



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

GRADO EN INGENIERIA QUÍMICA

**DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA  
ALIMENTARIA**

Autor:  
Conde Delgado, David

Tutores:  
Rodríguez Méndez, María Luz  
Salvo Comino, Coral

Departamento de Química Física y Química inorgánica

Valladolid, abril de 2019.





## Agradecimientos.

En esta etapa final de mi formación quisiera dar mis más sinceros agradecimientos a todos los que han contribuido durante estos meses a que este trabajo fuese posible y edificante.

En primer lugar, a mi tutora María Luz Rodríguez Méndez, que me abrió las puertas de su grupo de investigación, en el que me he sentido integrado y acogido como uno más desde el primer al último día.

A mi cotutora, Coral Salvo Comino, Cori, por un trabajo tan ingrato y difícil como soportarme. Gracias por el tiempo que me has dedicado, por tu entrega y sobre todo por tu alegría. Te deseo lo mejor, te lo mereces.

A Celia, por tu ayuda en los callejones sin salida, por tu socarronería y por tu desparpajo, y por tantas cosas que, seguro que se me olvida alguna. Te irá bien, sigue así.

Al resto de la gente del laboratorio y del grupo de investigación, por su acogida, compañerismo, ayuda y buen rollo. A mis compañeros de carrera, Dani, Elena, María y Esther, con los que sufrí muchos años. A Juan, que parece que hace una eternidad que se fue. A Guilherme, que está hecho un picarón. A los Senior Fernando, Yolanda y Cristina, con los que un café era más que un café. A los nuevos fichajes Iría, Isabel y Marta, tranquilas que ya os falta poco.

Mis agradecimientos a MINECO-FEDER (AGL2015-67482-R) y la Junta de Castilla y León (VA275P18) por su colaboración.

A mi familia, por permitirme construirme como persona y como profesional. A mis hermanos Javier y José Luis que son mis cómplices. A mis padres José Luis y María que son lo que más quiero, y todo lo que querría ser.

A todos ellos, MUCHAS GRACIAS.



**Universidad de Valladolid**

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## Resumen.

En el trabajo presentado, se han desarrollado nuevos biosensores electroquímicos nanoestructurados para la detección de fenoles de interés en la industria alimentaria mediante la técnica Layer by Layer, utilizando materiales sensibles con cargas electrostáticas alternas e inmovilizando enzimas oxidorreductasas (tirosinasa y lacasa) para obtener biosensores enzimáticos.

Los sensores se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas. Los biosensores se evaluaron mediante técnicas electroquímicas frente a catecol e hidroquinona, lo que permitió analizar prestaciones de los biosensores como la actividad enzimática, la reproducibilidad, la repetitividad, así como, sus límites de detección (LODs).

Los biosensores exhibieron excelentes prestaciones, destacando los LODs que, para la lacasa fue de  $1.27 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$  en hidroquinona y para la tirosinasa fue de  $8.7 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$  en catecol.

Estos LODs suponen una mejora sobre los biosensores desarrollados hasta ahora. Por otra parte, la sencillez en su elaboración y su precio competitivo, permiten plantear el uso de estos biosensores en la industria alimentaria.

## Palabras clave.

Electroquímica, Biosensores enzimáticos, Layer by Layer (LBL), Tirosinasa (Tir), Lacasa (Lac).



**Universidad de Valladolid**

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## Abstract.

In the presented work, new nanostructured electrochemical biosensors have been developed for the detection of phenols of interest in the food industry by means of the Layer by Layer technique, using sensitive materials with alternating electrostatic charges and immobilizing oxidoreductases enzymes (tyrosinase and laccase) to obtain enzymatic biosensors.

The sensors were characterized by spectroscopic techniques. The biosensors were evaluated by means of electrochemical techniques in catechol and hydroquinone, which allowed to analyze the performance of biosensors such as enzymatic activity, reproducibility, repeatability, and their detection limits (LODs).

The biosensors exhibited excellent performance, highlighting the LODs which, for the laccase was  $1.27 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$  in hydroquinone and for the tyrosinase was  $8.7 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$  in catechol.

These LODs represent an improvement over the biosensors developed so far. On the other hand, the simplicity in its preparation and its competitive price, allow proposing the use of these biosensors in the food industry.

## Keywords.

Electrochemical, Enzymatic biosensor, Layer by Layer (LBL), Tyrosinase (Tyr), Laccase (Lac).



**Universidad de Valladolid**

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES





## Índice

Agradecimientos.....	0
Resumen.....	2
Palabras clave.....	2
Abstract.....	4
Keywords.....	4
Índice de ilustraciones.....	10
Índice de ecuaciones.....	14
1. Introducción y objetivos.....	2
1.1. Introducción.....	2
1.2. Objetivos.....	4
2. Fundamento teórico.....	10
2.1. Estado del arte y precedentes.....	10
2.1.1. Nanociencia y nanotecnología en la industria alimentaria.....	10
2.2. Sensores empleados.....	12
2.2.1. Sensores: Concepto y clasificación.....	12
2.2.2. Biosensores.....	13
2.2.2.1. Enzimas.....	13
2.2.3. Técnica Layer by Layer. Desarrollo del sensor.....	19
2.2.3.1. Materiales utilizados en LBL.....	20
2.2.3.2. Métodos de Inmovilización Enzimática.....	27
1.1.1. Técnicas espectroscópicas de caracterización.....	30
1.1.1.1. Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR).....	30
1.1.1.2. Espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	31
1.1.2. Técnicas electroquímicas de análisis.....	33
1.1.2.1. Técnicas Voltamperométricas.....	37
1.1.3. Especies electroactivas estudiadas: Difenoles.....	42
1.1.3.1. Catecol.....	44
1.1.3.2. Hidroquinona.....	45
3. Reactivos, materiales y equipos empleados.....	50
3.1. Reactivos.....	50
3.2. Materiales.....	50



3.3.	Equipos.....	51
4.	Metodología y desarrollo del experimental.....	54
4.1.	Sensores enzimáticos nanoestructurados: Desarrollo y caracterización.....	54
4.1.1.	Preparación de disoluciones. ....	54
4.1.2.	Desarrollo de los sensores. ....	57
4.1.2.1.	Nanoestructura del sensor: Técnica Layer by Layer.....	58
4.1.2.2.	Obtención del biosensor: Inmovilización enzimática.....	59
4.1.3.	Parámetros de caracterización: Crecimiento de las monocapas. ....	60
4.1.3.1.	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR). ....	60
4.1.3.2.	Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	60
4.2.	Determinación de especies electroactivas: Técnicas electroquímicas. ....	61
4.2.1.	Voltametría cíclica.....	61
4.2.2.	Cronoamperometría: Determinación del límite de detección (LOD).....	62
5.	Resultados experimentales y discusión. ....	66
5.1.	Preparación y caracterización de películas que actúan como mediadores electrónicos.....	66
5.1.1.	Desarrollo de las películas LbL. ....	67
5.1.2.	Estudio de la reproducibilidad del sensor. ....	71
5.1.3.	Estudio del crecimiento de las capas en el sensor. ....	74
5.1.3.1.	Espectroscopía UV-Visible.....	74
5.1.3.2.	Espectroscopía infrarroja FT-IR. ....	76
5.1.4.	Estudio de la repetitividad del sensor.....	78
5.1.5.	Estudio del efecto del espesor del sensor nanoestructurado.....	79
5.1.6.	Estudio de los límites de detección.....	81
5.2.	Desarrollo del biosensor. ....	85
5.2.1.	Estudio de la inmovilización enzimática.....	85
5.2.2.	Estudio de la actividad enzimática. ....	87
5.2.2.1.	Biosensor de lacasa. ....	87
5.2.2.2.	Biosensor de tirosinasa. ....	89
5.2.3.	Estudio de la reproducibilidad. ....	92
5.2.3.1.	Biosensor de lacasa. ....	92
5.2.3.2.	Biosensor de tirosinasa. ....	94
5.2.4.	Estudio de la repetitividad. ....	95



5.2.4.1.	Biosensor de lacasa.....	96
5.2.4.2.	Biosensor de tirosinasa.....	97
5.2.5.	Estudio de los límites de detección.....	100
5.2.5.1.	Biosensor de lacasa.....	100
5.2.5.2.	Biosensor de tirosinasa.....	103
5.2.6.	Tabla de resumen de las prestaciones de los biosensores.....	106
6.	Conclusiones.....	110
7.	Bibliografía.....	116



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## Índice de ilustraciones.

ILUSTRACIÓN 1. ESQUEMA DE REACCIÓN EN LA CONVERSIÓN DE SUSTRATOS A PRODUCTOS CON CATALIZADOR ENZIMÁTICO Y SIN ÉL. ....	14
ILUSTRACIÓN 2. CINÉTICA DE REACCIÓN DE MICHAELIS-MENTEN ENTRE UN SUSTRATO Y UNA ENZIMA. ....	14
ILUSTRACIÓN 3. ETAPAS DEL MODELO CINÉTICO MICHAELIANO CON DOS ETAPAS REACTIVAS EN SERIE. UNIÓN DE SUSTRATO Y ENZIMA Y SEPARACIÓN DE PRODUCTO Y ENZIMA. ....	15
ILUSTRACIÓN 4. ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA ENZIMA LACASA [21]. ....	17
ILUSTRACIÓN 5. MECANISMO DE REACCIÓN REDOX DE ORTO-, META- Y PARA-DIFENOLES. ....	17
ILUSTRACIÓN 6. ESTRUCTURA DE LA ENZIMA TIROSINASA [25]. ....	18
ILUSTRACIÓN 7. LAS ETAPAS DEL PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA LAYER BY LAYER DE INMERSIÓN. ....	19
ILUSTRACIÓN 8. EJEMPLOS DE SOPORTES NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN LA COMBINACIÓN DE NANOMATERIALES POR LA TÉCNICA LBL. ....	20
ILUSTRACIÓN 9. ESQUEMA DE LAS ETAPAS DE REDUCCIÓN, NUCLEACIÓN, CRECIMIENTO Y ESTABILIZACIÓN DE MÉTODO DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE TURKEVICH/FRENS. ....	22
ILUSTRACIÓN 10. ESQUEMA DE LAS ETAPAS EN LA FORMACIÓN DE LAS AUNPS EN LA SÍNTESIS DE TURKEVICH/FRENS ..... 23	23
ILUSTRACIÓN 11. ESTRUCTURA DEL MONÓMERO DE CHITOSÁN. ....	24
ILUSTRACIÓN 12. PROTONACIÓN DEL GRUPO AMINO DEL CHITOSÁN. ....	24
ILUSTRACIÓN 13. LA FTALOCIANINA TETRASULFÓNICA ÁCIDA DE COBRE. ....	25
ILUSTRACIÓN 14. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA Y CLASIFICACIÓN. ....	27
ILUSTRACIÓN 15. EFECTO DE LAS PROPIEDADES POLICATIÓNICAS DEL CHITOSÁN EN LA MODIFICACIÓN DEL PH LOCAL SOBRE LA SUPERFICIE DEL SOPORTE. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS CON SOPORTE DE CHITOSÁN (A). INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS CON SOPORTE DE CHITOSÁN RETICULADO CON GLUTARALDEHÍDO (B). ....	29
ILUSTRACIÓN 16. COMPOSICIÓN DE UNA BASE DE SCHIFF. ....	29
ILUSTRACIÓN 17. REACCIÓN SIMPLIFICADA DE OBTENCIÓN DE UNA BASE DE SCHIFF ENTRE DOS CADENAS DE CHITOSÁN MEDIANTE GLUTARALDEHÍDO. ....	30
ILUSTRACIÓN 18: NIVELES DE TRANSICIÓN ENERGÉTICA EN ESPECTROSCOPÍA Y BANDAS DE ABSORCIÓN EN UV-Vis. ....	32
ILUSTRACIÓN 19. ESQUEMA GENERAL DE UNA CELDA ELECTROLÍTICA DE DOS ELECTRODOS. ....	36
ILUSTRACIÓN 20. CELDA ELECTROLÍTICA DE TRES ELECTRODOS Y CONFIGURACIÓN ELÉCTRICA SIMPLIFICADA DE UN POTENCIÓSTATO. ....	37
ILUSTRACIÓN 21. PRINCIPALES MAGNITUDES DE UN VOLTAMOGRAMA EN VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA. ....	38
ILUSTRACIÓN 22. BARRIDO TRIANGULAR CON N CICLOS. ....	38
ILUSTRACIÓN 23. DIFERENTES CONFIGURACIONES DE LOS GRUPOS -OH DE LOS DIFENOLES. ORTOFENOL (A). METAFENOL (B). PARAFENOL (C). ....	43
ILUSTRACIÓN 24. ESTRUCTURA DEL CATECOL. ....	44
ILUSTRACIÓN 25. REACCIÓN DE OXIDACIÓN DEL CATECOL PARA OBTENER ORTO- BENZOQUINONA. ....	45
ILUSTRACIÓN 26. ESTRUCTURA DE LA HIDROQUINONA. ....	45
ILUSTRACIÓN 27. REACCIÓN DE OXIDACIÓN DE LA HIDROQUINONA PARA OBTENER PARA- BENZOQUINONA. ....	46
ILUSTRACIÓN 28. SÍNTESIS DE TURKEVICH/FRENS PARA OBTENER NANOPARTÍCULAS DE ORO. (A) ANTES DE LA ADICIÓN DEL CITRATO DE SODIO DIHIDRATADO. (B) PASADOS 10 MINUTOS TRAS LA ADICIÓN DEL CITRATO DE SODIO DIHIDRATADO. ....	57
ILUSTRACIÓN 29. PARÁMETROS DE CONFIGURACIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA EL EQUIPO DE RECUBRIMIENTO POR INMERSIÓN ROTATIVA ND-R 11/2 ROTARY DIP COATER. ....	58
ILUSTRACIÓN 30. MONTAJE CARACTERÍSTICO DEL EQUIPO ND-R 11/2 ROTARY DIP COATER PARA LA OBTENCIÓN DE SENSORES NANOESTRUCTURADOS. ....	59



ILUSTRACIÓN 31. MONTAJE DE LA CELDA ELECTROQUÍMICA DE TRABAJO. ....	62
ILUSTRACIÓN 32. ESQUEMA DE LAS CONFIGURACIONES ESTUDIADAS ELECTROQUÍMICAMENTE: 2X[(CHI)-(AuNPs)] (A), 2X[(CHI)-(CuPc)] (B), 2X[(CHI)-(AuNPs + CuPc)] (C), 2X (CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (D) Y 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] (E). ....	68
ILUSTRACIÓN 33. VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE ITO EN CATECOL $10^{-4}$ M (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I); E HIDROQUINONA $10^{-4}$ M (B), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (B.I) EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7. ....	68
ILUSTRACIÓN 34. RESPUESTA VOLTAMPEROMÉTRICA DE LAS CONFIGURACIONES 2X[(CHI)-(AuNPs)] (VERDE), 2X[(CHI)-(CuPc)] (AZUL CLARO), 2X[(CHI)-(AuNPs + CuPc)] (MORADO), 2X (CHI)-(AuNPs)-(CHI)- (CuPc)] (AZUL OSCURO) Y 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] (ROJO) EN MUESTRA PATRÓN DE CATECOL $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01M A PH 7 (A). DETALLE DEL PICO ANÓDICO (A.I). DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.II). ....	69
ILUSTRACIÓN 35. RESPUESTA VOLTAMPEROMÉTRICA DE LAS CONFIGURACIONES 2X[(CHI)-(AuNPs)] (ROJO), 2X[(CHI)-(CuPc)] (AZUL CLARO), 2X[(CHI)-(AuNPs + CuPc)] (MORADO), 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)- (CuPc)] (AZUL OSCURO) Y 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] (NARANJA) EN MUESTRA PATRÓN DE HIDROQUINONA $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A). DETALLE DEL PICO ANÓDICO (A.I). DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.II). ....	70
ILUSTRACIÓN 36. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE LA CONFIGURACIÓN 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I); Y 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] (B), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (B.I) EN CATECOL $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7. ....	72
ILUSTRACIÓN 37. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE LA CONFIGURACIÓN 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I); 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] (B), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (B.I); Y 2X[(CHI)-(CuPc)] (C). DETALLE DEL PICO CATÓDICO (C.I) EN HIDROQUINONA $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7. ....	73
ILUSTRACIÓN 38. ESPECTRO UV-VISIBLE PARA LA CONFIGURACIÓN [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]. [(CHI)] (NEGRO), [(CHI)-(AuNPs)] (ROJO), [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)] (AZUL) Y [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (VERDE) SOBRE UN SUSTRATO DE CUARZO. ....	75
ILUSTRACIÓN 39. ESPECTRO UV-VISIBLE ENTRE PARA $NX[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ CON $N = (4, 8, 12, 16,$ 20) (A). REGRESIÓN LINEAL PARA UN NÚMERO CRECIENTE DE CAPAS EN LA BANDA Q SITUADA A 615 NM (B). .....	76
ILUSTRACIÓN 40. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA FTIR DE LA CONFIGURACIÓN $NX[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ CON $N=4, 8, 12, 16, 20$ . ....	77
ILUSTRACIÓN 41. REGRESIÓN LINEAL DEL ESPECTRO FT-IR DEL CHITOSÁN PARA UN NUMERO DE ONDA DE $1646 \text{ cm}^{-1}$ (A) REGRESIÓN LINEAL DEL ESPECTRO FT-IR DE LA FTALOCIANINA DE COBRE PARA UN NUMERO DE ONDA DE $1027 \text{ cm}^{-1}$ (B). ....	77
ILUSTRACIÓN 42. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE UN SENSOR NANOESTRUCTURADO CON LA CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I) EN CATECOL $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7. ....	78
ILUSTRACIÓN 43. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE UN SENSOR NANOESTRUCTURADO CON LA CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I) EN HIDROQUINONA $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7. ....	79
ILUSTRACIÓN 44. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE LA CONFIGURACIÓN $NX[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ EN CATECOL $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 PARA $N=1$ (NEGRO), $N=2$ (ROJO), $N=4$ (AZUL), Y $N=6$ (VERDE) (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I). ....	80
ILUSTRACIÓN 45. CRONOAMPEROMETRÍA CATÓDICA DEL SENSOR $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ A UN POTENCIAL FIJO DE -35mV CON ADICIONES SUCESIVAS DE 1 mL DE DISOLUCIÓN PATRÓN DE CATECOL $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M PH 7. ....	81



ILUSTRACIÓN 46. REPRESENTACIÓN DE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CATECOL PARA EL SENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)].....	82
ILUSTRACIÓN 47. CRONOAMPEROMETRÍA CATÓDICA DEL SENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] A UN POTENCIAL FIJO DE -150mV CON ADICIONES SUCESIVAS DE 1 mL DE DISOLUCIÓN PATRÓN DE HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M PH 7.....	83
ILUSTRACIÓN 48. REPRESENTACIÓN DE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROQUINONA PARA EL SENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)].....	83
ILUSTRACIÓN 49. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC EN MUESTRA DE CATECOL 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 CON INMOVILIZACIÓN POR INMERSIÓN DIRECTA EN GLUTARALDEHÍDO (ROJO) Y POR VAPORES DE GLUTARALDEHÍDO (NEGRO) (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	86
ILUSTRACIÓN 50. VOLTAMETRÍA CÍCLICA EN ITO CON LA ENZIMA LACASA INMOVILIZADA SOBRE MUESTRA DE CATECOL 10 <sup>-4</sup> M (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO PARA LA MUESTRA DE CATECOL (A.I); E HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M (B), DETALLE DEL PICO CATÓDICO PARA LA MUESTRA DE HIDROQUINONA (B.I) EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7.....	87
ILUSTRACIÓN 51. RESPUESTA VOLTAMPEROMÉTRICA PARA EL SENSOR NANOESTRUCTURADO 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (NEGRO) Y EL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC (ROJO) (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I) PARA MUESTRA DE CATECOL 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7.....	88
ILUSTRACIÓN 52. RESPUESTA VOLTAMPEROMÉTRICA PARA EL SENSOR NANOESTRUCTURADO 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (NEGRO) Y EL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC (ROJO) (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I) PARA MUESTRA DE HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7.....	89
ILUSTRACIÓN 53. VOLTAMETRÍA CÍCLICA EN ITO CON LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA SOBRE MUESTRA DE CATECOL 10 <sup>-4</sup> M (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO PARA LA MUESTRA DE CATECOL (A.I); E HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M (B), DETALLE DEL PICO CATÓDICO PARA LA MUESTRA DE HIDROQUINONA (B.I) EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7.....	90
ILUSTRACIÓN 54. RESPUESTA VOLTAMPEROMÉTRICA PARA EL SENSOR NANOESTRUCTURADO 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (NEGRO) Y EL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR (ROJO) (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I) PARA MUESTRA DE CATECOL 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7.....	90
ILUSTRACIÓN 55. RESPUESTA VOLTAMPEROMÉTRICA PARA EL SENSOR NANOESTRUCTURADO 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (NEGRO) Y EL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR (ROJO) (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I) PARA MUESTRA DE HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7.....	91
ILUSTRACIÓN 56. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE DOS BIOSENSORES 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC EN CATECOL 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	92
ILUSTRACIÓN 57. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE DOS BIOSENSORES 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC EN HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	93
ILUSTRACIÓN 58. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE DOS BIOSENSORES 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR EN CATECOL 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	94
ILUSTRACIÓN 59. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE DOS BIOSENSORES 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR EN HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	95
ILUSTRACIÓN 60. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC EN CATECOL 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	96
ILUSTRACIÓN 61. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC EN HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	97
ILUSTRACIÓN 62. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR EN CATECOL 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	98
ILUSTRACIÓN 63. RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR EN HIDROQUINONA 10 <sup>-4</sup> M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M A PH 7 (A), DETALLE DEL PICO CATÓDICO (A.I).....	99



ILUSTRACIÓN 64. CRONOAMPEROMETRÍA CATÓDICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC A UN POTENCIAL FIJO DE -200 mV CON ADICIONES SUCESIVAS DE 1 mL DE DISOLUCIÓN DE CATECOL $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M PH 7. ....	101
ILUSTRACIÓN 65. REGRESIÓN LINEAL DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC PARA EL CATECOL. ....	101
ILUSTRACIÓN 66. CRONOAMPEROMETRÍA CATÓDICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC A UN POTENCIAL FIJO DE -400 mV CON ADICIONES SUCESIVAS DE 1 mL DE DISOLUCIÓN DE HIDROQUINONA $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M PH 7. ....	102
ILUSTRACIÓN 67. REGRESIÓN LINEAL DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-LAC PARA LA HIDROQUINONA. ....	102
ILUSTRACIÓN 68. CRONOAMPEROMETRÍA CATÓDICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR A UN POTENCIAL FIJO DE -270 mV CON ADICIONES SUCESIVAS DE 1 mL DE DISOLUCIÓN DE CATECOL $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M PH 7. ....	104
ILUSTRACIÓN 69. REGRESIÓN LINEAL DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR PARA EL CATECOL. ....	104
ILUSTRACIÓN 70. CRONOAMPEROMETRÍA CATÓDICA DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR A UN POTENCIAL FIJO DE -740 mV CON ADICIONES SUCESIVAS DE 1 mL DE DISOLUCIÓN DE HIDROQUINONA $10^{-4}$ M EN TAMPÓN FOSFATO 0,01 M PH 7. ....	105
ILUSTRACIÓN 71. REGRESIÓN LINEAL DEL BIOSENSOR 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-TIR PARA LA HIDROQUINONA. ....	105





## Índice de ecuaciones.

ECUACIÓN 1. ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN PARA UN ÚNICO SUSTRATO. ....	15
ECUACIÓN 2. ECUACIÓN LINEALIZADA DE MICHAELIS-MENTEN PARA UN ÚNICO SUSTRATO.....	15
ECUACIÓN 3. CONSTANTE DE MICHAELIS.....	15
ECUACIÓN 4. EL MECANISMO DE REDUCCIÓN DE $Au^{+3}$ A $Au^0$ EN DISOLUCIÓN. ....	23
ECUACIÓN 5. ECUACIÓN SIMPLIFICADA DE LA LEY DE LAMBERT-BEER.....	33
ECUACIÓN 6. ECUACIÓN DE BEER-LAMBER. ....	33
ECUACIÓN 7. ECUACIÓN DE NERST. ....	34
ECUACIÓN 8. ECUACIÓN DE LA ENERGÍA LIBRE DE GIBBS. ....	34
ECUACIÓN 9. CONSTANTE UNIVERSAL DE LOS GASES IDEALES. ....	34
ECUACIÓN 10. REACCIÓN QUÍMICA GENERAL.....	34
ECUACIÓN 11. CONSTANTE DE EQUILIBRIO TERMODINÁMICA CORRESPONDIENTE CON EL POTENCIAL ELECTROQUÍMICO E DE LA ECUACIÓN DE NERST.....	34
ECUACIÓN 12. ECUACIÓN DE NERST SUSTITUYENDO LAS CONSTANTES Y EN CONDICIONES NORMALES (TEMPERATURA 298 K).....	35
ECUACIÓN 13. ECUACIÓN DE NERST SUSTITUYENDO LAS CONSTANTES Y EN CONDICIONES NORMALES (TEMPERATURA 298 K) EN LA SUPERFICIE DEL ELECTRODO. ....	39
ECUACIÓN 14. POTENCIAL FORMAL PARA REACCIONES REVERSIBLES OBTENIDO DE LA ECUACIÓN DE NERST.....	39
ECUACIÓN 15. ECUACIÓN DE RANDLES-SEVCIK PARA LAS INTENSIDADES DE PICO EN REACCIONES REVERSIBLES. ....	39
ECUACIÓN 16. ECUACIÓN DE RANDLES-SEVCIK PARA LAS INTENSIDADES DE PICO EN REACCIONES REVERSIBLES CON LAS CONSTANTES $F, R$ y $T$ (298 K) SUSTITUIDAS. ....	39
ECUACIÓN 17. ECUACIÓN DE RANDLES-SEVCIK PARA LAS INTENSIDADES DE PICO EN REACCIONES IRREVERSIBLES CON LAS CONSTANTES $F, R$ y $T$ (298 K) SUSTITUIDAS. ....	40
ECUACIÓN 18. POTENCIAL DE PICO PARA UN PROCESO IRREVERSIBLE.....	40
ECUACIÓN 19. ECUACIÓN COTTRELL PARA ELECTRODOS PLANOS. ....	41
ECUACIÓN 20. ECUACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.....	42
ECUACIÓN 21. ECUACIÓN DE HENDERSON-HASSELBALCH PARA LA OBTENCIÓN DE DISOLUCIÓN TAMPÓN FOSFATO PH 7.....	56
ECUACIÓN 22. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SENSOR DE CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ EN CATECOL $10^{-4}$ M. ....	82
ECUACIÓN 23. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SENSOR DE CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ EN HIDROQUINONA $10^{-4}$ M.....	83
ECUACIÓN 24. ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN PARA UN ÚNICO SUSTRATO EN CONDICIONES DE SATURACIÓN. ...	98
ECUACIÓN 25. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL BIOSENSOR DE CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ -LAC PARA EL CATECOL.....	101
ECUACIÓN 26. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL BIOSENSOR DE CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ -LAC EN HIDROQUINONA. ....	103
ECUACIÓN 27. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL BIOSENSOR DE CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ -TIR EN CATECOL.....	104
ECUACIÓN 28. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL BIOSENSOR DE CONFIGURACIÓN $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ -TIR PARA LA HIDROQUINONA.....	106



**Universidad de Valladolid**

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

# *Capítulo I*

## *Introducción y objetivos*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## 1. Introducción y objetivos.

### 1.1. Introducción.

La industria alimentaria realiza una contribución esencial a la economía. En la unión europea, la industria alimentaria genera un volumen de negocio de 1.109.000 millones de euros, con 294.000 empresas y con un empleo directo de 4,57 millones de personas, además de innumerables empleos indirectos entre productores, transportistas, comerciales, etc. España juega, dentro de la Unión Europea, un papel aventajado en la industria alimentaria, estando el quinto en el ranking europeo, representando este sector un 9,4% del total, después de Francia con el 16,8%, Alemania con el 16%, Italia con el 12,4% y Reino Unido con el 11% [1].

