una aproximación de los costes en los que se ha incurrido durante la realización del presente proyecto. Se realizará un estudio general en el cual se tendrán en cuenta los costes asociados a los materiales empleados, a la instrumentación, a los costes de personal y a otros costes derivados como el consumo de luz, agua, etc.

Estos costes se pueden dividir en dos grandes grupos de costes; **costes directos** y **costes indirectos**.

Los **costes directos** son los costes necesarios para la obtención de un producto (materias primas, partes o componentes complementarios tales como equipos instrumentales y mano de obra). En este caso, el producto lo constituyen los biosensores y para su diseño, construcción y prueba se necesita emplear una serie de aparatos e instrumental con su respectivo software de control, consumir reactivos y tener en cuenta las horas de trabajo empleadas en el proceso. Los costes directos son costes identificables e imputables directamente al proyecto.

De lo anterior se puede deducir que los costes directos pueden dividirse a su vez en tres subgrupos; **costes materiales** (reactivos), **costes de amortización** (equipos y software) y **costes de personal** (horas de trabajo).

Los **costes materiales** hacen referencia a los costes de material fungible, de reactivos, de otros materiales que han sido adquiridos a propósito de la actividad realizable y de documentación.

Los **costes de amortización** hacen referencia al equipo instrumental empleado a lo largo del proyecto. Los equipos utilizados no se han adquirido exclusivamente para el desarrollo de este proyecto y su vida útil se prolonga mucho más allá del tiempo transcurrido para la realización del mismo. Por lo tanto, lo que se hace es realizar una estimación de la vida útil del equipo en cuestión, en función de la vida útil y del coste total se estima el coste por día y se multiplica por el número de días de uso. Estos costes también son aplicables al software de control del equipo instrumental y a otro software necesario para la realización del proyecto, como por ejemplo editores de texto, programas de procesamiento de datos, etc.

Los **costes de personal** son los asociados a la mano de obra necesaria para la realización del proyecto. Dichos costes dependen del número de operarios que intervienen, lógicamente de las horas de trabajo invertidas y de la cualificación.

Por otra parte nos encontramos con el segundo gran grupo en el cual hemos dividido el conjunto de los costes, dicho grupo lo constituyen los costes indirectos. Los **costes indirectos** están constituidos por aquellos costes que son necesarios para la ejecución

del proyecto pero que no pueden imputarse directamente al mismo o no pueden identificarse como generados directamente por el proyecto, pero que de no realizarse o existir impedirían la realización del mismo. Es decir, gastos de material de oficina, teléfono, suministro de agua, suministro de energía eléctrica, limpieza, mantenimiento, etc.

6.2. COSTES DIRECTOS

Como ya se ha comentado, los costes indirectos se van a desglosar en tres apartados: costes de material, costes de amortización de equipos y costes de personal.

6.2.1. Costes de material

Unidades	Descripción	Medición	Precio Unitario (€)	Importe (€)
Ud.	Electrodo de referencia Ag/AgCl (3M)	1	120	120
Ud.	Contraelectrodo de hilo de platino	1	35	35
Ud.	Cristal de ITO	60	70	4200
g	Fosfato de sodio monobásico	45	0,24	10,8
g	Fosfato de sodio dibásico	35	0,26	9,1
g	Cloruro potásico	12	0,066	0,792
g	Cloruro de sodio	180	0,64	0
g	Ácido vanílico	0,5	0,89	0,445
g	Ácido cafeíco	0,5	6,2	3,1
g	Catecol	0,5	0,29	0,145
g	Hidroquinona	0,5	0,28	0,14
g	Pirogalol	0,5	0,75	0,375
g	Ácido gálico	0,5	0,37	0,185
mL	Glutaraldehído	10	0,9	9
mL	Acetona	400	0,028	11,2
mL	Cloroformo	200	0,06	12
g	Bisftalocianina de lutecio	0,01	10	0,1
g	Ácido araquídico	0,03	30,4	0,912
bote	Laca de plata	1	15	15
X	Material de vidrio	1	500	500
Coste material total				4.928,29 €

Tabla 6.1. Cuadro de costes de los costes directos de material.