El sector agroalimentario resulta de especial relevancia en Castilla y León siendo uno de los principales motores económicos y de empleo de la región. Castilla y León encabeza la producción de cereales de secano en España, y casi la mitad de la producción de productos de alimentación básicos como son el azúcar y las patatas, además de destacar en la producción de vino con múltiples denominaciones de origen autóctonas [1].

La industria de la alimentación se encuentra inmersa en una revolución tecnológica, la denominada cuarta revolución, Industria 4.0 o Food Industry 4.0. Esta revolución pretende dar respuesta a un entorno cada vez más cambiante, en el que se requiere una flexibilización de la producción, una mejora de la eficiencia y una integración de proveedores y consumidores en los procesos productivos. La Industria 4.0 utiliza un análisis sistemático de grandes cantidades de datos para impulsar una toma de decisiones ágil, inteligente, competitiva y enfocada a la plena satisfacción del consumidor [2].

La integración de todo el proceso productivo propuesto por la industria 4.0, permite garantizar la trazabilidad del producto, evitar la desviación de los parámetros de calidad y detectar en los estadios iniciales la menor desviación de la calidad de los inputs u outputs [3].

Además, la industria de la alimentación está sujeta a estrictas normativas que aseguran la calidad de los productos y que obligan a la automatización del análisis en unas condiciones de rapidez, exactitud y costes muy exigentes. Para cumplir con las exigencias en el análisis se requiere una mejora en los sistemas de detección, siendo una de las posibles soluciones la mejora de los sensores [3].

La utilización de nuevos materiales sensibles en la elaboración de sensores permite aumentar la reactividad de los sensores, y en consecuencia la magnitud de la respuesta frente a la concentración de los analitos [4]. El uso de materiales nanoestructurados en la



elaboración de nuevos sensores con mejores prestaciones se está convirtiendo en una alternativa económica y tecnológicamente viable [5].

Desde 1992 el grupo de investigación UvaSens dirigido por la Profesora María Luz Rodríguez Méndez ha basado su investigación en la elaboración de nuevos sensores y aparatos para mejorar los métodos de determinación analítica con la introducción de nuevos materiales y procedimientos [6].

Una de las técnicas utilizadas para el desarrollo de nuevos sensores en el grupo UvaSens es la técnica Layer by Layer en la que, sobre un soporte adecuado, se depositan materiales nanoestructurados de carga alterna. La técnica da como resultado un sensor nanoestructurado que posee una reactividad mucho mayor que el soporte original y en consecuencia, una mayor sensibilidad en la determinación [6].

La obtención de biosensores biomiméticos es otra de las líneas de investigación del grupo UvaSens. En esta, se replican los procesos biológicos para mejorar los métodos de determinación analítica. Esta investigación se basa en la aplicación de enzimas y anticuerpos inmovilizados sobre el electrodo, de forma que se mejoran las características del sensor, en concreto la sensibilidad, el límite de detección y la especificidad hacia el sustrato [6].

El presente trabajo continúa con las dos líneas de investigación anteriormente mencionadas. En primer lugar, se hace uso de la técnica Layer by Layer para la elaboración de un sensor electroquímico con películas nanoestructuradas compuestas con nuevos materiales sensibles. En segundo lugar, se transforman estos sensores en biosensores con la inmovilización de enzimas sobre la superficie nanoestructurada, con el fin de mejorar sus prestaciones en la detección de fenoles de interés en los alimentos.



## 1.2. Objetivos.

El objetivo fundamental del actual trabajo de fin de grado fue el diseño de biosensores electroquímicos nanoestructurados para la detección de fenoles de interés en alimentación, utilizando películas de tamaño nanométrico que se obtuvieron mediante la técnica de autoensamblado Layer by Layer. Las enzimas utilizadas para obtener los biosensores fueron las oxidorreductasas tirosinasa y lacasa, por ser las enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción de los fenoles analizados, el catecol y la hidroquinona.

Para cumplir con el objetivo principal se siguieron los siguientes pasos:

1. Se desarrollaron películas nanoestructuradas mediante el uso de tres materiales de tamaño nanométrico con carga alterna y con funciones complementarias: El quitosán como material adecuado para la acomodación de las enzimas, las nanopartículas de oro para mejorar la transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo y la ftalocianina de cobre como mediador electrónico entre el soporte nanoestructurado y la enzima.
2. Se realizó el estudio de las posibles configuraciones para aprovechar las propiedades de los materiales empleados, y así obtener el sensor nanoestructurado con mejores características.
3. Se realizó una caracterización de la adecuada adsorción de los materiales en la nanoestructura mediante dos técnicas, espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía de absorción Ultravioleta- Visible (UV-Vis).
4. Se desarrollarán biosensores enzimáticos mediante la inmovilización de las enzimas tirosinasa y lacasa sobre las películas nanoestructuradas.
5. Para los sensores y biosensores enzimáticos derivados, se realizó un estudio de su comportamiento, frente a catecol e hidroquinona, mediante las técnicas electroquímicas voltametría cíclica y cronoamperometría.



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES





Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

*Desarrollo del TFG*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

# *Capítulo II*

## *Fundamento Teórico*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## 2. Fundamento teórico.

### 2.1. Estado del arte y precedentes.

La nanociencia engloba distintos conocimientos procedentes de disciplinas como la física, la química, la ingeniería, la ciencia de materiales, la biología, la bioquímica, la medicina y la electrónica entre otras. Se dedica al estudio, manipulación y construcción de materiales con dimensiones nanométricas, es decir, con al menos una de sus dimensiones comprendida entre los 0,1 nm y los 100 nm. La nanotecnología emplea los conocimientos y la metodología adquiridos en el estudio de nanomateriales para elaborar aplicaciones y productos para uso comercial que aprovechan las propiedades de los materiales a esta escala [4].

En las últimas décadas, se ha despertado un gran interés en la investigación científica con el objetivo de implementar los materiales nanométricos en múltiples aplicaciones, debido a las excelentes propiedades que exhiben [5].

Uno de los campos de especial interés para la investigación es el perfeccionamiento de los métodos de determinación analítica y de los sensores utilizados en la determinación. La implementación de nanomateriales en la elaboración de sensores permite mejorar aspectos fundamentales como su fiabilidad, selectividad, sensibilidad, precisión y exactitud, así como los límites de detección con un coste competitivo y en un tiempo de ejecución razonable [3].

#### 2.1.1. Nanociencia y nanotecnología en la industria alimentaria.

Para la integración de todo el proceso productivo en la industria alimentaria se hace necesaria la simplificación de los métodos, procedimientos y equipos analíticos con una pérdida de precisión y exactitud aceptable. Las determinaciones analíticas de campo requieren la portabilidad y la miniaturización de los equipos para el análisis de muestras con un pretratamiento sencillo [3]. Las determinaciones analíticas en fábrica presentan las mismas necesidades que las de campo y además, requieren agilidad en el análisis y una rápida y automática acción sobre el producto [7].

Las técnicas y aplicaciones de la nanociencia y la nanotecnología pueden contribuir a la mejora de las determinaciones analíticas necesarias para el control de los procesos en la industria alimentaria mediante la mejora de las prestaciones de los sensores empleados [7]. Los sensores basados en materiales nanométricos poseen algunas de las ventajas que se destacan a continuación:



- Las respuestas de las señales obtenidas **presentan mayor sensibilidad y menor límite de detección** por poseer mayor reactividad superficial [8].
- **Se pueden diseñar de modo que sean extremadamente selectivos** a los analitos de interés y por tanto con pocas interferencias entre especies químicas [3].
- **Requieren menos pretratamientos** de la muestra por su gran selectividad [3].
- Son técnicas **ideales para la miniaturización y la portabilidad** de los equipos ya que, con sus mejoras de límite de detección y sensibilidad, compensan el empleo de equipos portátiles [5].
- Son susceptibles de **utilización en laboratorio tradicional sin el reemplazo de los equipos** con una mejora de sensibilidad y límite de detección [7].

En la industria alimentaria se requiere el análisis de los compuestos claves para mantener la calidad y salubridad de los productos, así como el análisis de sus propiedades organolépticas [9]. Un grupo de compuestos en particular, los fenoles, compuestos derivados del hidroxibenceno, son de especial relevancia en la industria alimentaria, ya que son indicadores del correcto funcionamiento de muchos procesos productivos. Los fenoles se pueden encontrar en múltiples alimentos del reino vegetal como el té, las cebollas, las fresas, las ciruelas, las aceitunas, el aceite de oliva, las uvas y el vino tinto [10].

En el caso del vino, los fenoles determinan la correcta fermentación de la uva, así como la adecuada maduración del vino ya que, son compuestos indicativos de los fenómenos de transferencia de oxígeno atmosférico en el seno del vino [11].

Los ensayos clásicos de análisis de vinos tintos pasaban, la mayoría de las veces, por una determinación inicial del contenido de azúcares, donde el control de la maduración se evaluaba mediante la cata, siendo crítica la experiencia del catador. Los nuevos ensayos de madurez fenólica proporcionan una excelente alternativa a los métodos tradicionales de cata para controlar la correcta maduración del vino tinto. Estos ensayos determinan la concentración de compuestos fenólicos controlando de forma indirecta el proceso de extracción sólido-líquido entre el vino, la piel y las pepitas, además de controlar el complejo proceso de oxidación que conduce a la maduración del vino [12]. Se hace por tanto necesario, el desarrollo de nuevos sensores que sean competitivos, selectivos y sensibles para la determinación de los fenoles presentes en el vino.



## 2.2. Sensores empleados.

### 2.2.1. Sensores: Concepto y clasificación.

Un sensor es un dispositivo que convierte una señal física, química o biológica en una señal medible de otra naturaleza, normalmente eléctrica. Un sensor consta de tres elementos fundamentales [13]:

- **El receptor** es el componente que capta el fenómeno a ser medido, llamado señal primaria, es decir, muestra en su salida una señal eléctrica dependiente de la magnitud de la variable medida [13].
- **El transductor** recibe la señal eléctrica que proviene del receptor y la modifica mediante un sistema de acondicionamiento de señal [13].
- **El convertidor o amplificador** transforma y/o amplifica la señal de salida del transductor, haciéndola pasar por un convertidor, conectado a un PC. La señal de salida del amplificador es la denominada señal secundaria [13].

La identificación del tipo de sensor se realiza mediante la naturaleza de la señal primaria, es decir, del tipo de fenómeno físico que recibe el receptor. Cuando los sensores responden generando una respuesta química se denominan sensores químicos [13].

Los sensores químicos son dispositivos en los que el elemento sensible está constituido por un compuesto químico, ya sea orgánico o inorgánico. Los sensores electroquímicos responden con cambios de potencial o intensidad, como resultado de una interacción química entre una especie química y el sensor, convirtiendo información química en una señal medible analíticamente [13].

Existen distintos tipos de sensores dependiendo de la propiedad electroquímica medida, estos se dividen en:

- **Sensores potenciométricos:** Miden la diferencia de potencial establecido entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Los potenciales obtenidos dependerán de la concentración de iones en disolución y de la naturaleza de estos [13].
- **Sensores impedimétricos:** Se impone una tensión o corriente alterna y constante para detectar cambios en la conductividad eléctrica causados por variaciones de la concentración de iones. La naturaleza alterna de la corriente o voltaje impuestos se debe a la necesidad de evitar fenómenos de polarización [13].
- **Sensores amperométricos:** En estos sensores se aplica un potencial externo fijo entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia midiendo la intensidad eléctrica que es proporcional a la concentración de iones en disolución [13].



Dentro de los sensores amperométricos existe un grupo muy particular de sensores denominados **sensores voltamétricos o voltamperométricos**. Estos permiten obtener valores de corriente con un valor de potencial que es variable en el tiempo, existiendo variantes según la función que sigue el potencial a lo largo del tiempo [13].

Los sensores voltamétricos son ideales para el análisis de especies electroactivas susceptibles de sufrir procesos redox, como es el caso de los fenoles. Técnicas como la voltametría cíclica permiten la identificación de especies químicas, así como la determinación de su concentración, siendo esta proporcional a la corriente. Los sensores voltamétricos presentan como principales desventajas que son poco selectivos y que de ellos se obtiene una señal de baja intensidad [13].

Para suplir estas dos desventajas, la estrategia en el actual trabajo de fin de grado será una mejora de la sensibilidad que se conseguirá mediante la construcción de una superficie nanoestructurada en la superficie de los sensores y la mejora de selectividad, que se logrará mediante la inmovilización de enzimas. Con esta estrategia se obtendrán unos biosensores enzimáticos nanoestructurados con una alta sensibilidad y selectividad a los difenoles catecol e hidroquinona.

### 2.2.2. Biosensores.

Los biosensores son sensores químicos en los que intervienen elementos biológicos como el ADN, las enzimas, los anticuerpos, las células o los tejidos [8]. Destacan como elementos de reconocimiento las enzimas por sus capacidades reactivas y selectivas en la catálisis de las especies químicas de interés. Las enzimas se encuentran en contacto con el analito de interés y con el transductor y transforman la señal química en una señal eléctrica. Los biosensores presentan como ventajas comparativas con respecto a otros sensores que implican pocos cambios en la instrumentación, que aumentan la sensibilidad del sensor y que son tremendamente selectivos [8].

#### 2.2.2.1. Enzimas.

Las enzimas son macromoléculas de carácter proteico y de procedencia biológica que combinadas o no con algún otro compuesto catalizan reacciones con gran selectividad y con una velocidad de reacción muy superior a la reacción no catalizada con la enzima. Las enzimas poseen una especificidad unívoca por unas moléculas, denominadas sustratos, que son específicas de la propia enzima, catalizando la reacción hacia los productos, también característicos de la enzima [14].



Estos biocatalizadores funcionan de la misma forma que el resto de catalizadores químicos haciendo disminuir la energía de activación y en consecuencia aumentando sustancialmente la velocidad de reacción sin alterar el equilibrio y obteniendo la enzima libre una vez finalizada la reacción [15].

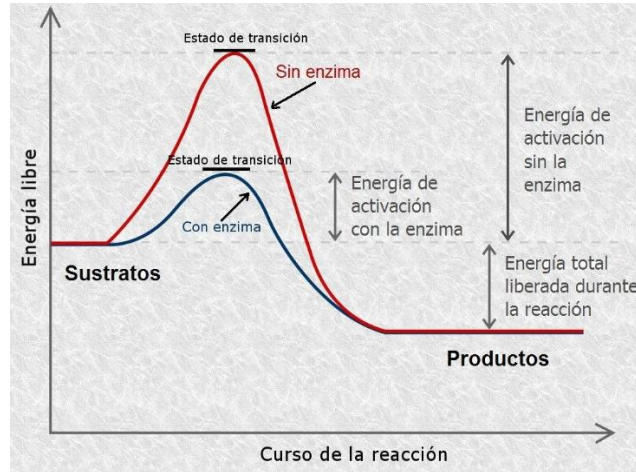


Ilustración 1. Esquema de reacción en la conversión de sustratos a productos con catalizador enzimático y sin él.

La caracterización de los parámetros cinéticos enzimáticos de una reacción con un único sustrato está regida por la ecuación cinética de Michaelis-Menten [16].

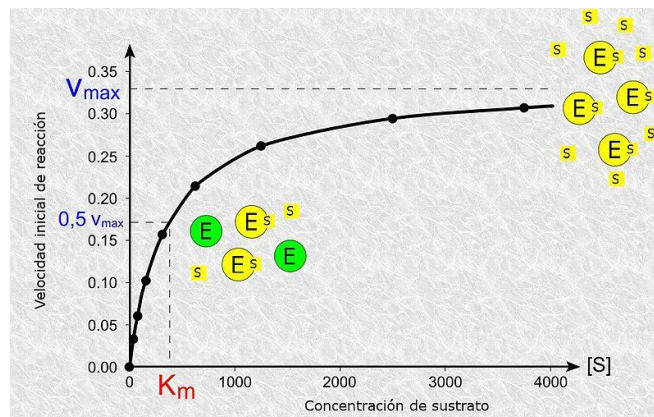


Ilustración 2. Cinética de reacción de Michaelis-Menten entre un sustrato y una enzima.

Las etapas de la cinética michaeliana con sus constantes cinéticas asociadas se pueden observar en la Ilustración 3:

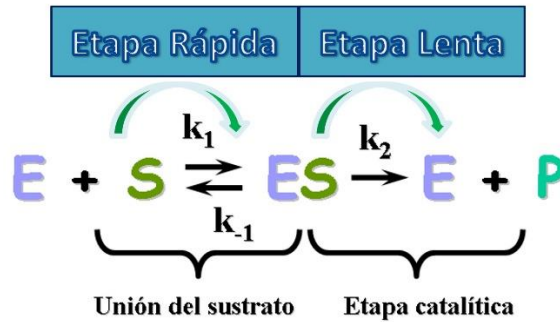


Ilustración 3. Etapas del modelo cinético michaeliano con dos etapas reactivas en serie. Unión de sustrato y enzima y separación de producto y enzima.

La ecuación de Michaelis-Menten después de una serie de transformaciones y simplificaciones relacionadas con el estado estacionario de la reacción, presenta la siguiente forma [17]:

$$\vartheta = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 1. Ecuación de Michaelis-Menten para un único sustrato.

Que en su forma linealizada es:

$$\frac{1}{\vartheta} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ecuación 2. Ecuación linealizada de Michaelis-Menten para un único sustrato.

Siendo:

- $K_m$ : La constante de Michaelis. Se define como la concentración donde la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la  $V_{max}$ . Tiene unidades de concentración  $mol/L$  o  $mol/m^3$ . Se obtiene de las velocidades de reacción de las etapas de la siguiente forma [17]:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Ecuación 3. Constante de Michaelis

- $\vartheta$ : La velocidad de reacción por unidad de peso de la enzima. Las unidades en las que se puede encontrar son  $mol/s \cdot kg$  [17].
- $V_{max}$ : La velocidad máxima de reacción. Las unidades en las que se puede encontrar son  $mol/s \cdot kg$  [17].



- $[S]$ : La concentración de sustrato en el medio. Se mide en unidades de  $mol/m^3$  [17].

Las enzimas son extremadamente sensibles a las condiciones extremas de temperatura, pH y a la alta concentración de sales, perjudicando o incluso perdiendo por completo su actividad catalítica debido a la denominada desnaturalización [18].

Las enzimas se clasifican en seis grandes grupos, en función de las reacciones catalizadas [19]:

**Oxidorreductasas:** Catalizan reacciones de oxidación-reducción modificando el estado de oxidación de uno o más átomos de una molécula. En los sistemas enzimáticos los procesos redox implican el cambio de hidrógenos y oxígenos para compensar la transferencia de electrones [19].

**Transferasas:** Catalizan la transferencia de grupos funcionales de una molécula donadora a una aceptora [19].

**Hidrolasas:** Catalizan reacciones de hidrólisis, rotura de un enlace por adición de agua, en la que los grupos obtenidos pasan a tener un grupo  $-OH$  y un hidrógeno respectivamente [19].

**Liasas:** Las liasas catalizan reacciones de ruptura de enlaces mediante la formación de un doble enlace [19].

**Isomerasas:** Las isomerasas catalizan un isómero químico (compuesto químico con la misma composición, pero con distinta estructura) en otro, reordenando su estructura molecular [19].

**Ligasas:** Las ligasas catalizan la formación de enlaces covalentes entre dos sustratos [19].

En este trabajo de fin de grado se emplearán dos enzimas del grupo de las oxidorreductasas, la lacasa y las tirosinasa, que se describen a continuación.

#### 2.2.2.1.1. Lacasa.

La lacasa o benzenodiol dioxígeno oxidorreductasa es una enzima perteneciente a la familia de las oxidorreductasas multicobre que contiene cuatro átomos de cobre unidos a tres sitios activos. En las lacasas, los átomos de cobre son responsables de la catálisis de sustratos, por ser los responsables de la transferencia de electrones. La estructura general de la lacasa con sus dominios se pueden observar a en la Ilustración 4 [20]:

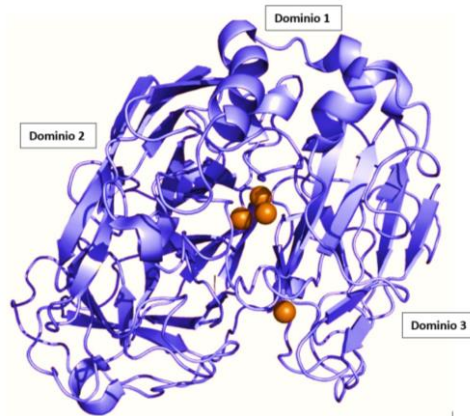


Ilustración 4. Estructura cuaternaria de la enzima lacasa [21].

Las lacasas catalizan las reacciones redox de o-difenoles, m- difenoles, p-difenoles, polifenoles, aminofenoles, diaminas entre otros, pero no monofenoles [20].

Los fenoles se consideran los sustratos idoneos para catalisis con las lacasas [22]. La oxidación del sustrato fenólico se produce por la reducción de oxígeno molecular disuelto en la solución, generando radicales con carga positiva que se transforman en quinonas [23]. Los orto-difenoles son facilmente oxidables siendo los meta-difenoles los mas dificiles de oxidar [22]. En la Ilustración 5 se pueden observar la catalisis de orto-, meta- y para-difenoles:

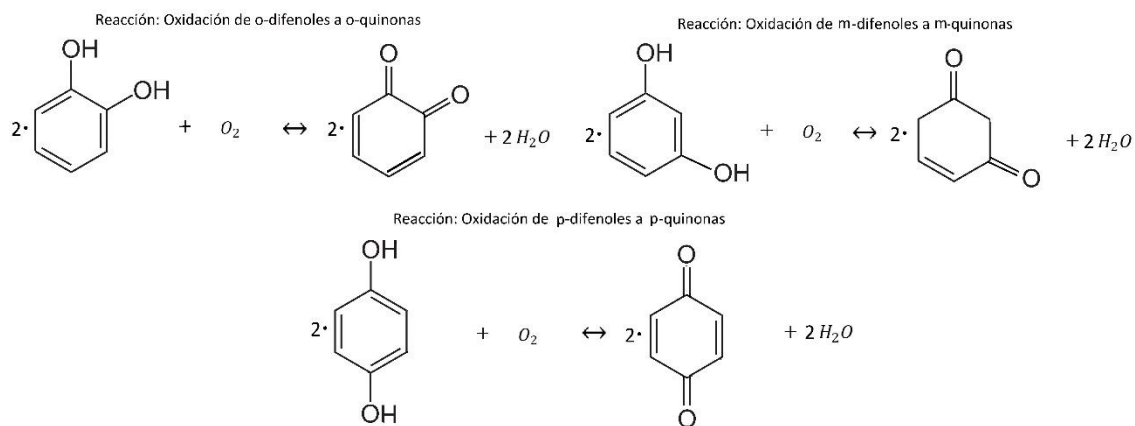


Ilustración 5. Mecanismo de reacción redox de orto-, meta- y para-difenoles.

La lacasa empleada en el actual trabajo de fin de grado proviene de la cepa *Trametes versicolor* obtenida de una seta poliporo de la familia de los hongos de repisa que poseen poros en su zona inferior [23].