6.2.2. Costes de amortización

Para poder calcular los costes de amortización se hace imprescindible estimar la vida útil del equipo y del software empleado.

El equipo informático empleado para la realización del proyecto está constituido por tres ordenadores:

Un ordenador portátil destinado al tratamiento de datos, búsqueda de información y a la realización del presente documento. Como software asociado se han empleado procesadores de datos y de texto. Los procesadores de datos utilizados son: el Origin 8 y el Microsoft Excel 2010. El procesador de texto empleado es el Microsoft Word 2010. Estos programas de Microsoft entran dentro del paquete completo de Microsoft Office 2010.

Un ordenador de sobremesa destinado al control y manejo de la balanza de Langmuir-Blodgett KSV NIMA. El software de control es el KSV LayerBuilder y viene incluido con el equipo instrumental.

Finalmente un tercer ordenador de sobremesa cuya función reside en el control y manejo del potencióstato PARSTAT 2273. El software de control del potencióstato es el PowerSUITE.

Se estima que la vida útil de un equipo informático ronda los **3 años**, a partir de los cuales se considera que es obsoleto. Se puede asumir que el software tiene una vida útil igual a la del equipo informático, ya que a pesar de que especialmente en el caso del Office salen versiones nuevas prácticamente cada año, pueden seguir utilizándose sin que haya una gran diferencia entre la funcionalidad de las distintas versiones.

El instrumental amortizable empleado está constituido por la balanza de Langmuir-Blodgett KSV NIMA y el potencióstato PARSTAT 2273 que es amortizable en **5 años**.

Una vez se ha tenido en cuenta el material amortizable y su vida útil con el que se ha trabajado hay que estimar el número de días que puede trabajar cada año dicho material y las horas de trabajo que se obtienen cada día.

Para obtener los días efectivos anuales, a los días de cada año hay que restarle los días correspondientes a los fines de semana, a vacaciones y a festivos

Días efectivos por año	
Año	365
Fines de semana	96
Vacaciones	30
Festivos	14
Días efectivos	225

Tabla 6.2. Días efectivos por año

Cada jornada de trabajo está constituida por 8 horas. Con lo cual se obtiene un tiempo de trabajo anual total de:

$$\text{Tiempo trabajo anual} = 8 \frac{h}{\text{día}} \cdot 225 \text{ días} = 1800 h$$

Primero se calcula la amortización anual dividiendo el coste entre el número de años de vida útil. Después se calcula el coste horario dividiendo este coste anual entre el número de horas de trabajo anuales.

Finalmente para calcular el coste total se multiplica el coste horario por las horas de uso.

En la tabla 6.3. se hace un compendio de todos los costes amortizables.

Equipo	Coste	Amortización anual	Horas de trabajo anuales	Coste horario (€/h)	Horas de uso del equipo	Coste total (€)
Portátil	1100	366,663	1800	0,204	248	50,4
PC potencióstato	1300	432,9	1800	0,241	200	48,1
PC balanza de Langmuir-Blodgett	1300	432,9	1800	0,241	370	89,0
Origin 8	1000	333	1800	0,185	60	11,1
Microsoft Office 2010	150	49,95	1800	0,028	188	5,2
PowerSUITE	2000	666	1800	0,370	240	88,8
Potencióstato PARSTAT 2273	15000	3000	1800	1,667	240	400,0
Balanza de LB KSV NIMA	60000	12000	1800	6,667	370	2466,7
Coste total de amortización						3.159,27 €

Tabla 6.3. Cuadro de costes del material amortizable.

6.2.3. Costes de personal

En primer lugar hay que analizar el tiempo total que ha sido empleado para realizar el proyecto. Para ello se realiza un desglose de las distintas actividades globales en las que se divide el conjunto del proyecto y se realiza una estimación de los tiempos invertidos en cada una de ellas:

Etapa	Horas dedicadas
Definición de objetivos	15
Documentación	115
Obtención de electrodos	370
Realización experiencias	240
Redacción del proyecto	130
Duración Total	870

Tabla 6.4. Desglose de tiempos del proyecto.