### 2.2.2.1.2. Tirosinasa.

La tirosinasa, también denominada polifenol oxidasa, es una enzima de la familia de las oxidorreductasas. La estructura general de la tirosinasa con sus distintas subunidades se puede observar a en la Ilustración 6 [24]:

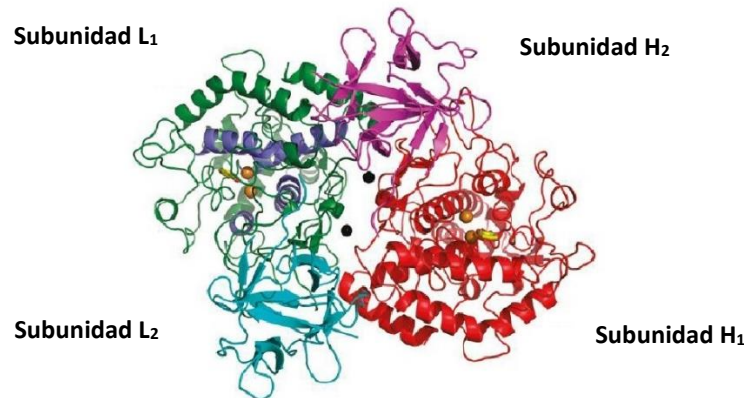


Ilustración 6. Estructura de la enzima tirosinasa [25].

Las interacciones que mantienen unidas las cuatro subunidades son de carácter polar e hidrofóbicas. El centro activo de la tirosinasa es casi plano y su acceso no se ve impedido por ninguna de las subunidades [26].

La tirosina cataliza, en presencia de oxígeno molecular, dos reacciones que se producen en serie; la primera, es la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la segunda, es la oxidación de o-difenoles a o-quinonas. [27]. En la primera catálisis se introduce un grupo hidroxilo, reemplazando un átomo de hidrógeno y en consecuencia oxidando el compuesto. En la segunda catálisis se pierde un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo y se obtiene un doble enlace con el oxígeno restante obteniendo las o-quinonas que pueden, en presencia de oxígeno molecular, polimerizar [28].

La primera de las fases reactivas, el paso de monofenoles a o-difenoles, es irreversible. En cuanto a la segunda, la oxidación de o-difenoles a o-quinonas, es reversible salvo que se produzca la polimerización de las o-quinonas [28].

La tirosinasa empleada en el actual trabajo de fin de grado proviene de la cepa *Agaricus bisporus* obtenida del champiñón común y posee exactamente el mismo centro activo que el de plantas y animales, pero difieren en la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria.

### 2.2.3. Técnica Layer by Layer. Desarrollo del sensor.

En las últimas décadas la técnica Layer by Layer (LBL) ha recibido el interés de investigadores y empresas debido a la sencillez de su ejecución, la posibilidad de automatización y el control en el espesor de la película. Es por este hecho que se ha planteado su introducción en numerosas aplicaciones para, de esta forma, aprovechar las ventajas de los materiales nanoestructurados [3]. Esta técnica permite la formación de una fina película del tamaño de la nanoescala (entre 1 nm y 100 nm) en un sustrato adecuado para depositar los materiales [5].

La metodología consiste en la inmersión alterna en suspensiones de aniones y cationes que dan lugar a una película fina o monocapa de tamaño nanométrico. Entre cada monocapa, se requiere un lavado para eliminar el exceso de electrolito y para arrastrar el catión o anión pertinente, dejando de esta forma, la superficie cargada para la siguiente inmersión. Las etapas del procedimiento de la técnica LBL se pueden observar de forma esquemática en el ejemplo diseñado en la Ilustración 7 [29]:

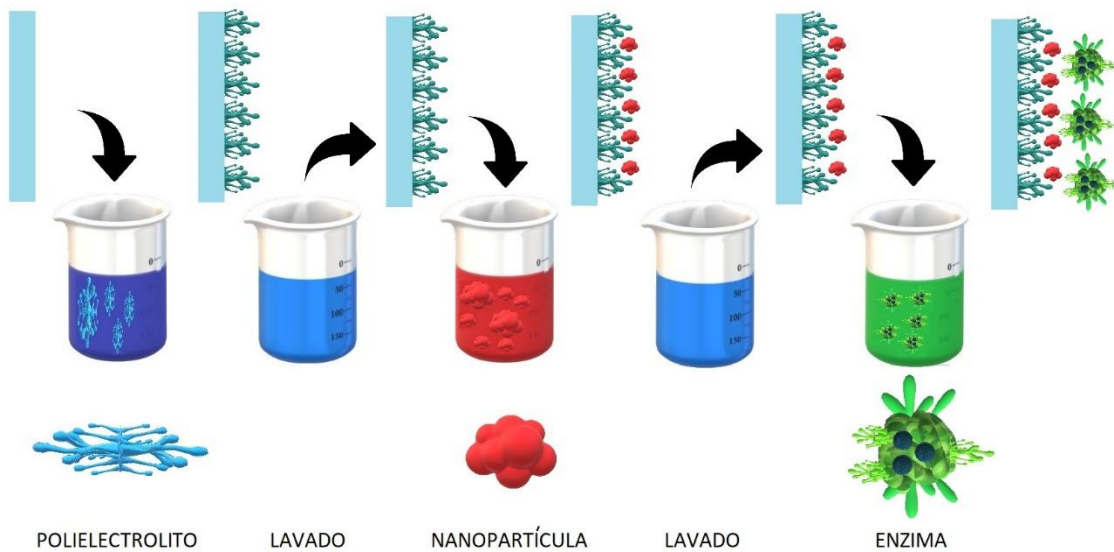


Ilustración 7. Las etapas del procedimiento de la técnica Layer by Layer de inmersión.

La automatización de esta técnica permite obtener combinaciones de películas delgadas de múltiples naturalezas y formas para aprovechar las propiedades combinadas de varios materiales nanométricos [29]. Algunas de las combinaciones se muestran en la Ilustración 8:



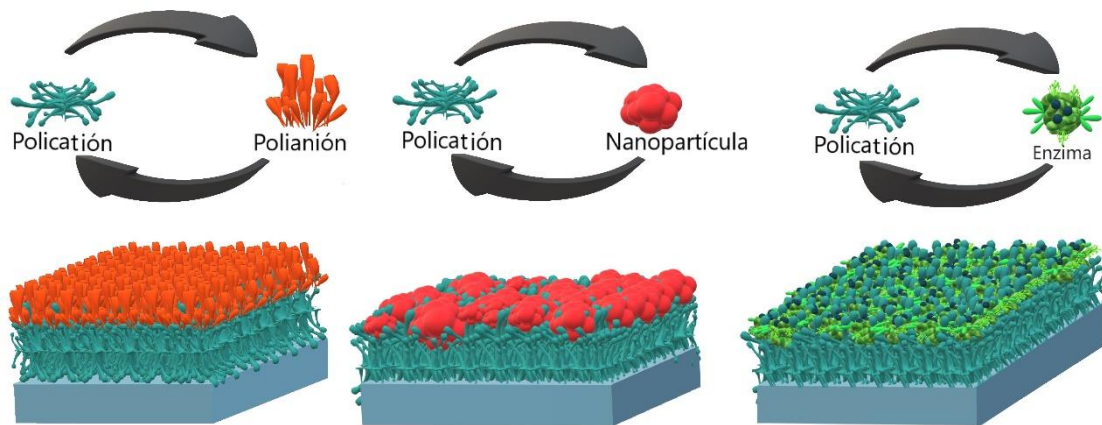


Ilustración 8. Ejemplos de soportes nanoestructurados basados en la combinación de nanomateriales por la técnica LBL.

### 2.2.3.1. Materiales utilizados en LBL.

La técnica LBL presenta ventajas importantes con respecto a otros métodos de recubrimiento superficial, sobre todo, un alto grado de control sobre el espesor de la película. Además permite modificar variables tales como la temperatura, pH, la concentración de la solución, el tamaño de las nanopartículas, los tiempos de inmersión, los tiempos de lavado, el sustrato, la velocidad de inmersión y el disolvente entre otras [30]–[32].

La distinta naturaleza de las fuerzas intermoleculares que mantienen unido el sistema de multicapas, hace posible extender la técnica a materiales que, de otra forma, resultarían excluyentes entre sí, tales como, nanopartículas, iones, compuestos organometálicos, polímeros, fibras, compuestos cerámicos, compuestos biocompatibles y moléculas biológicas como enzimas o proteínas entre otras [31], [32].

#### 2.2.3.1.1. Soporte conductor: ITO (Óxido de indio y estaño).

El óxido de indio y estaño (ITO) es un compuesto químico constituido por sendos óxidos, indio y de estaño, este último actuando como dopante. Pertenece al grupo de los óxidos conductores transparentes (TCOs). Los TCOs están compuestos por una parte no metálica, el oxígeno, que en combinación con los dos metales componen un semiconductor con diferentes características optoelectrónicas [33].



El ITO es un óxido conductor transparente de tipo n, altamente degenerado por tener una banda de gap ancha, con un intervalo de valores de entre 3,5 eV y 4,06 eV. El ITO contiene una alta densidad de portadores libres, esto le confiere las siguientes propiedades [33]:

- Alta transmitancia para luz visible de hasta el 95% [33].
- Alta reflectancia para rango infrarrojo [33].
- Relativamente baja resistividad eléctrica de entre  $1.5 \cdot 10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$  y  $2 \cdot 10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$  que depende de la densidad de portadores (muy influenciado por el método de elaboración) [33].

En el proceso de dopaje, el estaño sustituye a los átomos de indio ( $\text{In}^{3+}$ ) en el interior de la estructura del óxido de indio  $\text{In}_2\text{O}_3$ , produciéndose enlaces entre estaño y oxígeno y formando  $\text{SnO}$  y  $\text{SnO}_2$  para los estados de oxidación del estaño +2 y +4 respectivamente. El predominio de cada una de las especies determina las características conductoras del material [33].

Los TCOs se preparan con tecnologías de capa delgada para el recubrimiento de dispositivos tales como celdas solares, pantallas, sensores y circuitería [33].

#### 2.2.3.1.2. Nanopartículas de oro (AuNPs).

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son partículas de tamaño nanométrico constituidas por átomos de oro, que se encuentran estabilizadas superficialmente mediante un agente estabilizador, por ejemplo, el citrato de sodio. Las AuNPs presentan unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son distintas a las del metal en tamaño macroscópico y son intrínsecas a su tamaño nanométrico [34]. Sus principales características son:

- **Resonancia de plasmón superficial:** Los plasmones son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de un metal, producidas por un dipolo inducido por una radiación incidente. Para que se produzca este fenómeno, la oscilación ha de encontrarse restringida en un pequeño volumen, que es comparable con la longitud de onda incidente [34].
- **Confinamiento cuántico:** Cuando los electrones de las AuNPs se encuentran restringidos a moverse en una región muy pequeña del espacio, se dice que están confinados, además, cuando esta región es comparable a la longitud de onda asociada al electrón, se denomina confinamiento cuántico [34].
- **Gran área superficial:** Las AuNPs presentan una elevada área superficial que depende de su tamaño y de su funcionalización superficial [34].



- **Biocompatibilidad y baja toxicidad:** Las AuNPs presentan una baja citotoxicidad, en su forma sin funcionalizar, además de presentar un buen comportamiento en medio biológico [34].
- **Fácilmente sintetizables y funcionalizables:** Las AuNPs pueden ser sintetizadas en un amplio rango de tamaños y formas que dependen de las condiciones de síntesis, de la ruta sintética y de los agentes empleados en su estabilización. La funcionalización específica de la superficie se consigue durante la síntesis de las nanopartículas adicionando el agente funcionalizador conveniente en el lugar donde se produce la reacción [35].
- **Fototérmicas:** Las AuNPs se activan al incidir sobre ellas luz láser desprendiendo calor [34].
- **Propiedades catalíticas:** Las nanopartículas de oro mejoran la transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo [36], [37].

#### 2.2.3.1.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro por reducción de sus sales.

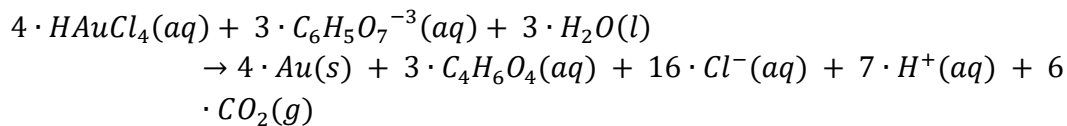
Para la síntesis de las AuNPs se mezclan tres agentes con funciones complementarias, el precursor, el reductor y el estabilizante. El agente precursor es el reactivo que contiene el Au indispensable para las sucesivas etapas de síntesis. El agente reductor es el que reduce al agente precursor. El agente estabilizante evita la agregación y permite obtener unas nanopartículas estables. Los métodos de preparación de AuNPs son de distintos tipos y con muchas variantes en función del agente precursor, agente reductor y agente estabilizante [34]. El más común de dichos métodos es el método Turkevich/Frens, un método químico, en el cual se utiliza como agente precursor el ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) en disolución acuosa y, como agente reductor y estabilizante, la sal trisódica del ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico dihidratada o comúnmente denominado citrato de trisodio [35]. Las etapas del método de Turkevich/Frens se pueden observar en la Ilustración 9:



Ilustración 9. Esquema de las etapas de reducción, nucleación, crecimiento y estabilización de método de síntesis de nanopartículas de Turkevich/Frens.

Las AuNPs sintetizadas con el método Turkevich/Frens son aproximadamente esferas monodispersas de un tamaño controlado por las concentraciones iniciales de los reactivos. Las nanopartículas obtenidas por este método tienen una carga superficial negativa, consecuencia de los aniones de citrato, que se encuentran débilmente enlazados entre sí [35].

El mecanismo por el cual se forman las AuNPs es el siguiente [35]:



Ecuación 4. El mecanismo de reducción de  $Au^{+3}$  a  $Au^0$  en disolución.

Desde el momento de la adición del citrato de trisodio se puede observar la progresión en la formación de las AuNPs. La disolución de  $HAuCl_4$  es, en un principio, de color amarillo, y tras la adición del citrato de trisodio la disolución se torna de un color morado oscuro, punto en el que se produce la sobresaturación. A continuación, tras unos segundos la disolución se aclara y las AuNPs comienzan a crecer por agregación. Finalmente, los iones de citrato funcionalizan y protegen superficialmente por repulsión electrostática las AuNPs evitando de esta forma, una mayor agregación y obteniendo así un color rojo intenso característico. La evolución a partir de la adición del agente reductor se observa de forma esquemática en la Ilustración 10 [35]:

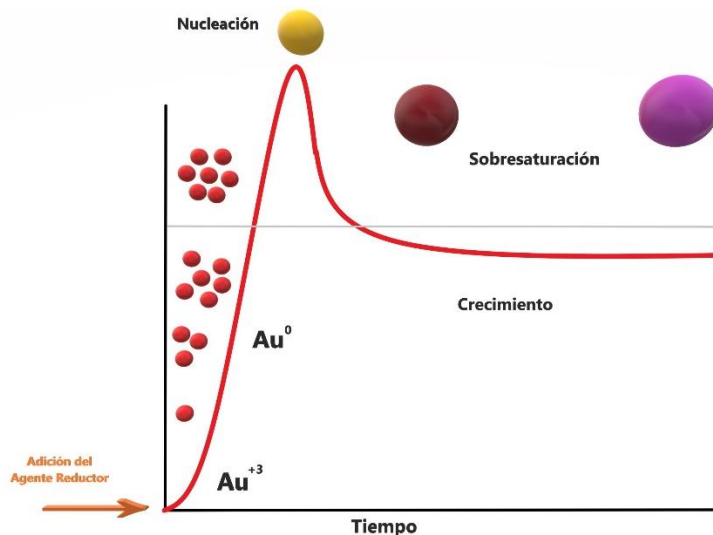


Ilustración 10. Esquema de las etapas en la formación de las AuNPs en la síntesis de Turkevich/Frens

El tamaño de las AuNPs se ve influenciado también por la velocidad de adición del agente reductor, así las AuNPs son más pequeñas y monodispersas cuanto más rápida es la adición del citrato de trisodio [35].

### 2.2.3.1.3. Chitosán o quitosano.

El chitosán o quitosano es un polímero lineal obtenido mediante la desacetilación parcial de la quitina, un compuesto que es la base estructural del exoesqueleto de los crustáceos, artrópodos, zooplancton marino e insectos [38]. Está formado por monómeros de D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  (1,4) [39]. Cuando la quitina alcanza un grado de desacetilación en torno al 50%, ésta se vuelve soluble en medios acuosos con acidez media y se denomina chitosán [38]. La estructura del monómero de chitosán se puede observar en la Ilustración 11:

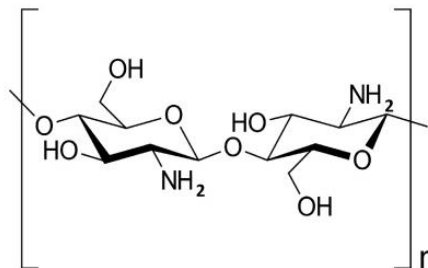


Ilustración 11. Estructura del monómero de chitosán.

La solubilización del chitosán se produce por la protonación del grupo  $-NH_2$  en la posición del carbono dos, C-2, de la unidad monomérica D-glucosamina. Esta protonación convierte al chitosán en un polielectrolito en medios ácidos, siendo el único polímero catiónico pseudonatural [39]. La protonación del grupo amino se puede observar en la Ilustración 12:

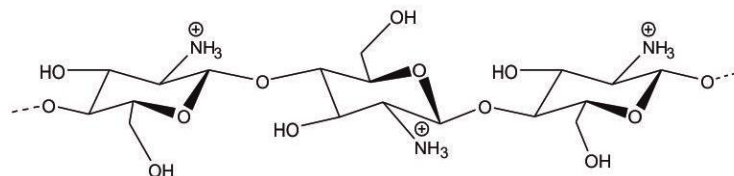


Ilustración 12. Protonación del grupo amino del chitosán.

El carácter policatiónico de este polímero es el responsable de que interactúe con superficies aniónicas y también de sus propiedades bioadhesivas. Son estas propiedades las que lo convierten en un compuesto ideal en aplicaciones de biomedicina, biotecnología, química analítica y nanotecnología [40]. Además, es un producto biodegradable, biocompatible y de baja toxicidad, lo que lo convierte en un producto ideal para ciertas aplicaciones en la industria alimentaria [39].

Para que el chitosán tenga las propiedades adecuadas, es necesario que se encuentre a un pH apropiado. El pH rige las siguientes propiedades:

- **Su solubilidad:** Está regida fundamentalmente por el pH de la solución, sin un pH adecuado no se produce la protonación del grupo  $-NH_2$  y la solubilidad disminuye, será por tanto necesario para su solubilización un medio ácido [39]. Normalmente bastará con la presencia de un ácido orgánico en disolución acuosa [40].
- **Necesidad de protonación para obtener el polícatión:** El quitosán necesita un medio ácido para que su carga sea positiva y se pueda emplear en la técnica Layer by Layer [40].
- **Un pH adecuado para la inmovilización de la enzima:** El quitosán necesita la protonación del grupo amino para la formación de fuerzas débiles con la enzima evitando así la fuga de esta de la superficie del soporte [39].

Por lo tanto, a pH ácido el quitosán es un polícatión excelente para la preparación de películas nanoestructuradas y para la inmovilización de enzimas.

#### 2.2.3.1.4. Ftalocianina de cobre.

Las ftalocianinas son macromoléculas orgánicas, simétricas constituidas por cuatro grupos isoindol [41]. Su configuración electrónica de enlaces  $\pi$  le confiere una gran estabilidad química y térmica. Además, su estructura, permite la coordinación con un ion metálico en el centro de su estructura para la formación de un complejo (metalofthalocianina), así como, la sustitución de sus grupos funcionales periféricos para mejorar sus propiedades químicas y térmicas [41].

Las excelentes propiedades de las ftalocianinas han convertido estos compuestos y sus derivados en materiales de interés para disciplinas tales como la biotecnología, nanotecnología y química analítica entre otras [42].

La ftalocianina de cobre (CuPc) utilizada en el presente trabajo contiene un átomo de cobre en el interior del anillo como ion complejante, y tiene sustituidos sus grupos funcionales periféricos con grupos  $NaSO_3$  para mejorar su solubilidad en agua.

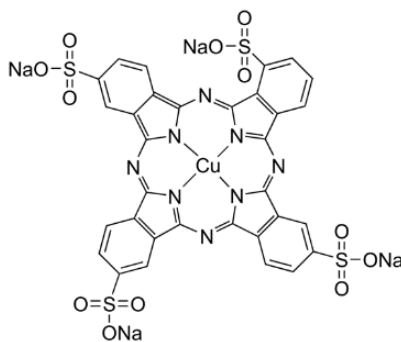


Ilustración 13. La ftalocianina tetrasulfónica ácida de cobre.



La ftalocianina de cobre presenta unas excelentes propiedades para su utilización como material sensible en sensores en los que el analito sea susceptible de sufrir procesos redox [42]. Las propiedades más relevantes de la ftalocianina de cobre se describen a continuación:

- **Alta estabilidad térmica:** Posee una gran estabilidad térmica debido a la alta conjugación [42]. La ftalocianina de cobre presenta una temperatura de descomposición en un rango entre los 250-600 °C en aire, y puede sublimarse sin descomposición en atmosfera inerte a una temperatura de entre 500-580 °C [41].
- **Semiconductividad:** Las metaloftalocianinas son semiconductores orgánicos tipo p. Su carácter semiconductor se debe a las características de sus múltiples enlaces  $\pi$ , además de la presencia del ion metálico conjugado en el centro del anillo [43].
- **Solubilidad en su forma sustituida:** La CuPc es insoluble en agua, es por ello que para mejorar su solubilidad se le somete a un proceso denominado sulfonación, en el cual se sustituye uno o más anillos periféricos de benceno por un grupo arilsulfónico, obteniendo la ftalocianina tetrasulfónica ácida de cobre, soluble en medios acuosos [41].
- **Resistencia al ataque químico de ácidos y álcalis:** Las ftalocianinas resisten la acción de ácidos no oxidantes y bases. La presencia de oxidantes fuertes en disoluciones acuosas, destruye completamente el anillo de isoindoles [41].
- **Biocompatibilidad:** La CuPc es un compuesto biocompatible y no tóxico [43].
- **Potenciación de la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato en biosensores:** La CuPc propicia la transferencia electrónica entre la enzima y la superficie del biosensor actuando como mediador electrónico. Esta mejora en la transferencia produce un aumento de la sensibilidad cuando se emplea el mediador en biosensores [44].
- **Efecto ampliación del rango de sustratos afines a la enzima:** Se produce un efecto de ampliación de la afinidad de la enzima hacia un elenco mayor de sustratos, propiciando que la enzima presente afinidad por sustratos, que en su disposición sin mediador, no poseía o se veía limitado [44].
- **Absorción en el espectro UV-Vis:** Las ftalocianinas y sus derivados absorben radiaciones en el espectro visible y en el ultravioleta. La ftalocianina de cobre presenta dos bandas en el espectro UV-Vis la banda Q y la banda Soret o B. La banda Q se encuentra entre 620-700 nm y es la responsable de los tonos azules [43]. Se debe a transiciones  $\pi$ - $\pi^*$  desde el orbital ocupado de energía más alta (HOMO) al orbital desocupado de energía más baja (LUMO). La banda B o banda de Soret se encuentra en el ultravioleta y se sitúa a mayores niveles energéticos, entre 300-400 nm, debiéndose también a transiciones  $\pi$ - $\pi^*$  [43].

### 2.2.3.2. Métodos de Inmovilización Enzimática.

La inmovilización es un proceso por el cual las enzimas se depositan sobre un sustrato, pero manteniendo actividad catalítica. La inmovilización introduce cambios en la estructura molecular modificando el comportamiento catalítico y facilitando su reutilización [45].

Los métodos de inmovilización se dividen en físicos (inclusión en geles y fibras o membranas) y químicos (aparición de enlaces covalentes o fuertes entre el soporte y la enzima y fuerzas electrostáticas de enlaces intermoleculares débiles) [45]. Dentro de estos se dividen en cinco grandes grupos como se puede observar de forma esquemática en la Ilustración 14:

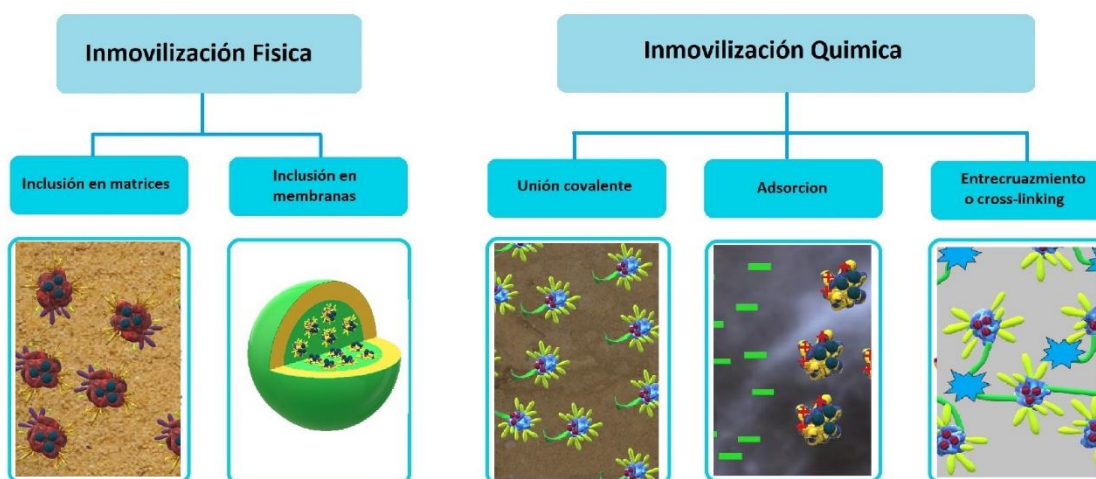


Ilustración 14. Métodos de inmovilización enzimática y clasificación.