A partir de este desglose de tiempos y estimando que el coste por hora de trabajo de un ingeniero está en torno a los 20 €/h, se realiza la estimación de costes de personal:

Unidades	Descripción	Medición	Precio Unitario (€)	Importe (€)
h.	Honorarios de ingeniero	870	20	17400
Coste de personal total				17.400,00 €

Tabla 6.5. Cuadro de costes de personal.

6.3. COSTES INDIRECTOS

Como ya se ha comentado con anterioridad los costes indirectos son aquellos que no se pueden imputar directamente a la realización del proyecto. Entre ellos nos encontramos con costes asociados al consumo de electricidad, agua, papel, etc.

Unidades	Descripción	Medición	Precio Unitario (€)	Importe (€)
KWh.	Consumo eléctrico	450	0,082	36,9
L	Consumo de agua corriente	4000	0,0016	6,4
Ud.	Papel	700	0,02	14
Ud.	Encuadernación	2	40	80
X	Otro material de oficina	x	10	10
X	Otro material de laboratorio	x	12	12
mes	Suministro de internet y teléfono	4	30	120
Total costes indirectos				279,30 €

Tabla 6.6. Cuadro de costes indirectos.

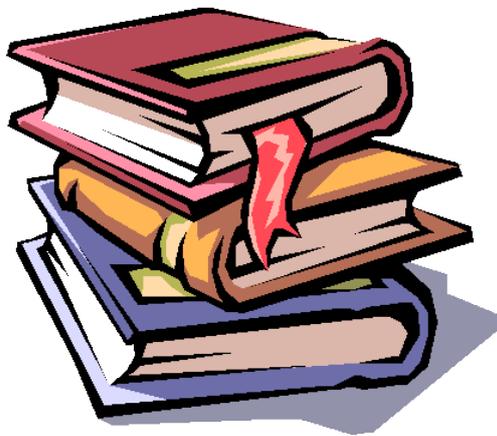
6.4. RESUMEN DE COSTES

Para obtener los costes totales se suman los costes directos y los indirectos y de ahí se obtiene el coste total estimado del proyecto.

Capítulo	Importe
Costes de material	4.928,29 €
Costes de amortización	3.159,27 €
Costes de personal	17.400,00 €
Costes indirectos	279,30 €
Coste total	25.766,86 €

Tabla 6.7. Resumen del presupuesto del proyecto

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA



Anexos

- [1] Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., Di Natale, C. and D'Amico, A. "Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids." (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 77, (2005) p. 1965-1983.
- [2] Riul, A. Jr., Dantas, C.A.R., Miyazaki, C.M. and Oliveira, O.N. Jr. "Recent advances in electronic tongues". *Analyst*, 135 (2010) p. 2481-2495.
- [3] D. Patranabis. "Sensors and transducers" PHI Learning 2 (2001), p. 1-3.
- [4] C.S. Rangan, G.R. Sarma, V.S.V. Mani. "Instrumentation: devices & systems." 2nd Ed. McGraw-Hill, (2006), p. 15-20.
- [5] Jacob Fraden. "Handbook of modern sensors. Physics, designs and applications." 4th Ed. Springer, (2010), p. 1-11.
- [6] Jon S. Wilson. "Sensor technology handbook." Elsevier, (2005), p. 1-29.
- [7] CSIC-Dpto. de Publicaciones. "Introducción a los sensores". Ed. El Museo Universal. (1987) p. 91.
- [8] S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoçi. *Sensores electroquímicos*. Universitat Autònoma de Barcelona. (2004) p. 13-15.
- [9] R.P. Areny. *Sensores y acondicionadores de señal*. Ed. Marcombo S.A. 4 (2003) pág. 307-308.
- [10] D.A. Skoog, D.M. West. *Fundamentos de química analítica*. Ed. Reverté (1997) vol. 2, p. 258.
- [11] Daniel C. Harris. "Análisis Químico Cuantitativo" Ed. Reverté S.A. 3 (2007), cap. 17: p.394.
- [12] Nicholson, R. S., Irving. Shain. "Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems." *Analytical Chemistry* 36, (1964) 4: p. 706-723.
- [13] F.G. Thomas, G. Henze. "Introduction to voltammetric analysis: theory and practice." CSIRO Publishing, (2001), p. 18-58.
- [14] M.L. Rodríguez Méndez. "Los materiales moleculares en España en el umbral del siglo XXI: Caracterización de las películas de Langmuir-Blodgett." p. 77-81.
- [15] Cristina Medina Plaza. "Langmuir-Blodgett y su potencial de aplicación en electrodos modificados, sensores." SensorGroup UVA.
- [16] Gareth Gwyn Roberts. "Langmuir-Blodgett films". Plenum Press, (1990).
- [17] "Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications." p. 213-218.
- [18] Gema de la Torre, Mónica Nicolau, Tomás Torres. "Chapter 1-Phthalocyanines: Synthesis, Supramolecular Organization, and Physical Properties" *Supramolecular Photosensitive and Electroactive Materials* (2001), p. 1-111.
- [19] Rodríguez-Méndez, M.L., Gay, M. and de Saja, J.A. "New insights into sensors based on radical bisphthalocyanines." *J. Porph. Phthaloc.*, 13 (2009). p. 1159-1167.