La estrategia de inmovilización utilizada en el actual trabajo de fin de grado fue el entrecruzamiento. El procedimiento utilizado consistió en una inmovilización de la enzima sobre un soporte polimérico, para acto seguido, proceder a la aplicación del reactivo de entrecruzamiento. Esta forma de reticulado crea enlaces covalentes entre las enzimas y el polímero, que fija las enzimas al sustrato [45].

La técnica del entrecruzamiento enlaza covalentemente las enzimas mediante la utilización de agentes reticulantes. Los agentes reticulantes son normalmente compuestos bifuncionales, por ejemplo, dialdehídos como el glutaraldehído, que reaccionan con las enzimas y/o el soporte a través de ambos grupos funcionales. Los agentes reticulantes crean enlaces irreversibles que unen las enzimas en un entramado tridimensional [46].



#### 2.2.3.2.1. Cross-Linking mediante chitosán y glutaraldehído.

El entrecruzamiento es un método sencillo, pero no es estable frente a cambios de temperatura y pH. Una forma híbrida de entrecruzamiento es la empleada en el actual trabajo de fin de grado. Esta forma híbrida consiste, en primer lugar, en propiciar la unión enzima-soporte mediante el uso de fuerzas intermoleculares débiles provenientes de un soporte polimérico. A continuación se aplica el agente reticulante para la creación de enlaces covalentes con la enzima [47]. Esta forma híbrida mejora la estabilidad térmica y la resistencia a cambios del pH frente al entrecruzamiento o Cross-linking tradicional [45]. En el presente trabajo se empleó como soporte polimérico el chitosán. Para la obtención de enlaces covalentes, el agente reticulante empleado fue el glutaraldehído.

El agente reticulante empleado, el glutaraldehído, es un compuesto químico de la familia de los aldehídos, líquido a temperatura ambiente, oleaginoso, incoloro o ligeramente amarillento y con un olor penetrante. Químicamente es un compuesto estable y sin riesgo de polimerización. Su nombre químico es 1,5-Pentanodial [48].

El soporte polimérico utilizado, el chitosán, es un compuesto con especial afinidad por moléculas de origen natural, como es el caso de las enzimas. Permite la formación, mediante compuestos intermedios, de estructuras de inmovilización con pocas fugas enzimáticas, además de abiertas, lo que facilita el transporte de materia entre el medio y el polímero [49].

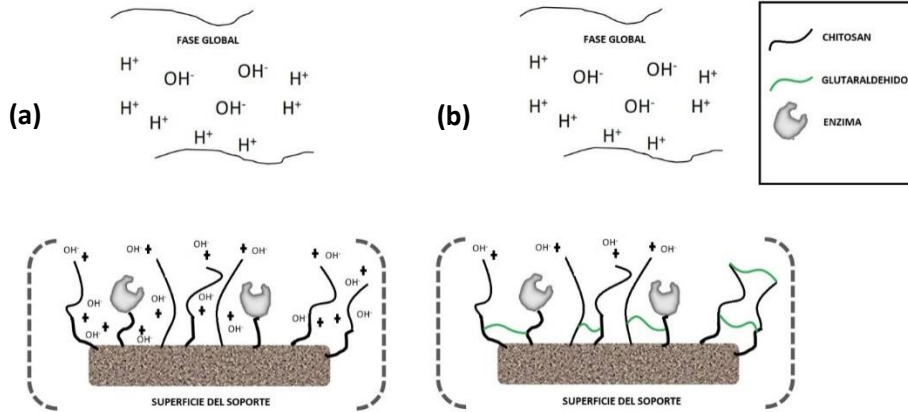
La inmovilización mediante Cross-Linking con chitosan como soporte y glutaraldehído como agente reticulante presenta las siguientes características:

**Facilidad en el transporte de materia entre el medio global y la enzima:** La reticulación con glutaraldehído proporciona una unión de las enzimas al soporte lo suficientemente rígida para el atrapamiento enzimático, pero lo suficientemente abierta para facilitar el transporte de materia entre el medio y la enzima [50].

**Estabilización térmica de las enzimas:** La inmovilización de la enzima por entrecruzamiento introduce enlaces intermoleculares y covalentes que estabilizan térmicamente la enzima, aumentando la consistencia de la estructura de la enzima y permitiendo de esta forma, trabajar a temperaturas superiores, evitando la desnaturalización [46].

**Estabilidad frente al pH:** El carácter policationico del chitosán crea un gradiente de iones OH entre las inmediaciones del soporte de inmovilización formado por el chitosán y la fase global. Este hecho, aumenta el pH la superficie del soporte, desplazando el pH óptimo de la enzima hacia valores menores que los correspondientes a la enzima no inmovilizada [50].

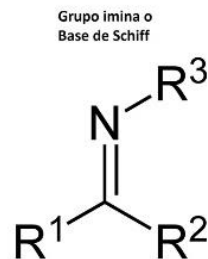




**Ilustración 15. Efecto de las propiedades policatiónicas del quitosán en la modificación del pH local sobre la superficie del soporte. Inmovilización de enzimas con soporte de quitosán (a). Inmovilización de enzimas con soporte de quitosán reticulado con glutaraldehído (b).**

**Retención de capacidad catalítica tras varios ciclos de uso:** La inmovilización mediante Cross-Linking previene la deformación del centro activo y la inutilización de éste en la catálisis. Este efecto se ve fortalecido por el entrecruzamiento con glutaraldehído, debido a la formación de los múltiples enlaces con la enzima [50].

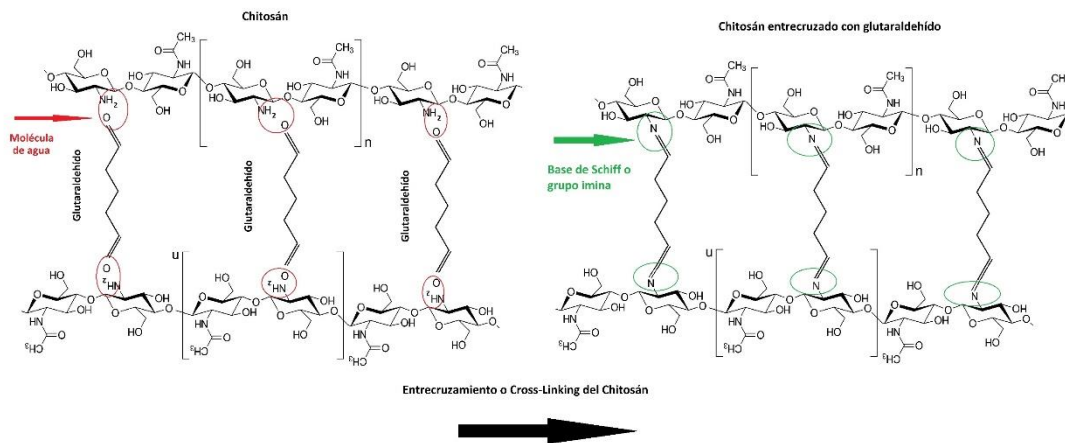
En la reacción de entrecruzamiento entre el quitosán, el glutaraldehído y las enzimas se obtiene como producto final una base de Schiff [51]. Una base de Schiff está compuesta por la estructura mostrada en la Ilustración 16:



**Ilustración 16. Composición de una base de Schiff.**

La base de Schiff que se obtiene del quitosán y la enzima, proviene de la reacción de los grupos aldehído del agente reticulante (glutaraldehído) con los grupos amino del quitosán o de la enzima [52]. La reacción simplificada de obtención de una base de Schiff para dos cadenas de quitosán se puede observar en la Ilustración 17:





**Ilustración 17.** Reacción simplificada de obtención de una base de Schiff entre dos cadenas de chitosán mediante glutaraldehído.

El entrecruzamiento es muy selectivo y no se produce reacción entre los grupos aldehído del glutaraldehído y el grupo hidroxilo del chitosán [50].

### 1.1.1. Técnicas espectroscópicas de caracterización.

#### 1.1.1.1. Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR).

La espectroscopía infrarroja es una técnica muy utilizada en la determinación cualitativa de compuestos orgánicos mediante el análisis de las bandas de absorción características del compuesto bajo estudio. Presenta señales que son características de los enlaces y de las estructuras moleculares de interés [53].

La región infrarroja abarca el espectro comprendido entre la luz visible y la radiación microondas, es decir, desde los 750 nm hasta los  $10^6$  nm [53]:

- **Infrarrojo cercano o próximo:** Se sitúa entre los 750 nm y los 2500 nm. El infrarrojo cercano presenta pocas bandas de absorción características, por lo que no es adecuado para la determinación cualitativa, pero resulta de interés en la determinación cuantitativa cuando otros métodos presentan problemas [53].
- **Infrarrojo medio:** Esta comprendido entre los 2500 nm y los 25000 nm. Su patrón de absorción es característico de cada compuesto, apareciendo bandas características de los grupos funcionales presentes en la molécula, por lo que es ampliamente utilizado para la determinación unívoca de moléculas orgánicas [53].



- **Infrarrojo lejano:** se sitúa entre los 25000 nm y los  $10^6$  nm. El infrarrojo lejano resulta útil para la discriminación de isómeros y de compuestos organometálicos o coordinados [53].

El origen de la absorción de la radiación en el infrarrojo, es la interacción entre la radiación proporcionada por la fuente y los enlaces químicos del compuesto de interés. Los átomos que se sitúan en los extremos de un enlace vibran, si se irradian con la frecuencia adecuada, produciéndose una interacción con el dipolo eléctrico del enlace. Si la frecuencia de la radiación incidente coincide con la frecuencia de vibración mecánica del enlace existirá absorción de la radiación [54].

Existen dos tipos esenciales de vibración: la tensión y la flexión. Dentro de la vibración por tensión existen de dos tipos: simétrica y asimétrica. En cuanto a los modos de flexión existen un total de cuatro: tijereteo, balanceo, aleteo y torsión [53].

La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) se diferencia de la espectroscopía infrarroja en que la primera tiene un montaje característico. El FT-IR presenta un montaje de haz simple que contiene un interferómetro de tipo Michelson situado entre la fuente y la muestra. Además, el espectrofotómetro FT-IR recopila simultáneamente datos en un rango espectral mucho más amplio que el espectrofotómetro dispersivo. El procesamiento de los datos se realiza mediante la denominada transformada de Fourier, que convierte los datos sin procesar dando como resultado el espectro de la muestra [53].

#### **1.1.1.2. Espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis).**

La espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible es la técnica más utilizada para determinaciones cuantitativas mediante la ley de Lambert-Beer. Además, posee algunas (limitadas) utilidades en términos cualitativos con algunos analitos [53].

El ultravioleta se extiende desde los 200 nm a los 400 nm y engloba tres regiones UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (180-280 nm), siendo la primera de ellas donde comienza la región visible [53].

La región visible comprende la región que va desde los 400 nm (color violeta) hasta los 750 nm (color rojo). La distinción entre región visible y ultravioleta es meramente fisiológica, debido a que el ojo humano no es capaz de percibir radiaciones por debajo de los 400 nm [53].

El mecanismo por el cual se absorbe la radiación en el ultravioleta-visible es común en ambas y se debe a la excitación de electrones de las capas externas a niveles de energía

superiores [53]. En la Ilustración 18 se puede observar las transiciones electrónicas que se pueden dar en la espectroscopía UV-Vis:

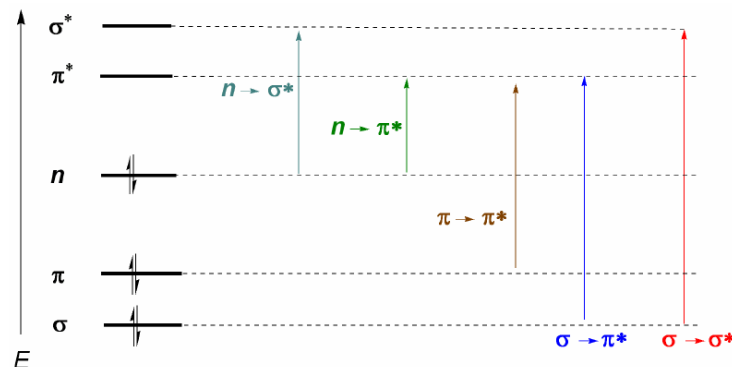


Ilustración 18: Niveles de transición energética en espectroscopía y bandas de absorción en UV-Vis.

Las bandas de absorción que se presentan en el Ultravioleta-Visible son las siguientes:

- **Transiciones  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ :** Se observan entre el ultravioleta extremo y el lejano. Se deben a la transición energética de un orbital molecular enlazante  $\sigma$  a un orbital antienlazante  $\sigma^*$  y tienen un alto nivel de energía [53].
- **Transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$ :** Se deben al salto de un electrón de un par  $n$  de átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o cloro a un orbital molecular antienlazante. Se observan a niveles medios de energía. Se presenta en función de los grupos funcionales a las siguientes longitudes de onda [53]:
  - Los alcoholes se sitúan en torno a 180 nm [53]:.
  - Éteres y derivados halogenados se sitúan en torno a 190 nm [53]:.
  - Aminas en torno de los 220 nm [53].
- **Transiciones  $n \rightarrow \pi^*$ :** Es la transición resultante del salto de un electrón de un orbital molecular no enlazante  $n$ , a un orbital antienlazante  $\pi^*$ . Se presentan cuando existe un heteroátomo con electrones libres en una molécula insaturada. Es una transición de poca intensidad [53].
- **Transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ :** Se presentan en compuestos con doble enlace etilénico aislado. La banda se sitúa en torno a los 170 nm, pero puede variar debido a los sustituyentes y es de alta intensidad [53].

Los niveles vibracionales se ven influenciados con la polaridad del medio en el que se encuentra el analito de interés, un aumento la polaridad provoca una disminución de la resolución en las bandas, y por la temperatura, viéndose favorecida la resolución, generalmente, con la disminución de la temperatura [55].

Se denominan grupos cromóforos a los grupos funcionales responsables de la absorción en la región Ultravioleta-Visible. Los grupos cromóforos presentan una longitud de onda y una absorptividad características [55].



Para la toma de medidas de carácter cuantitativo en espectroscopía UV-Visible se hace uso de la ley de Lambert-Beer. La ley de Lambert-Beer relaciona la absorbancia con tres términos, la absorptividad molar, el camino óptico y la concentración de analito. La relación entre los tres términos se observa en la siguiente ecuación [55]:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Ecuación 5. Ecuación simplificada de la ley de Lambert-Beer.

Siendo [53]:

- **A**: La absorbancia.
- **$\varepsilon$** : La absorptividad molar del analito a medir. Se mide en unidades de  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$  y es característico del analito.
- **b**: El camino óptico, es decir, el espesor de la disolución que atraviesa el rayo incidente en centímetros. Es característico de la cubeta de medición.
- **c**: La concentración molar del analito.

Asimismo, se define la absorbancia como [56]:

$$A = \log\left[\frac{I_0}{I}\right]$$

Ecuación 6. Ecuación de Beer-Lambert.

Siendo [56]:

- **$I_0$** : La intensidad de la radiación incidente en el medio atravesado.
- **I**: La intensidad de la radiación de salida después de atravesar la cubeta.

Aunque la ley de Lambert-Beer es útil, no incluye las posibles desviaciones de la ley, siendo algunas de las cuales el disolvente utilizado, la no idealidad de la disolución (disoluciones no infinitamente diluidas), la influencia de la temperatura y la presencia de interferencias de otros analitos no tenidos en cuenta [56].

### 1.1.2. Técnicas electroquímicas de análisis.

Las técnicas electroquímicas son un conjunto de técnicas en las que se emplea la corriente, el potencial y la carga para aplicaciones analíticas en las que se transforma la energía eléctrica en energía química o viceversa [55].

La ecuación de Nerst relaciona los potenciales eléctricos (también denominadas fuerza electromotriz FEM o potencial electroquímico) con las reacciones químicas que los producen [55].



La transferencia de cargas en una reacción química genera un potencial. Este potencial se puede calcular mediante la ecuación de Nerst que se muestra a continuación [57]:

$$E = E^0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot \mathcal{F}} \cdot \ln[K_{act}]$$

Ecuación 7. Ecuación de Nerst.

Siendo los términos de la ecuación [57]:

- $E$ : Es el potencial electroquímico y se relaciona con la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) mediante la ecuación:

$$\Delta G = -n \cdot \mathcal{F} \cdot E$$

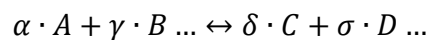
Ecuación 8. Ecuación de la energía libre de Gibbs.

- $E^0$ : Es el potencial estándar, es decir el potencial electroquímico de la reacción cuando esta se produce en condiciones estándar.
- $R$ : Es la constante universal de los gases ideales:

$$R = 8,3145 \text{ J/K} \cdot \text{mol}$$

Ecuación 9. Constante universal de los gases ideales.

- $T$ : Es la temperatura en grados Kelvin.
- $n$ : Es el número de moles de electrones transferidos en la reacción por mol de reactivo.
- $\mathcal{F}$ : Es la constante de Faraday que representa el número de culombios por mol de electrones.  $\mathcal{F} = 96485 \text{ coulombios} \cdot \text{mol}^{-1}$
- $K_{act}$ : Es la constante de equilibrio termodinámica que se corresponde con el potencial electroquímico  $E$  de la ecuación de Nerst.  $K_{act}$  es constante para valores de  $P$ ,  $T$  y  $E$  constantes. Suponiendo la siguiente reacción química:



Ecuación 10. Reacción química general.

- $K_{act}$  se calcula con la siguiente ecuación:

$$K_{act} = \frac{\{A\}^\alpha \cdot \{B\}^\gamma \dots}{\{C\}^\delta \cdot \{D\}^\sigma \dots}$$

Ecuación 11. Constante de equilibrio termodinámica correspondiente con el potencial electroquímico  $E$  de la ecuación de Nerst

- Siendo los sucesivos  $\{A\}$ ,  $\{B\}$ ,  $\{C\}$ ,  $\{D\}$  ... el producto de la concentración molar multiplicada por el coeficiente de actividad de reactivos y productos. Para gases  $\{A\}$ ,  $\{B\}$ ,  $\{C\}$ ,  $\{D\}$ ... se calcula como



el producto de la presión parcial multiplicado por el coeficiente de fugacidad.

Si se sustituyen en la ecuación de Nerst las constantes y la temperatura ( $T=298\text{ K}$ ), además de cambiar el logaritmo neperiano por el logaritmo en base diez se obtiene [55]:

$$E = E^0 - \frac{0,059}{n} \cdot \log[K_{act}]$$

**Ecuación 12. Ecuación de Nerst sustituyendo las constantes y en condiciones normales (temperatura 298 K).**

La ecuación de Nerst se aplica en dos procesos químicos con movimientos de carga [55]:

- Reacciones de oxidación-reducción en las que existe transferencia de electrones (reacciones redox).
- Los procesos de carga iónica por difusión cuando existe gradientes de concentración de cationes y aniones.

Para el análisis de una muestra las medidas se hacen en la denominada celda electrolítica. En la celda electrolítica se transforma una corriente eléctrica o un potencial, que proporciona un equipo, en una reacción de oxidación-reducción. En estas reacciones redox el analito en cuestión sufre transformaciones simultáneas de oxidación y reducción que no sucederían de forma espontánea sin el aporte de energía externa [55]. Las celdas electrolíticas, a diferencia de las celdas galvánicas, no necesitan la separación física y en consecuencia tampoco necesitan un puente salino [55].

El esquema general de una celda electrolítica se puede observar en la Ilustración 19:

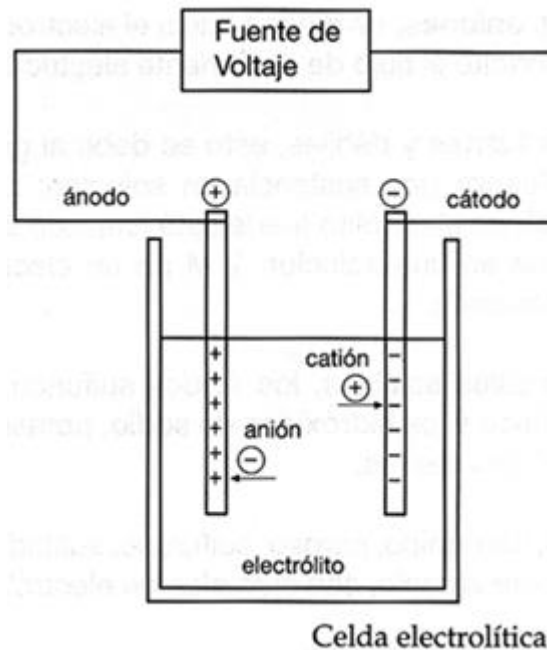


Ilustración 19. Esquema general de una celda electrolítica de dos electrodos.

Existen dos configuraciones de la celda electrolítica, la configuración de dos electrodos y la configuración de tres electrodos. Las celdas electrolíticas formadas por dos electrodos, electrodo de trabajo y electrodo de referencia, permiten medir solamente la diferencia de potencial existente entre los dos electrodos [55].

La configuración de tres electrodos es la más utilizada por permitir la obtención de un valor absoluto del potencial y por permitir la corrección de la resistencia eléctrica derivada del montaje [55]. Los electrodos que componen la configuración de tres electrodos se describen a continuación:

- **Electrodo de trabajo o indicador:** Es el electrodo en el cual se impone una corriente o un potencial que puede ser fijo o variable [57].
- **Electrodo auxiliar o contraelectrodo:** En este electrodo circula una corriente eléctrica que equilibra el flujo de corriente que atraviesa el electrodo de trabajo. Cumple la función de cerrar el circuito formado por los otros dos electrodos. Suele ser una placa de platino rectangular por ser este metal resistente a la corrosión [57].
- **Electrodo de referencia:** Este electrodo tiene un potencial de equilibrio estable y conocido, que permite obtener un potencial absoluto. El electrodo de referencia consta de un elemento de referencia que está colocado en una solución electrolítica. El electrolito debe estar en contacto con el medio a medir, lo que se consigue mediante un diafragma situado en la parte inferior, garantizando así, un flujo de iones a su través. Existen muchos tipos de electrodos de referencia, pero los más comunes son los electrodos de plata-cloruro de plata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) [57].

### 1.1.2.1. Técnicas Voltamperométricas.

En las técnicas voltamperométricas se aporta la energía necesaria para que se lleve a cabo un proceso redox. La celda electrolítica usada es la celda de tres electrodos [55].

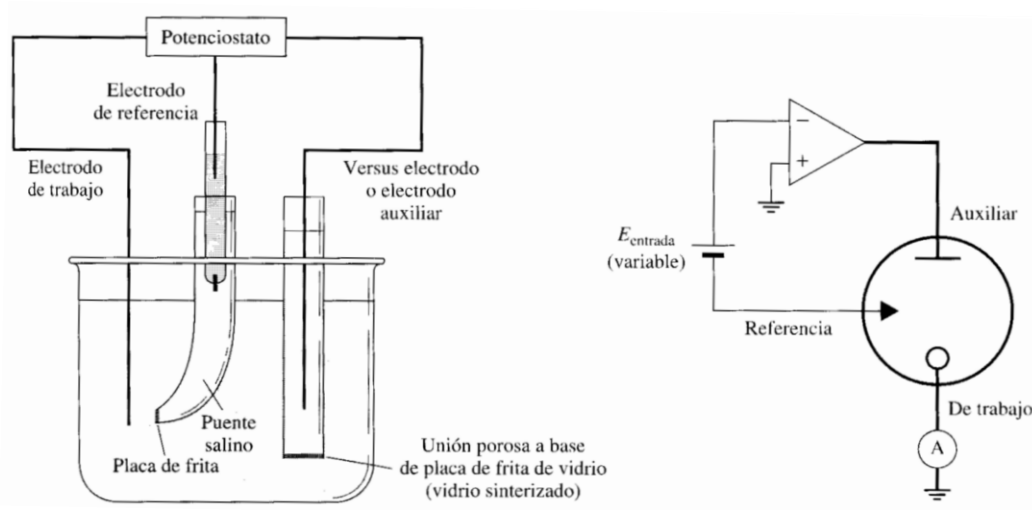


Ilustración 20. Celda electrolítica de tres electrodos y configuración eléctrica simplificada de un potenciostato.

En voltamperometría se aplica un potencial variable entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, en el cual se produce la reacción de oxidación-reducción. El proceso de oxidación-reducción se produce a unos potenciales que son característicos de la especie química analizada. Cuando una especie química se oxida o se reduce en el electrodo de trabajo se produce un crecimiento brusco de la corriente que circula por electrodo [55]. Para que no transite corriente alguna por el electrodo de referencia se utiliza un tercer electrodo denominado electrodo auxiliar o contraelectrodo. El electrodo auxiliar está constituido normalmente por un metal noble, comúnmente platino, y cierra una configuración que permite obviar los cambios en la resistencia y en la polarización producidos por la concentración del analito en la celda [55].

En las voltametrías de tres electrodos al electrodo de trabajo se le impone un potencial que es comparado con los otros dos electrodos, el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia. La medida del potencial requiere un flujo de corriente mínimo entre el electrodo de trabajo y el de referencia [57].



### 1.1.2.1.1. Voltamperometría cíclica.

En la voltametría cíclica se emplea un barrido de potencial con una mayor velocidad de barrido que en el resto de voltamperometrías para hacer una búsqueda de especies electroactivas en una disolución compleja [55].

El barrido de potencial en voltamperometría cíclica se realiza en dos direcciones. La velocidad de barrido es primero positiva y luego negativa para cada ciclo, pero con un mismo valor absoluto de la velocidad de barrido [55].

La forma de los voltamogramas obtenidos y el barrido más comúnmente utilizado, el triangular, se muestran en la Ilustración 21 y en la Ilustración 22 respectivamente [55]:

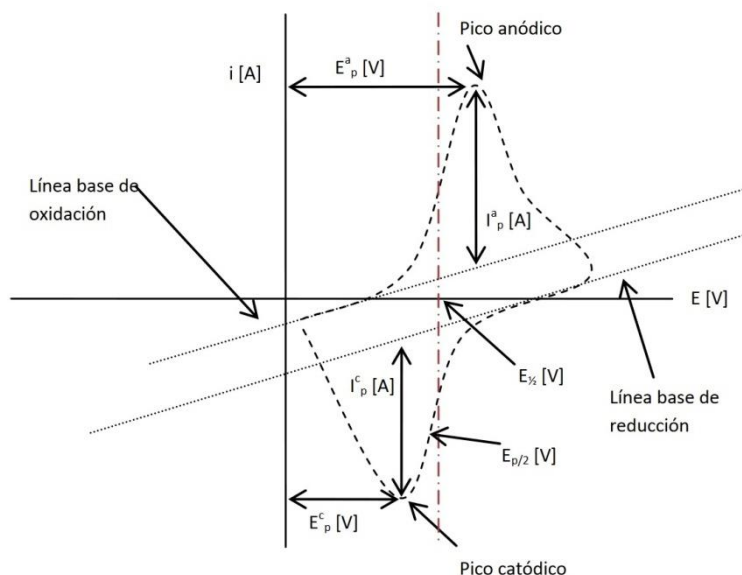


Ilustración 21. Principales magnitudes de un voltamograma en voltamperometría cíclica.

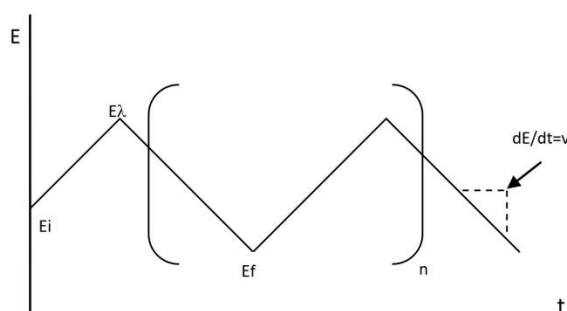


Ilustración 22. Barrido triangular con n ciclos.

El convenio utilizado (el contrario al que se usa en poligrafía) indica que el potencial más positivo se representa hacia la derecha y el más negativo hacia la izquierda [57].



En el pico situado a un potencial más negativo se pueden observar los potenciales y las intensidades catódicas (reductoras),  $E_p^c$  e  $I_p^c$  respectivamente. Asimismo, En el pico situado a un potencial más positivo se observan los potenciales y las intensidades anódicas (oxidantes),  $E_p^a$  e  $I_p^a$  respectivamente [55].

Las intensidades en un voltamograma se obtienen tomando la magnitud hasta la línea base o residual. Las intensidades de los picos son la magnitud con la que se relaciona la concentración de la especie química que se oxida o reduce [55].

Para una reacción de reducción-oxidación reversible, y siendo  $n$  el número de electrones transferidos, se cumple que [58]:

$$E_p^a - E_p^c = \frac{0,059}{n}$$

**Ecuación 13. Ecuación de Nerst sustituyendo las constantes y en condiciones normales (temperatura 298 K) en la superficie del electrodo.**

Esta ecuación se cumple únicamente para reacciones redox reversibles debido a que son lo suficientemente rápidas para mantener la concentración de reactivo y producto constantes en la superficie del electrodo [57]. La ecuación anterior permite con un solo voltamograma determinar el número de electrones transferidos, estableciendo un límite inferior, el de la reacción reversible, para la diferencia de potenciales de los picos catódicos y anódicos [58].

Además se tiene que, para una reacción reversible, el potencial formal,  $E^0$ , se obtiene de la media entre los potenciales catódico y anódico [58]:

$$E^0 = \frac{E_p^a + E_p^c}{2}$$

**Ecuación 14. Potencial formal para reacciones reversibles obtenido de la ecuación de Nerst.**

Para reacciones redox reversibles, las corrientes de pico dependen de un gran número de variables que permiten obtener datos cuantitativos importantes de la especie química de análisis. En las reacciones reversibles las intensidades de pico se rigen mediante la ecuación de Randles-Sevcik que se muestra a continuación [58]:

$$i_p = 0,4463 \cdot \left( \frac{F^3}{R \cdot T} \right)^{1/2} \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot \vartheta^{1/2}$$

**Ecuación 15. Ecuación de Randles-Sevcik para las intensidades de pico en reacciones reversibles.**

$$i_p = \{2,69 \cdot 10^5\} \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot \vartheta^{1/2} \text{ para una temperatura de } T = 25^\circ\text{C}$$

**Ecuación 16. Ecuación de Randles-Sevcik para las intensidades de pico en reacciones reversibles con las constantes  $F$ ,  $R$  y  $T$  (298 K) sustituidas.**



Siendo:

- $i_p$ : Intensidad de corriente de pico en A.
- n: Número de electrones transferidos en el proceso redox.
- A: Área superficial del electrodo en  $cm^2$
- F: Constante de Faraday en  $C/mol$
- D: Coeficiente de difusión en  $cm^2/s$
- C: Concentración en  $mol/cm^3$
- $\vartheta$ : Velocidad de barrido en  $V/s$
- R: Constante de los gases ideales en  $J/mol \cdot K$
- T: La temperatura en K.

Para reacciones irreversibles se realiza una corrección en la ecuación de Randles-Sevcik para los términos cinéticos y la ecuación pasa a ser la siguiente para una temperatura de 25°C [58]:

$$i_p = \{2,99 \cdot 10^5\} \cdot \alpha^{1/2} \cdot n \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot \vartheta^{1/2}$$

**Ecuación 17. Ecuación de Randles-Sevcik para las intensidades de pico en reacciones irreversibles con las constantes F, R y T (298 K) sustituidas.**

Donde la única nueva variable es  $\alpha$ , que es el coeficiente de transferencia.

Un criterio experimental simple para comprobar la reversibilidad de un sistema, consiste en modificar alguna de las variables conocidas de la ecuación anterior, como por ejemplo la concentración de analito o la velocidad de barrido, y determinar un cociente entre las intensidades de pico de oxidación y reducción. Si este cociente es 1 la reacción es reversible [58].

En los sistemas irreversibles los picos, tanto catódico como anódico, dependen de la velocidad de barrido, es decir, del cambio de potencial en función del tiempo [58].

El potencial de pico se obtiene con la siguiente ecuación para sistemas irreversibles [58]:

$$E_p = E^0 - \frac{R \cdot T}{\alpha \cdot F \cdot n} \cdot \left[ 0.780 + \ln \left( \frac{D^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left( \frac{\alpha \cdot F \cdot \vartheta}{R \cdot T} \right)^{1/2} \right]$$

**Ecuación 18. Potencial de pico para un proceso irreversible.**

Siendo:

- n: Número de electrones transferidos en el proceso redox
- F: Constante de Faraday en  $C/mol$



- D: Coeficiente de difusión en  $cm^2/s$
- $\vartheta$ : Velocidad de barrido en  $V/s$
- R: Constante de los gases ideales en  $J/mol \cdot K$
- T: La temperatura en K
- $E^0$ : El potencial normal de la especie
- $\alpha$ : El coeficiente de transferencia
- $k^0$ : La constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones

#### 1.1.2.1.2. Cronoamperometría.

La cronoamperometría es una técnica electroanalítica en la que se impone un potencial fijo, característico de la especie a analizar, adicionado saltos de concentración en función del tiempo. [59].

Partiendo de una disolución en la que no hay reacción electroquímica, se aplica un potencial fijo, en el cual tiene lugar un proceso de oxidación o reducción del analito. A continuación, se introducen saltos de concentración en cantidades conocidas sobre la disolución. Entre cada salto de concentración se requiere un tiempo de estabilización con agitación intermedia hasta alcanzar un valor de la corriente estacionario [57]. Con el salto, la nueva concentración del analito no puede coexistir en la superficie del electrodo, por ser la cinética del proceso redox muy rápida, reduciéndose u oxidándose casi instantáneamente [57]. La cinética del proceso es rápida debido a que el potencial inicialmente impuesto a la disolución es el potencial anódico o catódico, en el cual la especie de interés se reduce o se oxida [64].

La respuesta a la perturbación una función del tiempo se obtiene mediante la ecuación de Cottrell. La ecuación de Cottrell permite obtener la intensidad de corriente que circula por el electrodo como una función del tiempo. Para electrodos planos (aunque es fácilmente extrapolable a otro tipo de geometrías), la ecuación de Cottrell presenta la siguiente forma [57], [59]:

$$i(t) = \frac{n \cdot F \cdot A \cdot C_{0x} \cdot D_{0x}^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}} \cdot t^{\frac{1}{2}}}$$

Ecuación 19. Ecuación Cottrell para electrodos planos.

Siendo:

- n: Número de electrones transferidos en el proceso redox.



- F: Constante de Faraday en  $C/mol$
- $C_{0x}$ : Concentración inicial en  $mol/cm^3$
- $D_{0x}$ : Coeficiente de difusión inicial en  $cm^2/s$
- A: Área superficial del electrodo en  $cm^2$
- t: El tiempo en s.

La cronoamperometría permite calcular los límites de detección (LOD) y la sensibilidad en la detección de las especies electroquímicas de interés [60]. Si se realizan una serie de saltos de concentración en una disolución, con un tiempo igual y suficiente para la estabilización de la corriente (para que la concentración en la superficie del electrodo sea nula) se obtiene una recta representando la corriente en función de la concentración donde la sensibilidad analítica se obtiene a partir de la pendiente [61].

El LOD se define como la menor cantidad de analito que puede ser distinguida del ruido o, como la mínima cantidad de analito que puede ser discriminada de la medida obtenida del blanco (muestra que tiene los mismos pretratamientos pero que no contiene analito) [60]. El límite de detección se obtiene con la siguiente ecuación [60]:

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{m}$$

Ecuación 20. Ecuación del Límite de detección.

Siendo [60]:

- m: La pendiente de la recta obtenida de la cronoamperometría, es decir, la sensibilidad analítica.
- $\sigma$ : La desviación estándar de las medidas del blanco.

### 1.1.3. Especies electroactivas estudiadas: Difenoles.

Los compuestos fenólicos, son sustancias que contienen en su estructura algún derivado del hidroxibenceno, comúnmente denominado fenol [11]. Son compuestos que derivan de las plantas y son metabolitos secundarios de éstas [11]. Las plantas los emplean normalmente como antifúngicos, antibacterianos o pigmentos [9]. Presentan un carácter antioxidante pasivo, es decir, se oxidan evitando de esta forma la oxidación de otros compuestos. La oxidación de los fenoles da como resultado las quinonas. Además, los fenoles son indicadores de las buenas propiedades organolépticas de los alimentos [62].

Los fenoles se pueden clasificar según el número de grupos –OH del anillo bencénico [63]:

- Monofenoles: Compuestos por un único grupo –OH.

- Difenoles: Compuestos por dos grupos –OH.
- Trifenoles: Compuestos por tres grupos –OH.

Los difenoles a su vez se pueden clasificar según la posición relativa de los grupos –OH en el anillo bencénico:

- Ortofenol diol: Presenta los grupos –OH en posición orto.
- Metafenol diol: Presenta los grupos –OH en posición meta.
- Parafenol diol: Presenta los grupos –OH en posición para.

Las distintas configuraciones de los grupos –OH de los difenoles se pueden observar a continuación en la Ilustración 23:

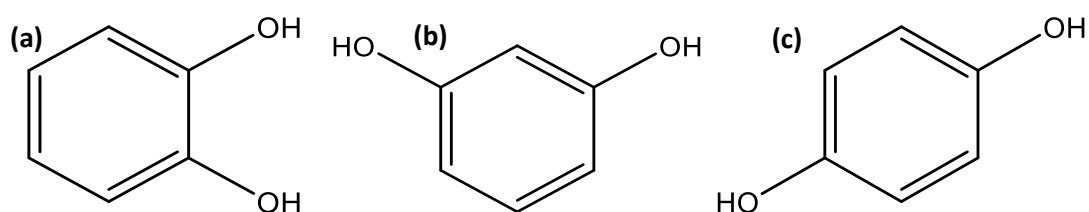


Ilustración 23. Diferentes configuraciones de los grupos –OH de los difenoles. Ortofenol (a). Metafenol (b). Parafenol (c).

Los fenoles simples se presentan como sólidos con forma de cristales incoloros a temperatura ambiente. Presentan un bajo punto de fusión, pero un alto punto de ebullición debido a la formación de puentes de hidrógeno [28]. Son fácilmente oxidables en condiciones de luminosidad, presencia de oxígeno ambiental y/o presencia de impurezas metálicas. La oxidación de fenoles provoca la coloración de los compuestos por la formación de las quinonas correspondientes [28].

La solubilidad en medios acuosos de los fenoles es variable y depende de la disposición de los grupos –OH, pero disminuye cuanto más sustituido se encuentre este [28].

Un hecho diferencial de los fenoles con respecto al resto de alcoholes, es que presentan un ligero carácter ácido por la deslocalización de carga en el anillo bencénico. El carácter ácido de los fenoles se ve disminuido por la presencia de sustituyentes donadores como compuestos alifáticos [28].

Los compuestos empleados en el actual trabajo de fin de grado son el 1,2-dihidroxibenceno denominado catecol o pirocatecol y el 1,4-dihidroxibenceno denominado hidroquinona.

### 1.1.3.1. Catecol.

El catecol también denominado pirocatecol o 1,2- dihidroxibenceno, es un compuesto orgánico con fórmula  $C_6H_4(OH)_2$  y es la configuración orto del benzenodiol. Se presenta a temperatura ambiente como un sólido cristalino de color blanco [64]. Se encuentra comúnmente en forma de trazas en productos de origen vegetal [63]. La masa molecular del catecol es 110,1 g/mol, su densidad es 1,34 g/cm<sup>3</sup> y tiene una solubilidad de 43 g/100 ml de agua a temperatura ambiente [64]. Tiene un punto de ebullición 245.5°C, un punto de fusión de 105°C y su temperatura de autoignición es 510°C [64]. La estructura del catecol se puede observar en la Ilustración 24:

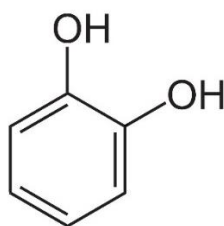


Ilustración 24. Estructura del catecol.

El catecol se puede encontrar en múltiples alimentos del reino vegetal, destacando entre otros el cacao, el té, los arándanos y el vino. Presenta un efecto astringente en la boca después de su ingesta. Es un compuesto bioactivo y antioxidante. Se ha relacionado su consumo con la reducción de la trombosis arterial, con una actividad anti-inflamatoria y con la reducción del colesterol como parte de su capacidad antioxidante [10].

Se emplea fundamentalmente en la síntesis de pesticidas, cosméticos y medicamentos. Su otro uso es como antioxidante en industrias del caucho, colorantes, grasas y aceites [62].

La oxidación completa del catecol produce 1,2 benzoquinona, un compuesto inestable de color rojo. La inestabilidad de la 1,2 benzoquinona se debe a su alta reactividad, ya que, este compuesto forma polímeros de color marrón [62]. La reacción de oxidación del catecol se inicia en presencia de oxígeno atmosférico o en disolución acuosa, viéndose también influenciada también por otros factores como la presencia de oxidantes o de la luz natural [62]. La oxidación del catecol para obtener 1,2 benzoquinina se puede observar en la Ilustración 25:

Reacción de Oxidación de catecol a orto-benzoquinona

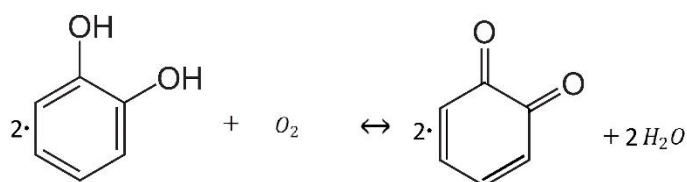


Ilustración 25. Reacción de oxidación del catecol para obtener orto- benzoquinona.

### 1.1.3.2. Hidroquinona.

La hidroquinona, 1,4-benzenodiol o p-dihidroxibenceno, es un compuesto orgánico con fórmula  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$  que es la configuración para- del benzenodiol [64]. Se presenta a temperatura ambiente como un sólido cristalino y pulverulento de color blanco y sin olor [64]. De la misma forma que el catecol, la hidroquinona se encuentra en forma de trazas en productos de origen vegetal [63]. Su masa molecular es la misma que la del catecol, su densidad es un poco inferior de  $1,32 \text{ g/cm}^3$  y tiene una solubilidad de  $5,9 \text{ g/100 ml}$  de agua a temperatura ambiente. Tiene un punto de ebullición de  $287^\circ\text{C}$ , un punto de fusión de  $172^\circ\text{C}$  y su temperatura de autoignición es  $515^\circ\text{C}$ . La estructura de la hidroquinona se puede observar en la Ilustración 26:

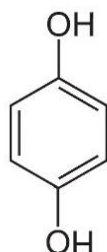


Ilustración 26. Estructura de la hidroquinona.

Se utiliza como materia prima en la fabricación de colorantes, cosméticos para la piel y para el revelado fotográfico [62].

La oxidación completa de la hidroquinona produce 1,4 benzoquinona, un compuesto estable de carácter oxidante suave [62]. La reacción de oxidación de la hidroquinona se inicia en presencia de oxígeno o en presencia de peróxido de hidrógeno [62]. La oxidación de la hidroquinona para obtener 1,4 benzoquinona se puede observar en la Ilustración 27:





Reacción de Oxidación de hidroquinona a para-benzoquinona

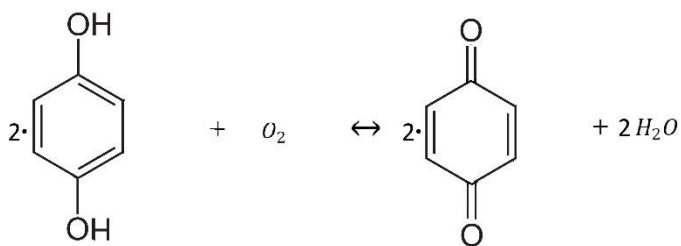


Ilustración 27. Reacción de oxidación de la hidroquinona para obtener para- benzoquinona.



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## *Capítulo III*

### *Reactivos, materiales y equipos empleados.*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



### 3. Reactivos, materiales y equipos empleados.

#### 3.1. Reactivos.

- Chitosán (Chi) (Grado de desacetilación 75-85%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9012-76-4).
- Ácido acético glaciar para análisis -ACS-ISO ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pureza mínima 99,7%, Panreac, CAS Number: 6131-90-4).
- Agua desionizada Milli-Q de conductividad 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ .
- Dihidrogenofosfato sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pureza mínima 99%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-79-4).
- Hidrogenofosfato sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pureza mínima 99%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-80-7).
- Glutaraldehído ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ , 50% en disolución acuosa, Alta Aesar, CAS Number: 111-30-8).
- Ftalocianina de cobre tetrasulfonada (CuPc) ( $\text{C}_{32}\text{H}_{12}\text{CuN}_8\text{O}_{12}\text{S}_4 \cdot 4\text{Na}$ , contenido de tinte 85%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 123439-80-5).
- Lacasa (LAC) (Obtenida del hongo *Trametes versicolor*, Actividad enzimática mínima 10 U/mg. Solido. Sigma-Aldrich, CAS Number: 80498-15-3)
- Tirosinasa (TIR) (Obtenida del hongo *Agaricus bisporus*, Actividad enzimática mínima 1000 U/mg. Solido. Sigma-Aldrich, CAS Number: 9002-10-2)
- Ácido tetracloroáurico trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , pureza mínima 99.995%, grado de hidratación  $\cong 3$ , Sigma-Aldrich, CAS Number: 27988-77-8)
- Citrato de sodio dihidratado ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pureza mínima 99%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 6132-04-3).
- Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , pureza mínima 99%, QUALITY CHEMICALS, CAS Number: 67-64-1)
- Catecol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ , pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich).
- Hidroquinona ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ , pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich).

#### 3.2. Materiales.

- Contraelectrodo placa de platino (2 cm x 1 cm)
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl, 3M Nesslab).
- Sustrato de ITO (Óxido de estaño e indio).
- Sustrato de cuarzo.
- Sustrato de sulfuro de zinc (Cleartran ZnS, Disc. 32 x 2mm, Spectra-Tech Inc).
- Celda electroquímica (50 mL, Princeton Applied Research).



- Laca de plata electrolube SCPC3P.

### 3.3. Equipos.

- Espectrofotómetro modelo FT/IR 6600 (Jasco Corporation, Japón).
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japón).
- ND-R 11/2 Rotary Dip Coater (Nadetech Innovations, España).
- pHmetro (Crison, España).
- Potenciostato/Galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research).
- Ultrasonidos Vortex 3 (IKA, USA).



# *Capítulo IV*

## *Metodología y desarrollo del experimental.*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES





## 4. Metodología y desarrollo del experimental.

### 4.1. Sensores enzimáticos nanoestructurados: Desarrollo y caracterización.

La primera fase de la construcción de los biosensores fue depositar las películas nanoestructuradas, para ello el primer paso, fue la preparación las disoluciones para la ejecución de la técnica Layer by Layer. Algunas de las disoluciones se prepararon directamente, en cambio, otras precisaron previamente de la preparación de una disolución madre. Además, hubo que sintetizar las nanopartículas de oro para su incorporación en el sensor.

Con los materiales preparados, se procedió a depositar las capas mediante la técnica Layer by Layer. Esta técnica construye la nanoestructura del sensor que servirá de base para la obtención del biosensor. La correcta adsorción de las sucesivas capas de los distintos materiales se evaluó mediante espectroscopía infrarroja FT-IR y espectroscopía de absorción ultravioleta-visible.

Posteriormente se depositó la enzima en la superficie del sensor para la obtención del biosensor. Con el fin de inmovilizar la enzima, hubo que realizar un entrecruzamiento con glutaraldehído, en unas condiciones de reproducibilidad para los tiempos y la concentración que permitan la extrapolación de resultados.

#### 4.1.1. Preparación de disoluciones.

En el presente trabajo se han empleado las siguientes disoluciones, enzimas y nanopartículas para elaboración de los biosensores enzimáticos.

##### *Ácido acético (HAc).*

Se preparó una disolución madre de ácido acético (HAc) con una concentración de porcentaje en volumen de un 3%. Para obtener la concentración deseada se añadieron 1,5 mL de ácido acético puro en un matraz de 50 mL enrasando con agua desionizada Milli-Q hasta completar el volumen.

A partir de ella, se preparó una disolución de ácido acético con una concentración de 0,3 % v/v, que se obtuvo llevando 5 mL de la disolución madre de HAc a un matraz aforado de 50 mL, enrasando con agua desionizada Milli-Q hasta completar el volumen.



### *Ftalocianina de cobre tetrasulfonada (CuPc).*

La concentración de la disolución madre de ftalocianina de cobre (CuPc) a obtener fue de  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M. Para conseguirlo se disolvieron 6,16 mg de ftalocianina de cobre tetrasulfonada en un matraz aforado de 25 mL enrasando con agua desionizada Milli-Q hasta completar su volumen.

A partir de ella se preparó una disolución de ftalocianina de cobre de  $5 \cdot 10^{-5}$  M que se obtuvo tomando un volumen de 5 mL de disolución madre y llevándola a un matraz aforado de 25 mL, enrasando con agua desionizada Milli-Q. hasta completar el volumen.

### *Ácido tetracloroáurico trihidratado.*

La disolución madre de ácido cloroáurico presentaba una concentración de 2,5 mM. Para conseguir la concentración deseada se pesaron 0,04923 g y se disolvieron en un matraz aforado de 50 mL con agua desionizada Milli-Q hasta completar el volumen.

A partir de ella se preparó una disolución hija con una concentración de 0.25 mM. Para ello se llevaron 5 mL de disolución madre en un matraz aforado de 50 mL, enrasando con agua desionizada Milli-Q hasta completar el volumen.

### *Citrato trisódico dihidratado.*

Se obtuvo una concentración de citrato de trisodio de 17 mM. Para ello se pesaron 0,025 g de citrato de trisodio y se llevaron a un matraz aforado de 5 mL completando hasta enrase con agua desionizada Milli-Q.

### *Chitosán (Chi).*

Se preparó una disolución de chitosán con una concentración de 1 mg/mL, para obtenerla se pesaron 25 mg de chitosán y se llevaron a un matraz aforado de 25 mL enrasando con la disolución de ácido acético del 0,3 % v/v.

### *Preparación de tampón fosfato pH 7.*

Para la preparación de tampón fosfato pH 7 de concentración 0,01 M se pesaron 0,7318 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 0,5393 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Las sales se disolvieron en agua desionizada Milli-Q, vertiendo el contenido en un matraz aforado de 1 L y llevándolo a enrase.



Las disoluciones se prepararon de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch que se presenta a continuación:

$$pH = pKa + \frac{[Na_2HPO_4]}{[NaH_2PO_4]}$$

**Ecuación 21. Ecuación de Henderson-Hasselbalch para la obtención de disolución tampón fosfato pH 7.**

Siendo:

- $pKa = 6,8$ .