- [20] Zagal, J.H., Griveau, S., Silva, J.F., Nyokong, T. and Bedioui, F. "Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions." *Coord. Chem. Rev.*, 254, (2010), p. 2755–2791.
- [21] Vlasov, Y.G., Ermolenko, Y.E., Legin, A.V., Rudnitskaya, A.M. and Kolodnikov, V. "Chemical sensors and their systems", *J. Anal. Chem.*, 65, (2010), p. 880-890.
- [22] Jiang, J. "Functional Phthalocyanine Molecular Materials. Series: Structure and Bonding." Springer, Ed. 1, vol. 135 (2010).
- [23] M. Bouvet, K.M. Kadish, K.M., Smith, R. Guillard. "Radical Phthalocyanines and Intrinsic semiconduction." Academic Press (2003) p. 37-104.
- [24] Muzicante, I., Fovans, E., Silinsh, E., Fretigny, C., Bouvet, M., Simon J., Spirkovitch, S. "Charge carrier transport properties of thin films of an intrinsic molecular semiconductor: Lutetium bisphthalocyanine." *Mol. Materials*. 9, (1998) p. 301-331.
- [25] M. L'her, A. Pondaven, Y. Cozien, F. Guyon. "Redox Properties of Symmetrical and Unsymmetrical Sandwich Complexes of Lutetium(III) with Phthalocyaninato and Naphthalocyaninato Ligands." *Molecular Electrochemistry Inorganic, Bioinorganic and Organometallic Compounds*, Kluwer Academic Publishers (1993), p. 101.
- [26] K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guillard, "The Porphyrin Handbook: Spectroscopic and Electrochemical Characterisation." Academic press (2003), p. 117.
- [27] J. Souto, M. L. Rodríguez Méndez, R. de Saja, J. Martínez & A. Guadarrama "Sistema de sensores orgánicos resistivos para la detección de componentes orgánicos en vinos". (1998) IV Congreso Nacional de Enólogos.
- [28] A. Arrieta, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. de Saja. "Langmuir–Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste." *Sensors and Actuators B*, 95, (2003), p. 357–365.
- [29] Smith A.L. "Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology." Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. (1997).
- [30] Grisham, Charles M.; Reginald H. Garrett." *Biochemistry*." Philadelphia: Saunders College Pub. (1999) p. 426–7.
- [31] Thurston CF. "The structure and function of fungal laccase." *Microbiol*, (1994), 140: p.19-26.
- [32] Fischer E. "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme". *Ber. Dt. Chem. Ges.* 27, (1894), p. 2985–93.
- [33] Koshland D. E. "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, (1958), p. 98-104.
- [34] Vasella A, Davies GJ, Bohm M. "Glycosidase mechanisms". *Curr Opin Chem Biol.* 6, (2002), p. 619–29.
- [35] Boyer, Rodney. "Concepts in Biochemistry." (2nd ed.). New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.: John Wiley & Sons, Inc. 6 (2002) p. 137–8.

- [36] Kumar CM, Sathisha UV, Dharmesh S, Rao AG, Singh SA. "Interaction of sesamol (3,4-methylenedioxyphenol) with tyrosinase and its effect on melanin synthesis." *Biochimie* 93 (3), (2011), p. 562-9.
- [37] A.M. Mayer. "Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review". *Phytochemistry* 67, (2006), 21, p. 2318–2331.
- [38] Messerschmidt A, Huber R. "The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin, modeling and structural relationships." *Eur J Biochem*, 187, (1990), p. 341-352.
- [39] Gellerstedt G, Northy RA. "Analysis of birch wood lignin by oxidative degradation". *Wood Sci Technol* (1989); 23: p. 75-83.
- [40] Yoshida H. "Chemistry of lacquer (Urushi), part I." *J Chem Soc*, 43, (1883) p. 472-486.
- [41] Hakulinen N, Kiiskinen L-L, Kruus K, Saloheimo M, Koivula A & Rouvinen J. "Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site." *Nature Struct. Biol.* 9, (2002), p.601-605.
- [42] Piontek K, Antorini M, Choinowski T. "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers." *J Biol Chem*, 277, (2002), p. 37663-37669.
- [43] Xu F. "Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition." *Biochem*, 35, (1996), p. 7608-7614.
- [44] Xu F, Shin W, Brown S, Wahleithner JA, Sundaram UM, Solomon EI. "A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability." *Biochim Biophys Acta* 1292, (1996), p. 303-311.
- [45] Sakurai T. "Anaerobic reactions of *Rhus vernicifera* laccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate(II)." *Biochem J.* 284, (1992), p. 681-685.
- [46] Thurston CF. "The structure and function of fungal laccase." *Microbiol.* 140, (1994), p. 19-26.
- [47] Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA. "Crystal structure of a bacterial endospore coat component – a laccase with enhanced thermostability properties." *J Biol Chem.* 278, (2003), p. 19416–19425.
- [48] Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. "Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes." *Bioremed J.* 3, (1999), p. 1-25.
- [49] J.A. Knight "Free radicals: Their history and current status in aging and disease". *Annals of clinical and laboratory science* 28 (6), (1998), p. 331–46.
- [50] Helmut Sies. "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants". *Experimental physiology* 82 (2) (1997), p. 291.

- [51] George Wolf. "The discovery of the antioxidant function of vitamin E: The contribution of Henry A. Mattill". *The Journal of nutrition* 135 (3), (2005), p. 363–6.
- [52] Alan Crozier, Indu B. Jaganath and Michael N. Clifford. "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." *Nat. Prod. Rep.* 26, (2009), p. 1001-1043.
- [53] M.L. Rodríguez Méndez, C. Apetrei, J.A. de Saja. "Evaluation of the polyphenolic content of extra virgin olive oils using an array of voltammetric sensors." *Electrochimica Acta*, 53, (2008), p. 5867–5872.
- [54] Xican Li, Xiaoting Wu, Ling Huang. "Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui)." *Molecules*, 14, (2009), p. 5349-5361.
- [55] M. Victoria Moreno Arribas, M. Carmen Polo. "Wine chemistry and biochemistry". Springer, (2009), p. 510.
- [56] Miguel Carrero Gálvez, Carmelo García Barroso and Juan Antonio Pérez Bustamante. "Analysis of polyphenolic compounds of different vinegar samples." *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuhung und Forschung A*, vol. 199, (1994) 1: p. 29–31.
- [57] Z. Charrouf and D. Guillaume. "Phenols and Polyphenols from *Argania spinosa*." *American Journal of Food Technology*, (2007), 2, p. 679–683.
- [58] Boerjan, Wout; Ralph, John; Baucher, Marie "Ligninbiosynthesis". *Annual Review of Plant Biology* 54, (2003), p. 519–46.
- [59] Lee YS, Kang YH, Jung JY et al. "Protein glycation inhibitors from the fruiting body of *Phellinus linteus*". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31 (10), (2008), p. 1968–72.
- [60] Z. Charrouf, D. Guillaume "Phenols and Polyphenols from *Argania spinosa*". *American Journal of Food Technology* 2 (7), (2007), p. 679.
- [61] Boerjan, Wout; Ralph, John; Baucher, Marie "Ligninbiosynthesis". *Annual Review of Plant Biology* 54, (2003) p. 519–46.
- [62] Fiege, H., Voges, H.-W., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y., Buysch, H.-J., Garbe, D. and Paulus, W. "Phenol Derivatives." *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2000).
- [63] Phillip M. Hudnall "Hydroquinone" *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Wiley-VCH, Weinheim, (2002).
- [64] Carl Wilhelm Scheele. "On the essential salt of galls or gall-salt". *Proceedings of the Royal Swedish Academy of Science*, vol. 7, (1786), p. 30-34.
- [65] LD Reynolds, NG Wilson, "Scribes and Scholars" 3rd Ed. Oxford, (1991). p. 193–4.
- [66] Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. "Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine." *J Agric Food Chem.* 51, (2003), 25 p. 7292-5.