### ***Glutaraldehído.***

La concentración de glutaraldehído para el Cross-Linking con las enzimas debe ser del 2,5% w/w. Se empleó un glutaraldehído comercial que está en disolución acuosa del 50 % w/w. Para conseguir la concentración requerida se disolvieron 4,4524 mL en tampón fosfato pH 7 hasta completar el volumen de un matraz de 100 mL.

### ***Catecol.***

Para obtener una concentración de  $10^{-4}$  M del fenol se pesaron 0,0022 g y se llevaron a un matraz aforado de 200 mL enrasado con la disolución tampón fosfato pH 7 0,01 M hasta completar el volumen.

### ***Hidroquinona.***

Para obtener una concentración de  $10^{-4}$  M de hidroquinona se pesaron 0,0022 g y se llevaron a un matraz aforado de 200 mL enrasado con la disolución tampón fosfato pH 7 0,01 M hasta completar el volumen.

### ***Síntesis de las nanopartículas de oro (AuNPs).***

Para la síntesis de nanopartículas de oro resulta de especial relevancia la limpieza del material. Una vez limpio y seco el material, se comienza con la síntesis. Se tomaron 25 mL de disolución 0.25 mM de ácido tetracloroáurico trihidratado y se llevaron a un matraz Erlenmeyer con un agitador en su interior, a continuación, se activó la agitación a 150 rpm y la resistencia térmica de la placa se ajustó a 150 °C.

Cuando comenzó la ebullición de la disolución se tomó un volumen de 180  $\mu\text{L}$  de la disolución de citrato trisódico y se adiciono gota a gota. Cuando se terminó con la adición, se dejó un tiempo de reacción de 20 minutos, añadiendo agua desionizada Milli-Q gota a gota para mantener el volumen constante.

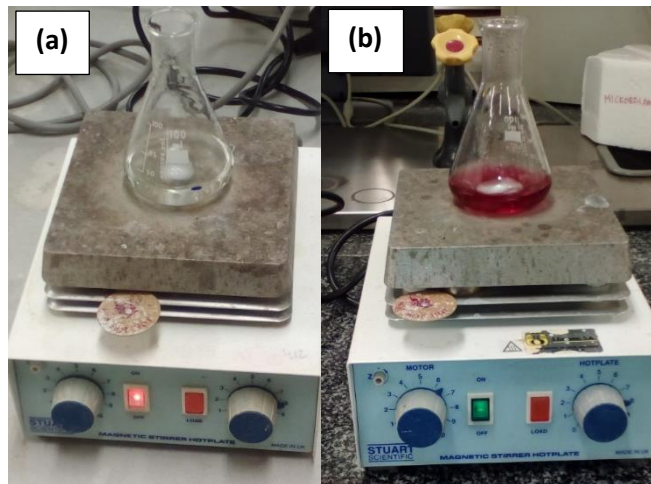


Ilustración 28. Síntesis de Turkevich/Frens para obtener nanopartículas de oro. (a) Antes de la adición el citrato de sodio dihidratado. (b) Pasados 10 minutos tras la adición del citrato de sodio dihidratado.

### *Lacasa y tirosinasa.*

Se pesaron 5 mg de enzima lacasa de *trametes versicolor* o de tirosinasa de *Agaricus bisporus* y se disolvieron en un volumen de 1 ml de tampón fosfato pH 7 para obtener una concentración de 5 mg/mL.

#### 4.1.2. Desarrollo de los sensores.

Los sensores del actual trabajo de fin de grado se han construido en primer lugar, con una nanoestructura que utiliza tres materiales, empleando para ello la técnica LbL: chitosán, que facilita la inmovilización enzimática, ftalocianina de cobre, que favorece la transferencia electrónica y las nanopartículas de oro, que aumentan el área superficial del sensor y mejoran la transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo.

La construcción de la nanoestructura se ha realizado con la ayuda de un equipo LbL automático, que permite depositar monocapas alternas por inmersión. Mediante el software del equipo se imponen parámetros tales como tiempos de inmersión, espera, secado, velocidad de ascenso etc. Puesto que se ha realizado un estudio de la configuración de la nanoestructura y para la extrapolación de resultados, los parámetros se han mantenido constantes.

#### 4.1.2.1. Nanoestructura del sensor: Técnica Layer by Layer.

En la construcción del sensor se depositaron capas con signo alterno. Además, hubo que tener en cuenta que, entre cada inmersión, se requiere un lavado para eliminar el exceso de catión/anión. El lavado se realizó con agua desionizada Milli-Q. Para el montaje del portaplasas se tomaron dos sustratos de ITO y se limpiaron, primero con acetona y después con agua destilada. A continuación, se dispusieron los sustratos con su parte conductora hacia el exterior y se atornillaron al portaplasas. Después se pasó a la configuración de los parámetros. El software del equipo conto con los parámetros mostrados en la Ilustración 29:

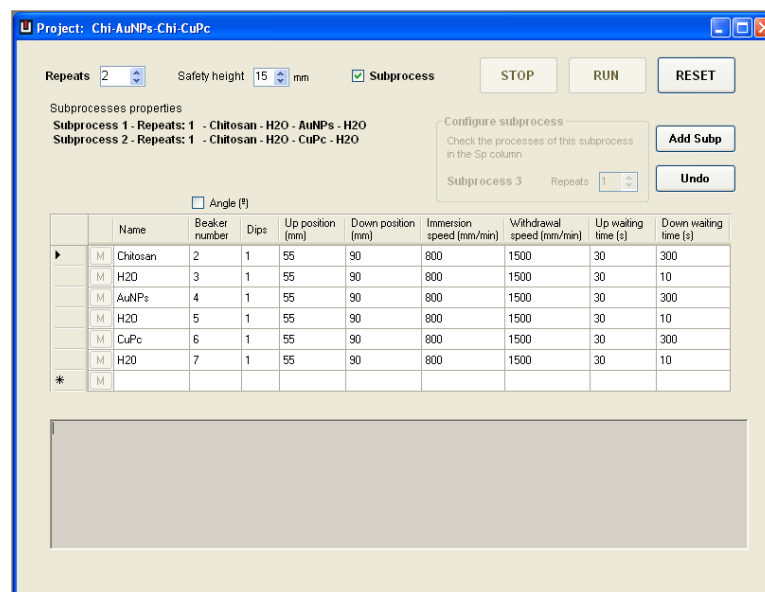


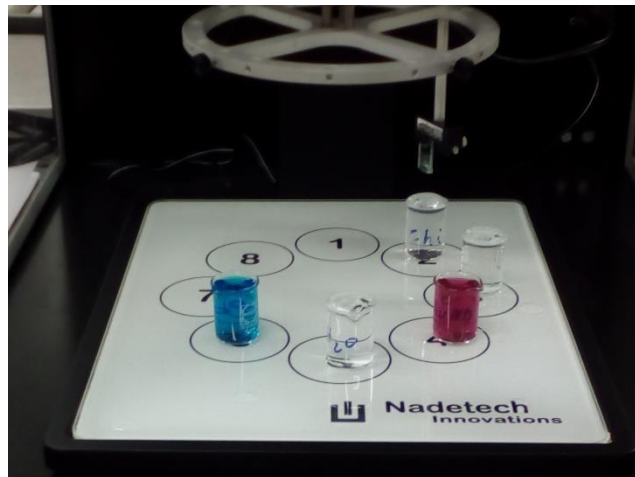
Ilustración 29. Parámetros de configuración del procedimiento para el equipo de recubrimiento por inmersión rotativa ND-R 11/2 Rotary Dip Coater.

Los parámetros principales que determinan el proceso son los siguientes:

- Stop: Detiene el proceso.
- Pause: Pausa el proceso.
- Reset: Reinicia el equipo.
- Add Subp: Añade un subprocesso.
- Undo: deshace la última acción.
- Name: Nombre de la inmersión.
- Beaker Number: Indica el número de la posición de la disolución en el equipo.
- Up position (mm): Posición superior del portaplasas en mm.
- Down position (mm): Posición inferior del portaplasas en mm.
- Immersion speed (mm/min): Velocidad de inmersión.
- Withdrawal speed (mm/min): Velocidad de retirada.
- Up waiting time (s): Tiempo hasta el tiempo de espera.

- Down waiting time (s): Tiempo desde el tiempo de espera o tiempo de inmersión.
- Repeats: Indica el número de repeticiones de todo el proceso.

Configurados los parámetros se inició el proceso, poniendo cuidado en la correcta ejecución del procedimiento. El montaje característico del equipo utilizado se puede observar en la Ilustración 30:



**Ilustración 30.** Montaje característico del equipo ND-R 11/2 Rotary Dip Coater para la obtención de sensores nanoestructurados.

Una vez finalizado, se sumergieron los electrodos en la disolución tampón fosfato pH 7 durante 2 minutos para acondicionar el pH del sensor antes de la inmovilización de la enzima, dejándose a continuación secar al aire. Una vez secos, se usó la laca de plata para recubrir el sensor por la cara conductora superior, garantizando de esta forma un buen contacto del sensor. Cuando la laca se secó se pasó a la siguiente etapa, la obtención del biosensor.

#### **4.1.2.2. Obtención del biosensor: Inmovilización enzimática.**

El primer paso para la elaboración del biosensor es adecuar el pH del sensor para la posterior inmovilización. Para ello se sumergió el sensor nanoestructurado en la disolución tampón fosfato pH 7 durante 2 minutos. Cuando el sensor estuvo seco se depositaron 50  $\mu$ L de la solución con la enzima a lo largo de toda la parte conductora del sustrato modificado, previamente, con las películas mediante LBL. Se dejó secar la solución enzimática del sensor al aire a temperatura ambiente. Una vez seco, se adecuó el pH del sensor mediante una inmersión en la disolución tampón fosfato pH 7 durante 30 segundos. Como último paso se procedió a la inmovilización de la enzima mediante inmersión en vapores o directamente en glutaraldehído.



Para la inmersión directa, se sumergieron los biosensores durante 5 minutos en el glutaraldehído 2,5% w/w. Para la inmersión en vapores de glutaraldehído se sometió a los biosensores, durante un periodo de 20 minutos, a vapores de glutaraldehído 2,5% w/w.

#### 4.1.3. Parámetros de caracterización: Crecimiento de las monocapas.

La caracterización de los sensores se ha llevado a cabo mediante dos técnicas de caracterización complementarias, la espectroscopía UV-Vis y la espectroscopía FTIR.

##### 4.1.3.1. *Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR).*

Para la caracterización por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, se siguió el mismo protocolo de crecimiento de capas mediante LBL, pero sobre un sustrato de sulfuro de zinc.

Una vez obtenida la línea base se registró el espectro proporcionado por el sustrato modificado con las películas, que es característico la nanoestructura del sensor y del número de capas depositadas sobre sustrato. Cuando se finalizó el registro del espectro se repitió el proceso de crecimiento de un número de capas creciente y constante, y se caracterizó de nuevo respetando los parámetros indicados.

Se realizaron los espectros de absorción para 4, 8, 12, 16, 20 y 24 capas. El rango de longitudes de onda empleado para los escaneos estuvo en un intervalo de números de onda comprendido entre los  $2000\text{ cm}^{-1}$  y los  $800\text{ cm}^{-1}$ . El número de escaneos fue de 800 para la caracterización de las capas y 100 escaneos para el blanco (sustrato de sulfuro de zinc sin las capas), todos ellos con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

Con espectroscopía infrarroja se observaron los picos de absorción característicos del chitosán y de la ftalocianina de cobre.

##### 4.1.3.2. *Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).*

La caracterización por espectroscopía UV-Vis siguió el mismo protocolo de crecimiento de capas por LBL, pero sobre un sustrato de cuarzo, por no presentar este, bandas de absorción en el ultravioleta y en el visible.

En primer lugar, se realizó una línea base del espectro de absorción con un sustrato de cuarzo perfectamente limpio y seguidamente se realizó el correspondiente registro de



absorción del sustrato de cuarzo modificado con las películas mediante LBL. Cuando finalizó el registro, se repitió el proceso de crecimiento, de forma periódica y constante, y se caracterizó de nuevo. El proceso se repitió hasta alcanzar un número de espectros suficiente para realizar una regresión lineal en la banda de absorción de interés.

Se realizaron los espectros de absorción para 4, 8, 12, 16, 20 y 24 capas para un rango de longitudes de onda situado entre los 200 nm y los 800 nm

Con la caracterización UV-Visible se observaron únicamente dos de los materiales de la nanoestructura, la ftalocianina de cobre y las nanopartículas de oro. El quitosán no presentó apenas bandas de absorción en el UV-Vis y las bandas que presentó son poco características y de muy baja intensidad comparadas con los otros dos materiales.

## 4.2. Determinación de especies electroactivas: Técnicas electroquímicas.

El funcionamiento de los sensores y biosensores se validará mediante técnicas electroquímicas. Los analitos empleados en el actual trabajo, catecol e hidroquinona, son susceptibles de participar en reacciones de oxidación-reducción mediante el aporte de energía externa. Las técnicas electroquímicas empleadas para validar el funcionamiento de los sensores y biosensores son la voltametría cíclica y la cronoamperometría.

### 4.2.1. Voltametría cíclica.

La determinación de analitos electroactivos mediante voltametría cíclica se realizó en una celda electroquímica de tres electrodos, uno de referencia que es un electrodo de (Ag/AgCl), un contraelectrodo de platino, y un electrodo de trabajo, que es el sensor elaborado.

Habría que definir los parámetros de operación de la voltametría cíclica. Lo primero fue definir los potenciales máximo y mínimo de la voltametría, se seleccionaron 1,2 V y -0,8 como potenciales máximo y mínimo respectivamente. Después se definió una velocidad de barrido de 0,1 V/s. Por último, se configuraron el número de ciclos, el potencial de inicio y el tiempo de acondicionamiento, seleccionando 5 ciclos, 0 V y 5 s respectivamente.

Definidos los parámetros de operación, se tomó la disolución del difenol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7, catecol o hidroquinona, y se vertieron 40 mL de esta disolución en la celda. Después se realizó el montaje, conectando la celda tal y como se puede observar



en la Ilustración 31. Con el montaje correctamente realizado se inició la voltametría cíclica. Finalizada la voltametría se seleccionó el último de los ciclos para su representación.



Ilustración 31. Montaje de la celda electroquímica de trabajo.

#### 4.2.2. Cronoamperometría: Determinación del límite de detección (LOD).

Para la determinación de los límites de detección, así como la sensibilidad de los sensores se empleó el método electroquímico denominado cronoamperometría. La cronoamperometría empleada fue la catódica puesto que el pico anódico desaparece una vez inmovilizada la enzima.

Para realizar la cronoamperometría se emplearon los valores del potencial catódico obtenidos de la voltametría cíclica como una primera aproximación al valor real de reducción de fenol. El potencial catódico se mantendrá constante durante toda la determinación.

Con el potencial de reducción obtenido comienzo la cronoamperometría. En primer lugar, se vertieron 40 mL de disolución tampón fosfato 0,01 M a pH 7 en la celda electrolítica y se realizó el montaje de la celda electroquímica. A continuación, se inició la cronoamperometría. Después de un tiempo se observa como el valor de la corriente se estabilizó en un valor estacionario.

Con la corriente estabilizada, se tomó un volumen de 1 mL de la disolución de concentración  $10^{-4}$  M del difenol a determinar, catecol o hidroquinona, y se inyectó por la parte superior de la celda. Después de la primera adición se adicionaron volúmenes de 1 mL de la disolución del difenol a determinar a intervalos regulares en los cuales, dio tiempo a la estabilización de la corriente. En el actual trabajo de fin de grado los tiempos de estabilización fueron de 200 s hasta la primera adición y de 100 s para las subsiguientes.



La cronoamperometría finalizó cuando el número de puntos fue suficiente para realizar la recta de regresión entre la concentración y la corriente. En el actual trabajo de fin de grado se realizaron cronoamperometrías de 11 puntos con un tiempo total en la determinación de 1200 s.

Los valores de potencial de reducción dependen, no solamente del compuesto, sino también de la construcción del sensor nanoestructurado y de la enzima empleada en el biosensor.

Durante el desarrollo de este trabajo se han realizado varias cronoamperometrías para muestras patrón de catecol e hidroquinona, dos para el sensor nanoestructurado y cuatro para los biosensores, construidos con las enzimas lacasa y tirosinasa respectivamente. Los potenciales catódicos se indican en las cronoamperometrías realizadas en el apartado 5. Resultados experimentales y discusión.



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## *Capítulo V*

### *Resultados experimentales y discusión.*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## 5. Resultados experimentales y discusión.

Los resultados experimentales se dividen en dos bloques; en la primera parte del trabajo, se desarrolló el sensor nanoestructurado mediante la técnica Layer by Layer utilizando para ello tres materiales: quitosán, nanopartículas de oro y ftalocianina de cobre, la segunda parte del trabajo, consistió en el desarrollo del biosensor mediante la inmovilización en la superficie del sensor nanoestructurado de las enzimas tirosinasa y lacasa. Finalmente, se realizó un estudio completo del comportamiento electroquímico del biosensor.

La nomenclatura empleada en el actual trabajo de fin de grado para la denominación de los sensores y biosensores es la siguiente:

- En primer lugar, aparece un número  $n$  seguido del símbolo “X” que denomina el número de veces que se repite la secuencia que se encuentra entre corchetes “[ ]”
- Entre corchetes “[ ]” se encuentra la secuencia de materiales que se ha seguido en el Layer by Layer para la elaboración del sensor. Los compuestos incluidos entre paréntesis “( )” aparecen separados por un guion. Cada compuesto incluido entre paréntesis indica una inmersión de duración 300 s (la indicada en el procedimiento) y otra de lavado de 10 s. Las abreviaturas por materiales son las siguientes:
  - CHI para el quitosán.
  - CuPc para la ftalocianina tetrasulfónica ácida de cobre.
  - AuNPs para las nanopartículas de oro.
- El biosensor se representa con un guion al final de los corchetes seguido de la abreviatura de la enzima empleada. Las abreviaturas para las enzimas son las siguientes:
  - Lac para la enzima lacasa.
  - Tir para la enzima tirosinasa.

### 5.1. Preparación y caracterización de películas que actúan como mediadores electrónicos.

Para la posterior inmovilización de las enzimas tirosinasa y lacasa en los biosensores se requiere la incorporación de mediadores electrónicos entre la enzima y el sustrato que mejoren la actividad de estas enzimas. Se busca que con la incorporación de estos mediadores electrónicos en los biosensores enzimáticos se mejore la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato, aumente la actividad enzimática, mejore la



sensibilidad del sensor y se intensifiquen las señales de los picos de oxidación y reducción de las reacciones redox que tienen lugar en la celda electroquímica.

En el actual trabajo se planteó la incorporación en el sensor de dos mediadores electrónicos, las nanopartículas de oro (AuNPs) y la ftalocianina de cobre (CuPc). Además, para la inmovilización de las enzimas se utilizó como soporte polimérico el quitosán. La incorporación de los mediadores y del soporte polimérico se realizó mediante la técnica Layer by Layer sobre un soporte de ITO.

### 5.1.1. Desarrollo de las películas LbL.

La estructura idónea del sensor nanoestructurado se determinó mediante un estudio electroquímico de la configuración, es decir, con el análisis del orden de los distintos materiales en la nanoestructura y su influencia en la magnitud de la señal. Los sensores se evaluaron en muestras patrón de catecol e hidroquinona mediante voltametría cíclica.

En el soporte de ITO la primera de las películas debe poseer carga positiva, por lo tanto, se empleó el quitosán por ser un polímero policationico. Las AuNPs poseen carga superficial negativa y la ftalocianina tetrasulfónica ácida de cobre posee carga negativa.

Los sensores se prepararon mediante películas LbL con cargas alternas positivas y negativas. Los sensores se elaboraron con diferentes estructuras con el fin de establecer la disposición más adecuada para la posterior inmovilización de las enzimas.

Las configuraciones estudiadas mediante voltametría cíclica fueron las siguientes:

- $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$ .
- $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$ .
- $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs} + \text{CuPc})]$ .
- $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$ .
- $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})-(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$ .

Las dos primeras configuraciones,  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$  y  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  incorporan capas alternas de dos materiales, y se estudiaron para comparar su respuesta con respecto a las configuraciones que incorporan un tercer material en la nanoestructura.

Las configuraciones  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  y  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})-(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$  se estudiaron por dos motivos, el primero es la integración de las propiedades de los distintos materiales en el sensor y el segundo es estudiar la influencia del orden de los compuestos en la respuesta electroquímica.

Se estudió la configuración  $2X[(CHI)-(AuNPs + CuPc)]$  para comprobar si con una única inmersión aniónica se podían integrar las propiedades de las nanopartículas de oro y de la ftalocianina de cobre en el sensor.

Todas las configuraciones estudiadas se pueden observar esquemáticamente en la siguiente ilustración:

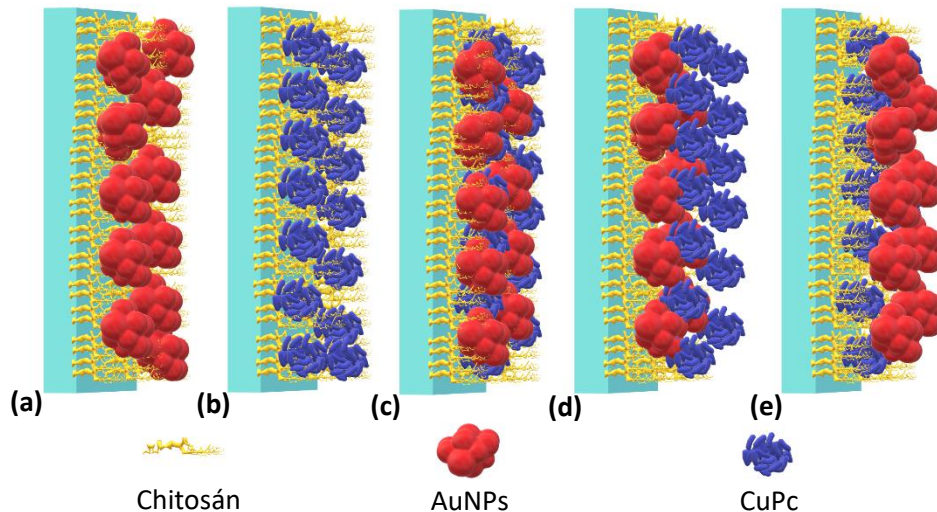


Ilustración 32. Esquema de las configuraciones estudiadas electroquímicamente:  $2X[(CHI)-(AuNPs)]$  (a),  $2X[(CHI)-(CuPc)]$  (b),  $2X[(CHI)-(AuNPs + CuPc)]$  (c),  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  (d) y  $2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)]$  (e).

Para obtener la señal del blanco se realizó una voltametría cíclica con un ITO sin modificar con los parámetros de operación indicados con anterioridad. Las voltametrías se realizaron sobre muestras patrón de catecol e hidroquinona de concentración  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 obteniendo el resultado mostrado en la Ilustración 33:

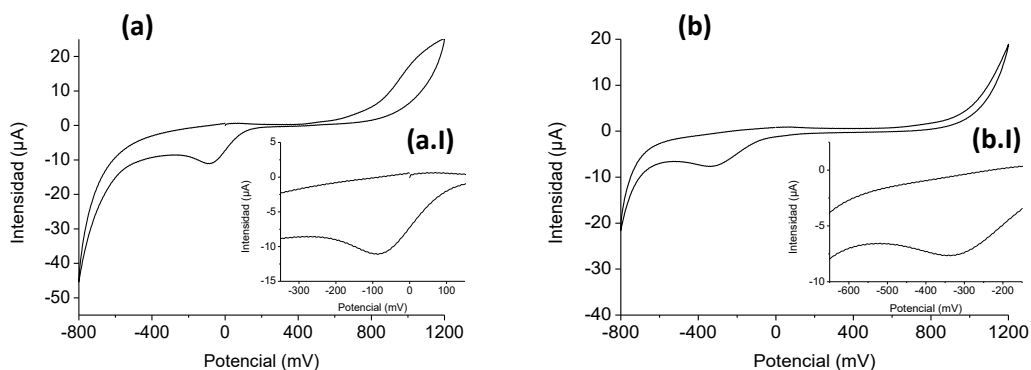
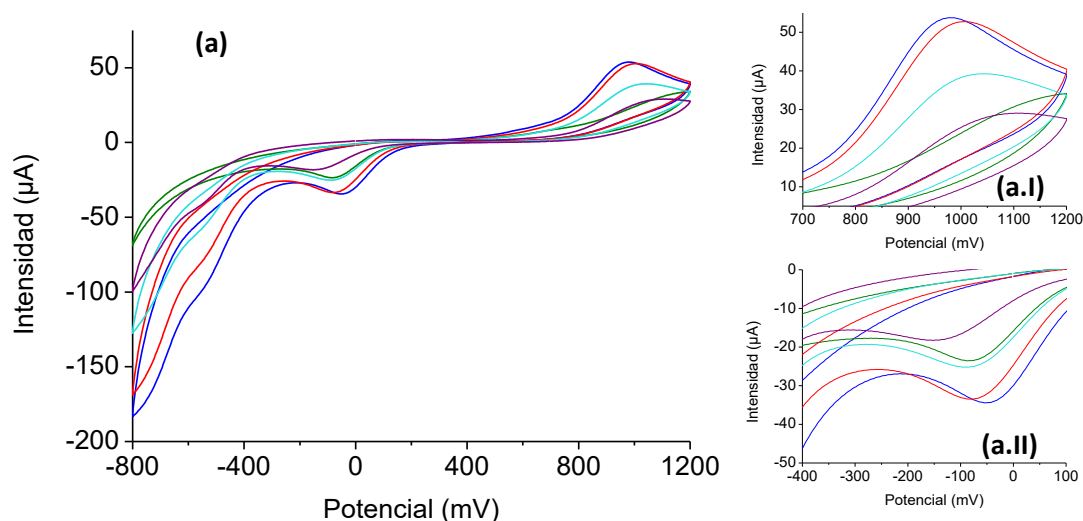


Ilustración 33. Voltametría cíclica de ITO en catecol  $10^{-4}$  M (a), detalle del pico catódico (a.I); e hidroquinona  $10^{-4}$  M (b), detalle del pico catódico (b.I) en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

Como se puede observar en la Ilustración 33 (a) y (b) con un ito sin modificar se presentó un leve pico catódico en ambas muestras debido a la reducción de los difenoles. En catecol

el pico catódico se presentó a un potencial de -85 mV con una intensidad catódica de -10  $\mu\text{A}$ . Además, se observa un pico anódico para un potencial de 1000 mV. Para la hidroquinona se observó un pico catódico a un potencial de reducción -340 mV y con una intensidad catódica de -7.5  $\mu\text{A}$ .

El estudio de la configuración los sensores nanoestructurados se evaluó, en primer lugar, en catecol  $10^{-4}$  M. La evaluación se realizó mediante una voltametría cíclica utilizando los mismos parámetros antes indicados. Las distintas respuestas voltamétricas se muestran en la Ilustración 34:



**Ilustración 34.** Respuesta voltamperométrica de las configuraciones 2X[(CHI)-(AuNPs)] (verde), 2X[(CHI)-(CuPc)] (azul claro), 2X[(CHI)-(AuNPs + CuPc)] (morado), 2X [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (azul oscuro) y 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] (rojo) en muestra patrón de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01M a pH 7 (a). Detalle del pico anódico (a.I). Detalle del pico catódico (a.II).

Del conjunto de sensores mostrados en la Ilustración 34 las nanoestructuras que presentaron las señales catódicas más intensas fueron las configuraciones 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] y 2X [(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)]. La mejora de la transferencia de carga proporcionada por las nanopartículas de oro combinada con la mediación electrónica de la ftalocianina de cobre, propiciaron un aumento intensidad catódica y una disminución del potencial de reducción. Se observó a su vez, unos potenciales anódicos y catódicos más cercanos entre sí, lo que denota una mayor tendencia a la reversibilidad del proceso redox.

Para la primera de las configuraciones, 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)], se obtuvo una intensidad de señal de -35  $\mu\text{A}$  a un potencial de reducción de -50 mV. Se produjo una mejora del 250 % en la intensidad de la señal y una disminución de potencial del 41 % con respecto a la señal del ITO sin modificar.



La segunda de las nanoestructuras,  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})-(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$ , presentó una intensidad de la señal es de  $-34 \mu\text{A}$  con un potencial de reducción de  $-87 \text{ mV}$ . La mejora para la intensidad de la señal fue del 240 % con respecto al blanco, produciéndose a su vez un leve aumento del potencial catódico.

Para el resto de configuraciones mostradas en el gráfico se obtuvieron unas señales de menor intensidad y con un mayor valor absoluto del potencial de reducción.

Por tanto, se seleccionaron para el estudio de reproducibilidad en catecol las nanoestructuras  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  y  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})-(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$ .

Las respuestas de las nanoestructuras en una muestra de hidroquinona  $10^{-4} \text{ M}$  se analizaron con el mismo procedimiento. La respuesta a las distintas configuraciones se muestra en la Ilustración 35:

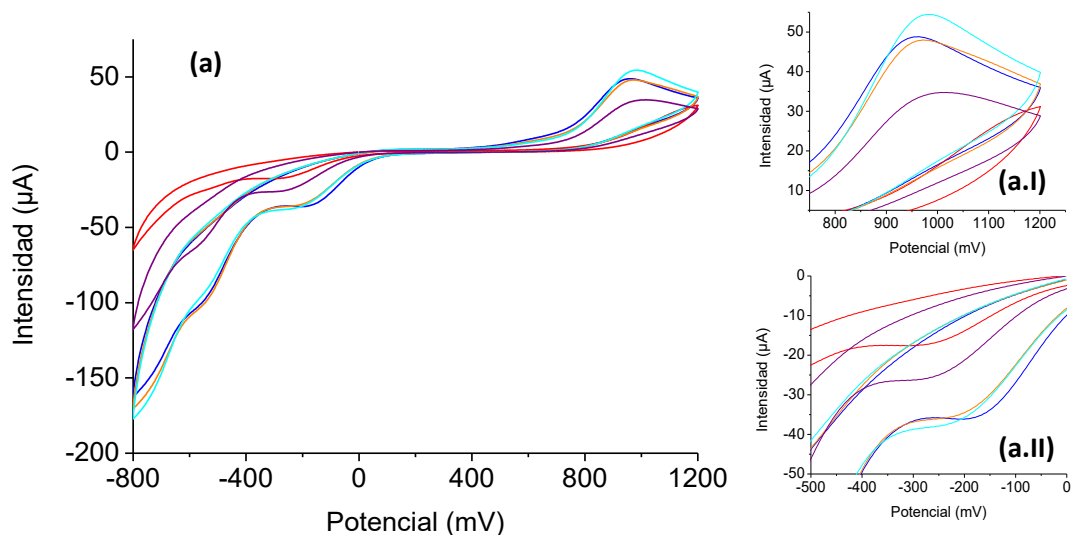


Ilustración 35. Respuesta voltamperométrica de las configuraciones  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$  (rojo),  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  (azul claro),  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs} + \text{CuPc})]$  (morado),  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  (azul oscuro) y  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})-(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$  (naranja) en muestra patrón de hidroquinona  $10^{-4} \text{ M}$  en tampón fosfato  $0,01 \text{ M}$  a  $\text{pH} 7$  (a). Detalle del pico anódico (a.I). Detalle del pico catódico (a.II).

La presencia de las modificaciones, cambio de forma drástica la respuesta electroquímica, observándose dos ondas catódicas en torno a  $-250 \text{ mV}$  y  $-550 \text{ mV}$  respectivamente y una onda anódica a  $950 \text{ mV}$ .

De los sensores mostrados en la Ilustración 35 destacaron tres con mayor intensidad catódica  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$ ,  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})-(\text{CHI})-(\text{AuNPs})]$  y  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$ . Además, en los dos últimos sensores no se observó una mejora importante en la intensidad catódica, pero si una disminución del valor absoluto del potencial de reducción con respecto al sensor  $2X[(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$ .



La nanoestructura 2X[(CHI)-(CuPc)] presento un pico catódico a una intensidad  $-37 \mu\text{A}$  y a un potencial de  $-248 \text{ mV}$ . La mejora de la intensidad fue del 393 % y del 27 % para el potencial, con respecto al blanco.

En la disposición 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] se obtuvo un pico catódico a una intensidad  $-36 \mu\text{A}$  en potencial de reducción de  $-231 \text{ mV}$ . Se produjo una mejora de la intensidad del 380 % y del 32 % para potencial con respecto al blanco.

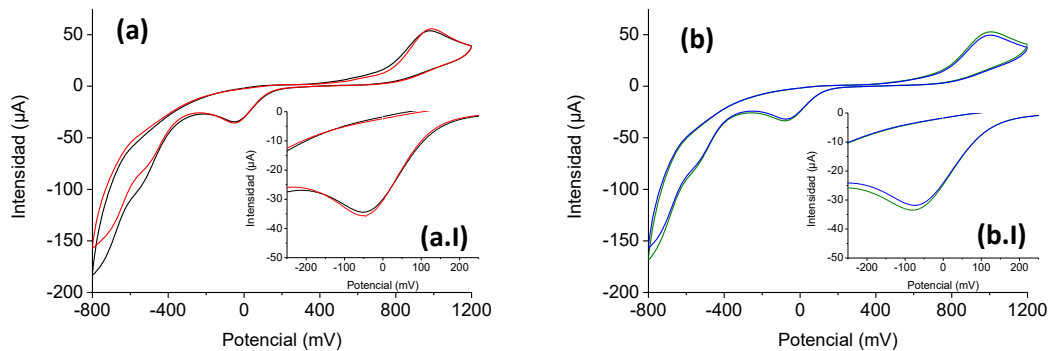
La configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] mostro un pico catódico para una intensidad  $-36 \mu\text{A}$  y con un potencial de  $-188 \text{ mV}$ . La mejora de intensidad fue del 380 %, siendo del 45 % para el potencial, ambos con respecto al blanco.

A la vista de los resultados obtenidos se seleccionaron para el estudio de reproducibilidad en hidroquinona los sensores con las siguientes configuraciones: 2X[(CHI)-(CuPc)], 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] y 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)], ya que presentaron las mejores intensidades catódicas.

### 5.1.2. Estudio de la reproducibilidad del sensor.

Se realizó un estudio de la reproducibilidad del sensor para determinar cuál de las configuraciones seleccionadas presentaba unas mejores propiedades para su implementación como biosensor. Para la selección del mejor sensor se empleó como criterio el coeficiente de variación entre las intensidades catódicas de los dos sensores. El coeficiente de variación se define como el valor resultante de dividir la desviación típica entre la media de un conjunto de valores.

Los sensores seleccionados por su mejor actividad electroquímica en el caso del catecol fueron aquellos a los que se les realizo el estudio. Para ello se sumergieron en una disolución de catecol  $10^{-4} \text{ M}$  en tampón fosfato  $0,01 \text{ M}$  a pH 7 en las condiciones del procedimiento anteriormente indicadas. La respuesta voltamétrica de los dos sensores de cada configuración se muestra en la Ilustración 36:



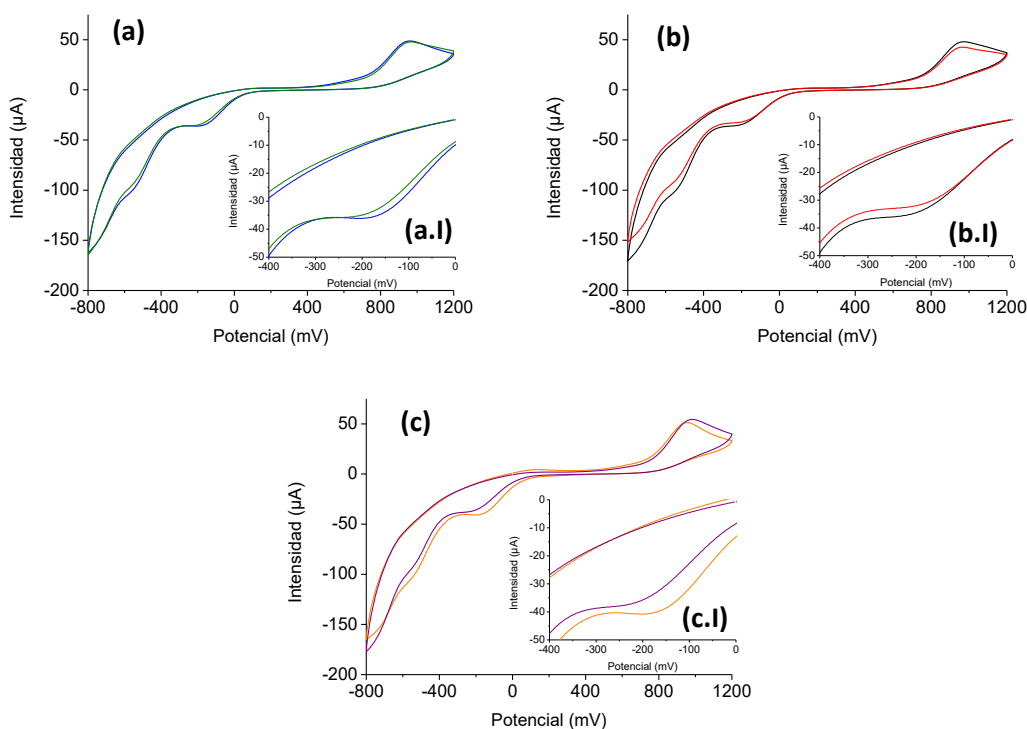
**Ilustración 36.** Respuesta voltamétrica de la configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (a), detalle del pico catódico (a.I); y 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] (b), detalle del pico catódico (b.I) en catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

La configuración que se observa en la Ilustración 36 (a) y (a.I), 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)], presentó unas intensidades de señal de  $-35 \mu\text{A}$  y  $-34 \mu\text{A}$  a un mismo potencial de  $-50 \text{ mV}$ . Con los valores de la intensidad se calculó un coeficiente de variación obteniendo un valor de  $C_v = 2,24 \%$ .

Para la segunda de las configuraciones, 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)], mostrada en la Ilustración 36 (b) y (b.I) se obtuvieron unas intensidades de señal de  $-33 \mu\text{A}$  y  $-31 \mu\text{A}$  a unos potenciales de  $-78 \text{ mV}$  y  $-75 \text{ mV}$  respectivamente. Se calculó el coeficiente de variación obteniendo un valor de  $C_v = 4,2 \%$ .

A la vista de los resultados, se seleccionó la nanoestructura 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] para la determinación de catecol.

Para el estudio de la reproducibilidad en hidroquinona se evaluaron los tres sensores seleccionados por su mejor actividad electroquímica 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)], 2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)] y 2X[(CHI)-(CuPc)]. Se realizaron dos voltametrías cíclicas para cada configuración en una muestra de hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7. La respuesta voltamétrica para los dos sensores de cada configuración se muestra en la Ilustración 37:



**Ilustración 37.** Respuesta voltamétrica de la configuración  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  (a), detalle del pico catódico (a.I);  $2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)]$  (b), detalle del pico catódico (b.I); y  $2X[(CHI)-(CuPc)]$  (c). detalle del pico catódico (c.I) en hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

La configuración de la Ilustración 37 (a) y (a.I),  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ , mostro unas intensidades de señal de  $-36 \mu A$  y  $-35 \mu A$  a unos potenciales de  $-212$  mV y  $257$  mV respectivamente. El coeficiente de variación calculado fue  $C_v = 0,65 \%$  para las intensidades.

Para la segunda de las configuraciones,  $2X[(CHI)-(CuPc)-(CHI)-(AuNPs)]$ , mostrada en la Ilustración 36 (b) y (b.I), se obtuvieron unas intensidades catódicas de  $-35 \mu A$  y  $32 \mu A$  a unos potenciales de  $-223$  mV y  $-221$  mV respectivamente. El coeficiente de variación fue  $C_v = 6,3 \%$  para las intensidades catódicas.

La tercera de las configuraciones,  $2X[(CHI)-(CuPc)]$ , mostrada en la Ilustración 36 (c) y (c.I), presento unas intensidades catódicas de  $-40 \mu A$  y  $-38 \mu A$  a unos potenciales de  $-195$  mV y  $-270$  mV respectivamente. El coeficiente de variación obtenido para las intensidades fue de  $C_v = 4,9 \%$ .

La nanoestructura  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  se seleccionó para la detección de la hidroquinona, ya que presento la mejor reproducibilidad.



Para ambos difenoles, catecol e hidroquinona, se obtuvo que la nanoestructura 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] era la que presentaba las mejores características para su posterior implementación como biosensor. Esta configuración aúna las propiedades de los materiales empleados en su construcción:

- El chitosán:
  - Facilita la inmovilización de la enzima en la superficie.
  - Forma una superficie robusta y estable para la incorporación del resto de materiales.
- Nanopartículas de oro AuNPs:
  - Mejoran el área superficial del sensor.
  - Mejora la transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo, lo que permite obtener un menor potencial de reducción.
- Ftalocianina de cobre:
  - Aporta al sensor un mediador electrónico justo en la última capa. La CuPc en contacto con el difenol cambia el estado de oxidación del cobre complejante facilitando la transferencia electrónica. El efecto del mediador provoca un aumento de la intensidad catódica.
  - Potencia la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato y tiene un efecto de ampliación del rango de sustratos afines a la enzima.

### 5.1.3. Estudio del crecimiento de las capas en el sensor.

La adsorción de las películas nanoestructuradas se determinó mediante espectroscopía infrarroja FT-IR y espectroscopía de absorción UV-Visible.

#### 5.1.3.1. Espectroscopía UV-Visible.

Mediante espectroscopía UV-Visible se obtuvo información acerca de la transferencia de dos de los materiales utilizados en la nanoestructura del sensor seleccionado, 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)], las nanopartículas de oro y la ftalocianina de cobre, por presentan absorbancia en el espectro UV-Visible.

En primer lugar, se caracterizaron las AuNPs, mostrando estas un máximo de absorción a una longitud de onda de entre 500 nm y 550 nm, que se corresponden con un diámetro de la nanopartícula comprendido entre 15-20 nm.

Paras la ftalocianina de cobre se obtuvo una banda Q a 615 nm, correspondiente con la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del anillo de isoindoles entre el orbital HOMO, orbital molecular ocupado

de mayor energía, y el orbital LUMO, orbital molecular libre de menor energía. Asimismo, se obtuvo una banda B a 335 nm. Las bandas obtenidas fueron de alta intensidad y permitieron una caracterización sencilla y sensible de este material [65].

La calidad de la transferencia de las capas se realizó registrando espectros UV-Visible en un intervalo de longitudes de onda de entre 200 nm y 800 nm. El espectro se registró sobre un sustrato de cuarzo para capas sucesivas.

Los resultados de las espectroscopía se muestran en la Ilustración 38:

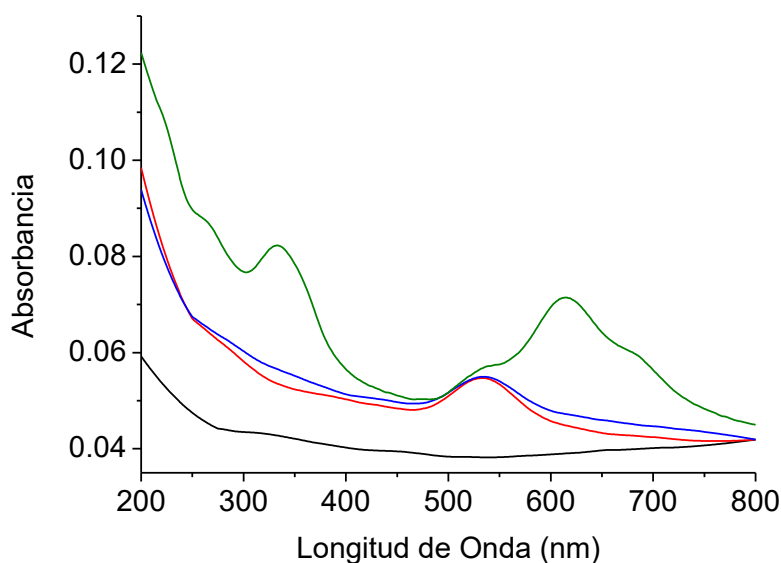


Ilustración 38. Espectro UV-visible para la configuración [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]. [(CHI)] (negro), [(CHI)-(AuNPs)] (rojo), [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)] (azul) y [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (verde) sobre un sustrato de cuarzo.

Con el análisis espectroscópico mostrado en la Ilustración 38 se observó que el quitosán, como era de esperar, no presenta máximos de absorción característicos. En segundo lugar, se evidenció que la película de las AuNPs mostró su característica banda de absorción a 535 nm.

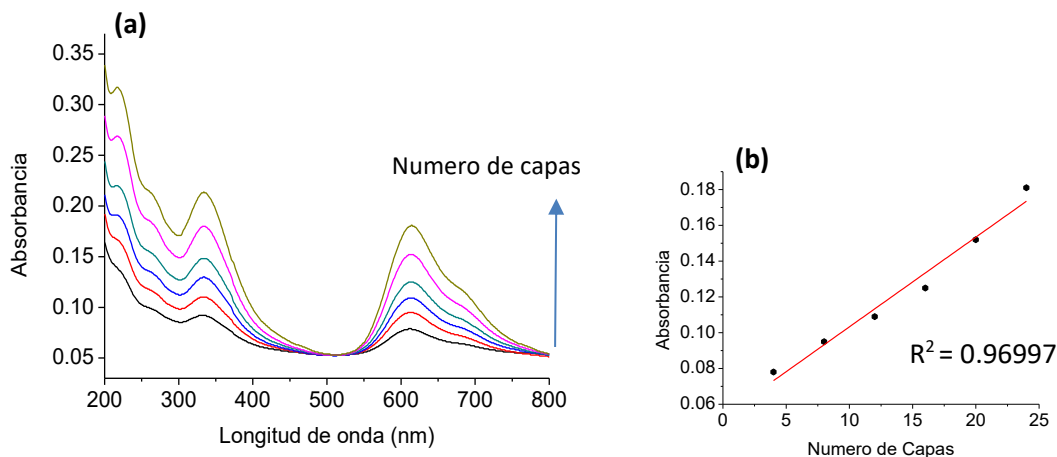
Con la incorporación de una segunda capa de quitosán no se observó un cambio apreciable en el patrón de absorbancia. Al depositar una última capa de ftalocianina de cobre, se observaron las bandas típicas de la CuPc y como la magnitud de la absorbancia las AuNPs es muy inferior a la de la CuPc.

Una vez demostrada la correcta transferencia de todos los componentes, se registró la absorbancia de un número creciente de capas,  $n$ , para la configuración seleccionada  $n \times [(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  sobre un sustrato de cuarzo, siendo  $n=4, 8, 12, 16, 20$  y  $24$ .

En el espectro de absorción mostrado en la Ilustración 39 se observaron las dos bandas características de la ftalocianina de cobre, la banda Q se observó a 615 nm y la banda de

Soret se observó a 335 nm. Se observó como el valor de la absorbancia crecía con el número de capas.

La representación del número de capas,  $n$ , frente a la absorbancia a 615 nm se puede observar en la Ilustración 39:



**Ilustración 39. Espectro UV-Visible entre para  $nX[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  con  $n = (4, 8, 12, 16, 20)$  (a). Regresión lineal para un número creciente de capas en la banda Q situada a 615 nm (b).**

Se observa una regresión lineal ( $R^2 = 0.96997$ ) que confirma la calidad de la transferencia de la ftalocianina de cobre.

### 5.1.3.2. Espectroscopía infrarroja FT-IR.

Otro método empleado para evaluar la correcta transferencia de los materiales sobre el sustrato fue la espectroscopía infrarroja FT-IR. Para ello, se realizaron espectros infrarrojos con un número creciente de capas,  $n$ , sobre un sustrato de ZnS de la configuración  $nX[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$ , siendo  $n = 4, 8, 12, 16, 20$  y 24, en un intervalo de números de onda de entre  $2000 \text{ cm}^{-1}$  y  $800 \text{ cm}^{-1}$ . En el espectro infrarrojo se observaron las bandas características del chitosán y de la ftalocianina de cobre (Ilustración 40).

Para el chitosán las bandas aparecen a  $1070 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento simétrico del enlace C–O, a  $1168 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento asimétrico del enlace C–O [38], y por último, se observó el estiramiento de la imina C=N a  $1646 \text{ cm}^{-1}$  [38].

Las bandas de la ftalocianina de cobre tetrasulfonada aparecen a  $897 \text{ cm}^{-1}$  y son debidas al estiramiento del enlace S=O de los grupos sulfonados [65]. A su vez, el estiramiento del enlace C–N del pirrol se observó a  $1027 \text{ cm}^{-1}$  [60]. La vibración simétrica del enlace S=O se pudo ver a  $1155 \text{ cm}^{-1}$  [60], así como el estiramiento del isoindol que se observó a  $1468 \text{ cm}^{-1}$ .

<sup>1</sup> [65]. La flexión del enlace N-H se mostró a  $1542\text{ cm}^{-1}$  [61], además de observarse la tensión del enlace N-H a  $1730\text{ cm}^{-1}$  [61].

Para evaluar la calidad del crecimiento se determinó la relación entre la transmitancia y el número de capas,  $n$ , tomándose como ejemplo dos bandas, una correspondiente al chitosán y otra correspondiente a la ftalocianina de cobre. Para el chitosán se seleccionó el mínimo de transmitancia situado a  $1646\text{ cm}^{-1}$ . Para la ftalocianina se seleccionó la banda situada a  $1027\text{ cm}^{-1}$ .

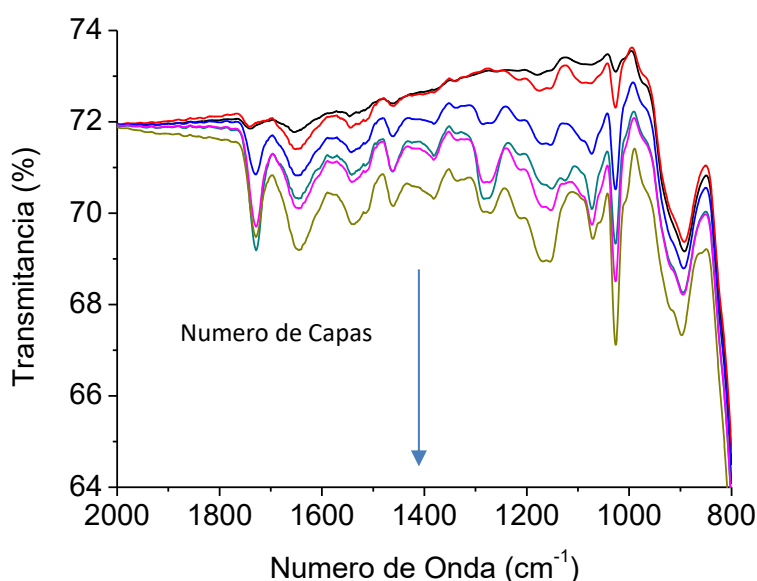


Ilustración 40. Espectroscopía infrarroja FTIR de la configuración  $nX[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  con  $n=4, 8, 12, 16, 20$ .