- [67] Christian Kohlpaintner, Markus Schulte, Jürgen Falbe, Peter Lappe, Jürgen Weber. "Aldehydes, Aliphatic", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim: Wiley-VCH (2005).
- [68] F. J. Pavinatto, E. G. R. Fernandez, M. L. Rodríguez Méndez, J. A. de Saja, V. Zucolotto & O. N. Oliveira Jr "Immobilization of Tyrosinase in Langmuir-Blodgett (LB) films for biosensing" (2009), ICAM 2009.
- [69] PengWang, Min Liu, Jinqing Kan. "Amperometric phenol biosensor based on polyaniline". *Sensors and Actuators B*. 140, (2009), p. 577-584.
- [70] Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Michel J. Bertrand, Karen C. Waldron. "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking." *BioTechniques*. 37, (2004), p. 790-802.
- [71] C. Apetrei, P. Alessio, C.J.L. Constantino, J.A. de Saja, M.L. Rodriguez-Mendez, F.J. Pavinatto, E. Giuliani Ramos Fernandes, V. Zucolotto, O.N. Oliveira Jr. "Biomimetic biosensor based on lipidic layers containing tyrosinase and lutetium bisphthalocyanine for the detection of antioxidants." *Biosensors and Bioelectronics*. 26, (2011), p. 2513-2519.
- [72] Joanna Cabaj, Jadwiga Sołoducho, Antoni Chyla, Jolanta Bryjak, Karolina Zynek, "The characterization of ordered thin films built of immobilized phenoloxidases." *Sensors and Actuators B*. 136, (2009), p. 425-431.
- [73] G.C.S. Collins, D.J. Schiffrin. "The electrochromic properties of lutetium and other phthalocyanines," *J. Electroanal. Chem*. 139, (1982), p. 335-369.
- [74] M.L. Rodríguez Méndez, R. Aroca, J.A. de Saja. "Spectroscopic and electrochemical properties of thin solid films of yttrium bisphthalocyanine. *Spectrochimico Acta*. " 49A. No. 7, (1993), p. 965-973.
- [75] Vicente Parra, Teresa Hernando, María L. Rodríguez-Méndez, José A. de Saja "Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified carbon paste electrodes for discrimination of red wines" *Electrochimica Acta*, Volume 49, Issue 28, 1 (2004), p. 5177-5185.
- [76] J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez. "Sensors based on double-decker rare earth phthalocyanines." *Advances in Colloid and Interface Science*, 116, (2005), p. 1 - 11.
- [77] M.L. Rodríguez Méndez, J. Souto, J.A. de Saja, R. Aroca. "Electrochromic display based on LB films of praseodymium bisphthalocyanine." *J. Mater. Chem*. 5, (1995), p. 639-642.
- [78] A. Arrieta, M.L. Rodríguez Méndez, J.A. de Saja. "Langmuir-Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste." *Sensors and Actuators B* 95, (2003), p. 357-365.
- [79] Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL. "A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics." *J Agric Food Chem*. 49(4), (2001), p. 1957-65.

- [80] V. Carralero Sanz, Ma Luz Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón. "Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines." *Analytica Chimica Acta* 528 ,(2005), p. 1–8.
- [81] Maria Hedenmo, Arántzazu Narváez, Elena Domínguez, Ioanis Katakis. "Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 425, (1997), p. 1-11.
- [82] Catalin Nistor, Jenny Emnéus, Lo Gorton, Anton Ciucu. "Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds." *Analytica Chimica Acta*, 387, (1999), p. 309-326.