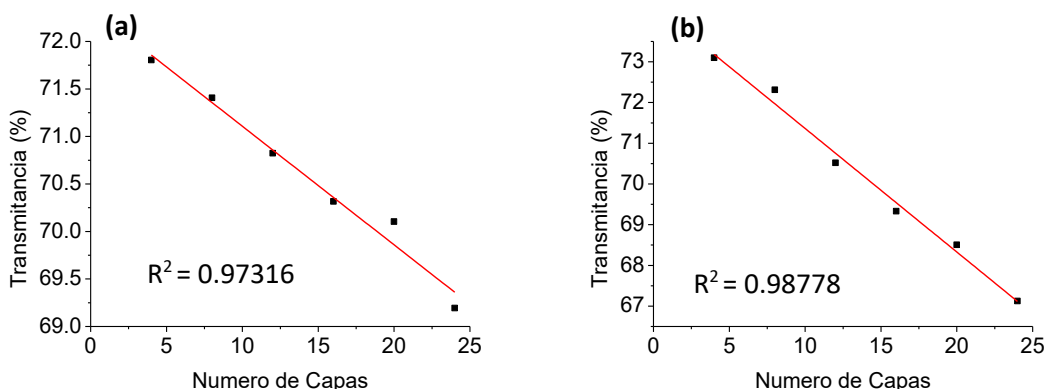


Ilustración 41. Regresión lineal del espectro FT-IR del chitosán para un número de onda de  $1646\text{ cm}^{-1}$  (a) Regresión lineal del espectro FT-IR de la ftalocianina de cobre para un número de onda de  $1027\text{ cm}^{-1}$  (b).

Como muestra la Ilustración 40, se produjo una disminución de la transmitancia a medida que fue aumentando el número de capas sobre el sustrato. La representaciones de la transmitancia frente al número de capas, Ilustración 41 (a) para el chitosán e Ilustración 41 (b) para la ftalocianina de cobre, ponen de manifiesto la linealidad al depositar cada uno



de los dos materiales y en consecuencia la correcta adsorción de los mismos sobre el sustrato. Para el mínimo de transmitancia correspondiente al quitosán,  $1646\text{ cm}^{-1}$ , se obtuvo un ajuste a la recta de  $R^2 = 0.97316$ , lo que evidenció un crecimiento lineal al depositar el quitosán. Para el caso de la ftalocianina de cobre, con un mínimo de transmitancia en  $1027\text{ cm}^{-1}$ , el ajuste fue incluso mejor, con  $R^2 = 0.98778$ . Se obtuvo, en consecuencia, un crecimiento lineal de ftalocianina de cobre sobre la nanoestructura del sensor.

#### 5.1.4. Estudio de la repetitividad del sensor.

Se realizó el estudio de la repetitividad del sensor nanoestructurado de configuración  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  tras varios ciclos de uso.

Para el estudio de la repetitividad del sensor nanoestructurado se realizaron 5 ciclos consecutivos de voltametría cíclica en una muestra de catecol  $10^{-4}\text{ M}$  en tampón fosfato  $0,01\text{ M}$  a pH 7. La respuesta voltamétrica se muestra en la Ilustración 42:

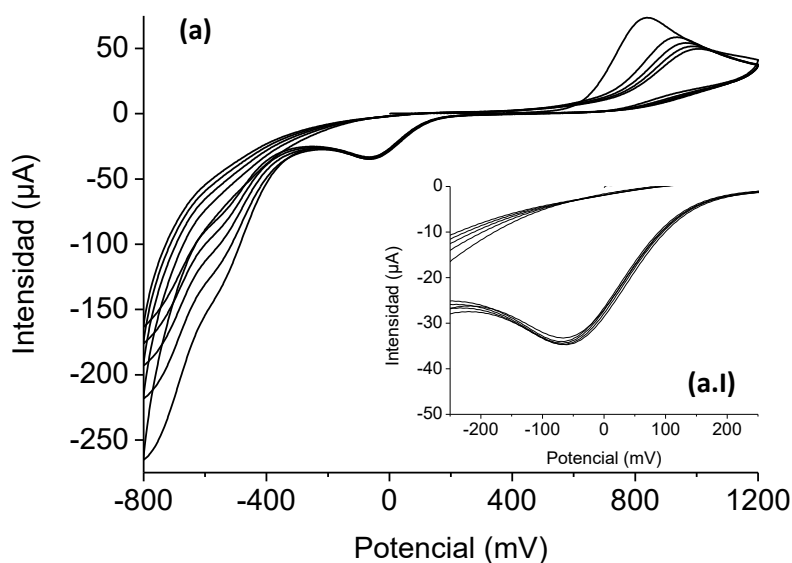
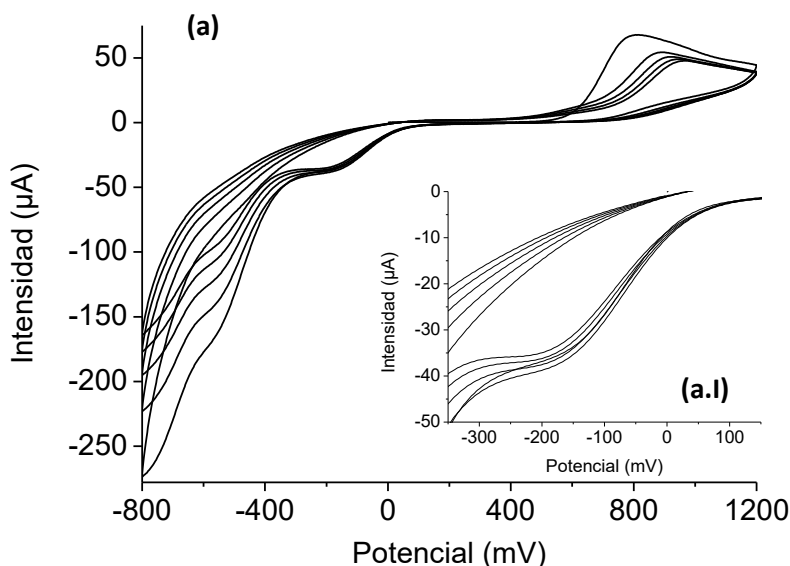


Ilustración 42. Respuesta voltamétrica de un sensor nanoestructurado con la configuración  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]$  (a), detalle del pico catódico (a.I) en catecol  $10^{-4}\text{ M}$  en tampón fosfato  $0,01\text{ M}$  a pH 7.

Tomando los valores de intensidad catódica de los 5 ciclos en pico de reducción a  $-65\text{ mV}$  se obtuvo un coeficiente de variación del  $0,79\%$ , que puso de manifiesto una excelente repetitividad del sensor nanoestructurado frente a la muestra patrón.

De idéntica forma, para el estudio de la repetitividad en hidroquinona se realizaron 5 ciclos consecutivos de voltametría cíclica para una muestra de hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7. La respuesta voltamétrica se muestra en la Ilustración 43:



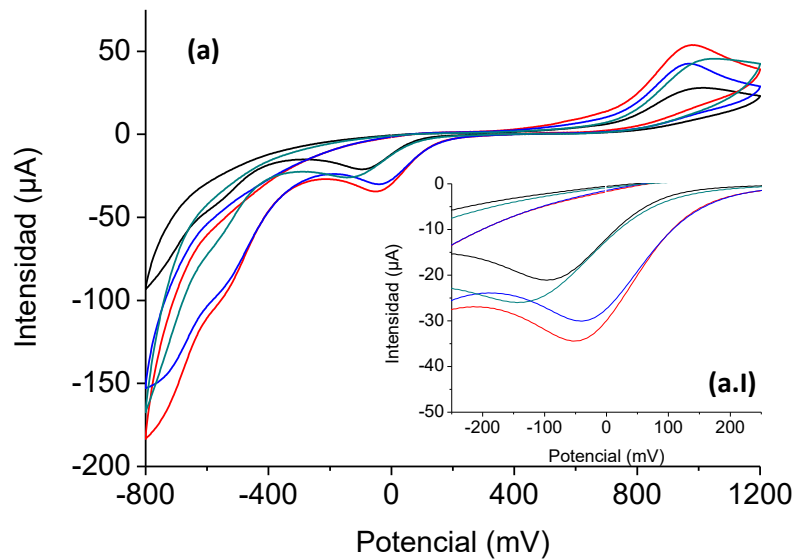
**Ilustración 43.** Respuesta voltamétrica de un sensor nanoestructurado con la configuración  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  (a), detalle del pico catódico (a.I) en hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

En este caso se obtuvo un coeficiente de 3,64 %, calculado en las mismas condiciones. Este coeficiente de variación evidencia una buena repetitividad para la intensidad catódica, además se observó que el potencial de reducción se desplazó desde de un potencial de -190 mV a -200 mV a medida que avanzaba el número de ciclos.

Los resultados muestran una mejor reproducibilidad frente al catecol, tanto en el coeficiente de variación obtenido para las intensidades catódicas como en la estabilidad y definición del potencial de reducción.

#### 5.1.5. Estudio del efecto del espesor del sensor nanoestructurado.

Se realizó un estudio del efecto del espesor de la nanoestructura. Para ello se realizaron voltamétrías cíclicas utilizando sensores con un número creciente de capas,  $n$ , de la configuración  $nX[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  para  $n = 1, 2, 4$  y  $6$  respectivamente. Las voltamétrías se realizaron sobre una muestra de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7. Las respuestas voltamperométricas del sensor con espesor creciente se puede observar en la Ilustración 44:



**Ilustración 44.** Respuesta voltamétrica de la configuración  $nX[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  en catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 para  $n=1$  (negro),  $n=2$  (rojo),  $n=4$  (azul), y  $n=6$  (verde) (a), detalle del pico catódico (a.I).

La representación de las voltametrías de la Ilustración 44 mostró de forma inequívoca que el tamaño óptimo para el espesor de la configuración seleccionada es  $n = 2$ , por ser el número de capas que produce una intensidad catódica mayor y con un potencial de reducción menor. El valor de la intensidad para  $n = 2$  se vio incrementado en un 65 % con respecto a  $n = 1$ , un 16 % con respecto a  $n = 4$  y un 34 % con respecto a  $n = 6$ .

A medida se aumentó el número de tricapas se observaron paralelamente tres efectos perniciosos en el sensor nanoestructurado, la disminución progresiva de la magnitud de la intensidad catódica, el desplazamiento hacia potenciales de reducción menores y la progresiva desaparición del pico anódico. Estos efectos perjudiciales se produjeron por dos motivos, el primero fue que se vio limitado el acceso al mediador electrónico, la ftalocianina de cobre, y el segundo es que la conductividad del sensor se vio impedida a medida que aumenta el número de capas, por ser el quitosán un mal conductor. Los resultados obtenidos indican que la respuesta electroquímica es un fenómeno de superficie.

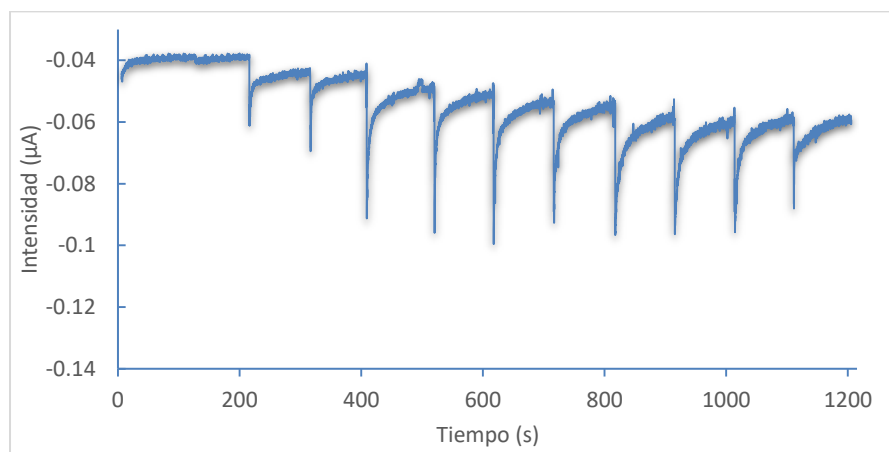
### 5.1.6. Estudio de los límites de detección.

Una vez determinadas y optimizadas las características de los sensores nanoestructurados se pasó a la determinación de la sensibilidad y los límites de detección (LODs) de los sensores seleccionados con la configuración óptima  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ . Las sensibilidades y los LODs se obtuvieron mediante la realización de cronoamperometrías catódicas en muestras con concentraciones crecientes de catecol e hidroquinona. Para la realización de las cronoamperometrías se utilizó el potencial de reducción característico de las especies químicas.

Partiendo de un volumen inicial de 40 mL de tampón fosfato 0,01 M a pH 7, se fue aumentando la concentración mediante la adición de 1 mL de catecol o hidroquinona con una concentración  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7. La primera adición se produjo a los 200 s, una vez estabilizada la señal, y se realizaron saltos de concentración cada 100 s a partir del primer salto.

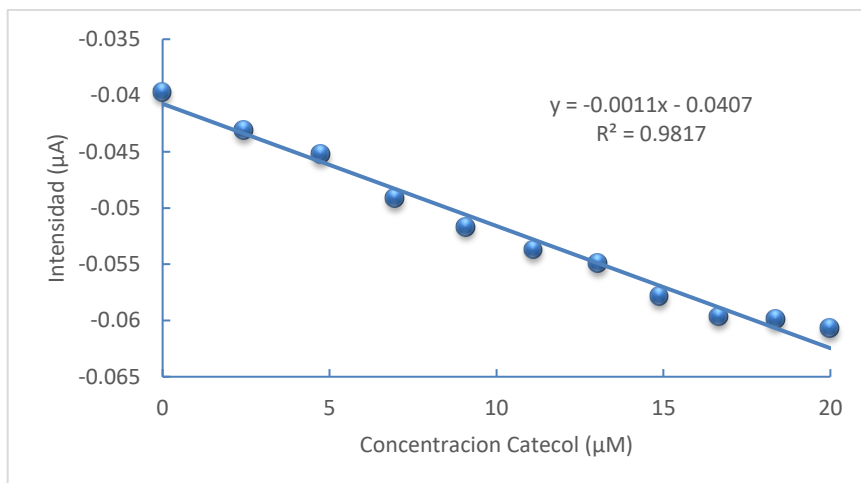
Posteriormente, se realizó la recta de calibrado representando la intensidad frente a la concentración, de la que se calculó la sensibilidad como la pendiente de la recta de regresión. Con la sensibilidad y la desviación típica de cinco blancos se determinó el límite de detección mediante la ecuación correspondiente.

Para la determinación de la sensibilidad y de los límites de detección en catecol se realizó una cronoamperometría catódica a un potencial de -35 mV. La respuesta cronoamperométrica de la intensidad catódica frente al tiempo se puede observar en la Ilustración 45:



**Ilustración 45.** Cronoamperometría catódica del sensor  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$  a un potencial fijo de -35mV con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución patrón de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7.

En la Ilustración 46 se muestran la recta de regresión, la ecuación y el ajuste obtenidos para la cronoamperometría anterior:



**Ilustración 46.** Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de catecol para el sensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)].

El límite de detección se calculó mediante la pendiente y la desviación típica de 5 blancos siguiendo la Ecuación 22:

$$\text{Limite de detección } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{m} = \frac{3 \cdot 0.000208 \mu A}{0.0011 \mu A/\mu M} = 5.7 \cdot 10^{-1} \mu M$$

**Ecuación 22.** Límite de detección del sensor de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] en catecol  $10^{-4}$  M.

Como muestra la ecuación anterior, se obtuvo un límite de detección en catecol de  $5.7 \cdot 10^{-1} \mu M$ . Los sensores nanoestructurados presentaron un comportamiento lineal con un ajuste de  $R^2 = 0.9817$ .

Asimismo, para la determinación de la sensibilidad y de los límites de detección en hidroquinona se realizó una cronoamperometría catódica a un potencial de -150 mV. La respuesta cronoamperométrica de la intensidad catódica frente al tiempo se puede observar en la Ilustración 47:

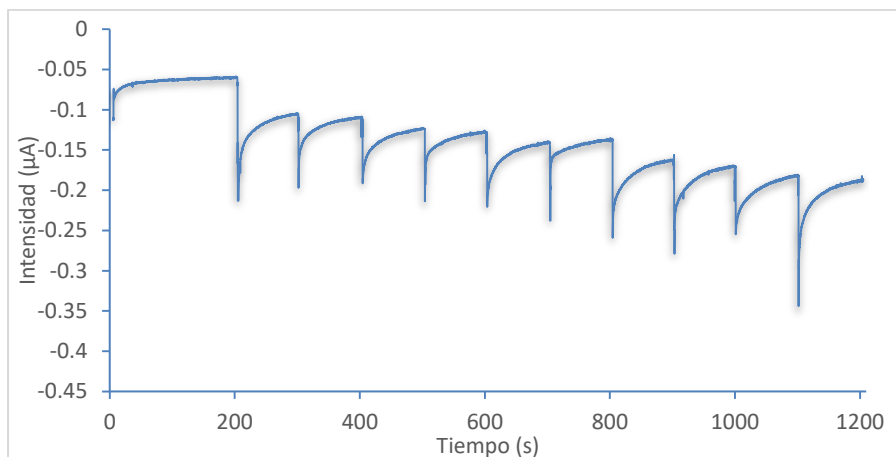


Ilustración 47. Cronoamperometría catódica del sensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] a un potencial fijo de -150mV con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución patrón de hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7.

La recta de regresión se obtuvo con los valores de la intensidad anteriores a la adición y los valores de la concentración correspondientes de igual manera que el caso anterior. La pendiente se corresponde con la sensibilidad. En la Ilustración 48 se puede observar la recta de regresión, la ecuación y el ajuste obtenidos:

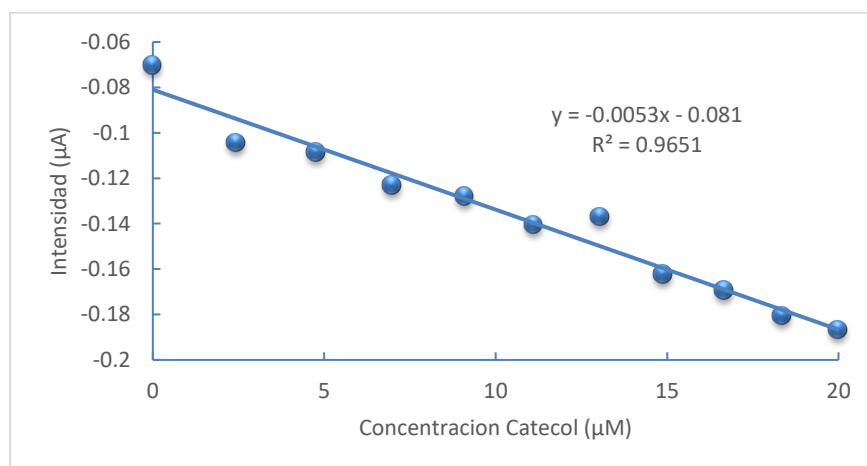


Ilustración 48. Representación de la intensidad de corriente en función de la concentración de hidroquinona para el sensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)].

Y mediante la pendiente y la desviación típica de 5 blancos se obtuvo el límite de detección para la hidroquinona:

$$\text{Limite de detección } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{m} = \frac{3 \cdot 0.000307 \mu A}{0.0053 \mu A/\mu M} = 1.74 \cdot 10^{-1} \mu M$$

Ecuación 23. Límite de detección del sensor de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] en hidroquinona  $10^{-4}$  M.



La menor cantidad detectable de hidroquinona fue de  $1.74 \cdot 10^{-1} \mu M$ . El ajuste a la recta obtenido es de  $R^2 = 0.9651$ , evidenciando un comportamiento lineal entre la intensidad y la concentración de hidroquinona.

Comparativamente se obtuvo un límite de detección para la hidroquinona que fue tres veces inferior al obtenido para el catecol. Esta diferencia en la magnitud del límite de detección se debe sobre todo al valor de la sensibilidad. El valor de la sensibilidad en la determinación de la hidroquinona es unas 5 veces superior al valor de la sensibilidad para el catecol. En cuanto a la desviación típica de los blancos se obtuvo que el asociado a la hidroquinona fue un 50 % superior con respecto al obtenido para el catecol.

Con la configuración del sensor seleccionada  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]$ , con sus características optimizadas y habiendo calculado sus prestaciones, se pasó a continuación al desarrollo del biosensor mediante la inmovilización de las enzimas oxidorreductasas lacasa y tirosinasa.



## 5.2. Desarrollo del biosensor.

Una vez preparadas y caracterizadas las películas para la mediación electrónica, se realizó la inmovilización de las enzimas tirosinasa y lacasa sobre el sensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] para, de esta forma mejorar la detección de los compuestos catecol e hidroquinona.

Se realizó la inmovilización de la enzima mediante dos técnicas, la primera, con una inmersión directa en glutaraldehído, y la segunda a través de con vapores de glutaraldehído.

Una vez inmovilizadas las enzimas se realizó un entrecruzamiento. A continuación, se realizó un estudio de la actividad enzimática, de la reproducibilidad y de la repetitividad mediante voltametría cíclica para catecol e hidroquinona. Para finalizar se obtuvieron los límites de detección de los biosensores con tirosinasa y lacasa para el catecol y la hidroquinona.

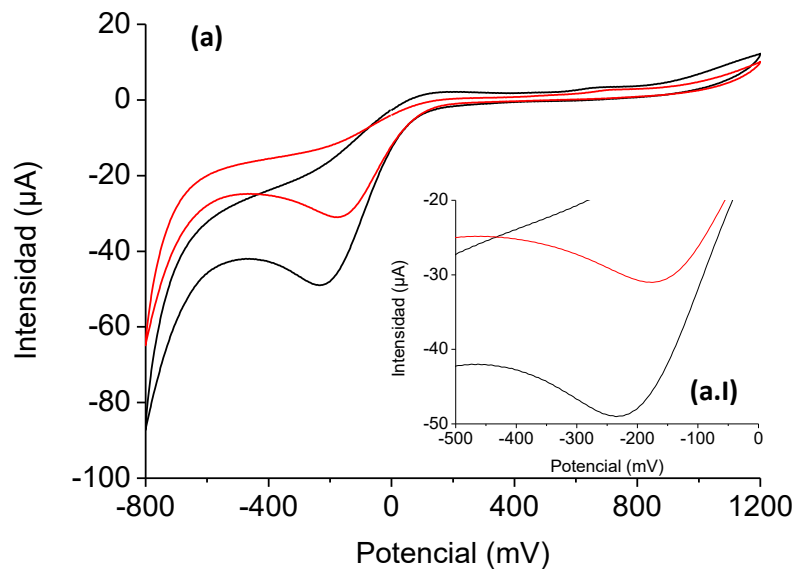
### 5.2.1. Estudio de la inmovilización enzimática.

Para determinar el método más adecuado para la inmovilización de las enzimas se realizaron dos variantes del entrecruzamiento.

La primera de las variantes es la inmersión directa del sensor con la enzima depositada en una disolución acuosa de glutaraldehído 2,5% w/w durante un lapso de tiempo de 5 minutos. La segunda de las variantes es la inmovilización mediante vapores de glutaraldehído de concentración de 2,5% w/w en disolución acuosa durante un periodo de 20 minutos.



Se realizó el estudio con la enzima lacasa, para ello se efectuaron dos voltametrías cíclicas con un rango de potenciales de entre -800 mV y 1200 mV y con una velocidad de barrido de 100 mV/s sobre una muestras patrón de catecol de concentración  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 obteniendo el resultado mostrado en la Ilustración 49:



**Ilustración 49.** Respuesta voltamétrica del biosensor  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac$  en muestra de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 con inmovilización por inmersión directa en glutaraldehído (rojo) y por vapores de glutaraldehído (negro) (a), detalle del pico catódico (a.I).

Como se observa en la Ilustración 49, la inmovilización mediante vapores de glutaraldehído produjo una intensidad de  $-53 \mu A$  en lugar de los  $-31 \mu A$  obtenidos por la inmovilización con inmersión directa, en la que disminuyó el número de sitios activos, dificultando en consecuencia la catálisis de catecol. Además, otra de las posibles explicaciones para esta disminución en la señal es el posible apantallamiento de la señal debido al glutaraldehído, es decir, un aislamiento eléctrico del sensor que impide el tránsito de electrones necesario para la reducción del catecol.

Aparejado a esta disminución de la intensidad de la señal aparece una caída del potencial de reducción desde los  $-235$  mV a los  $-174$  mV, entre la inmersión en vapores y la inmersión directa en glutaraldehído respectivamente.

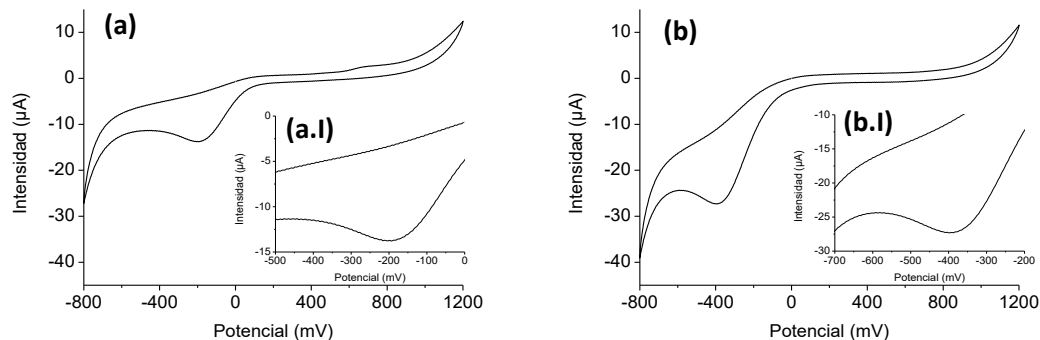
El método de inmovilización utilizado en actual trabajo de fin de grado, para los siguientes ensayos, será la inmersión en vapores de glutaraldehído por maximizar la retención de la enzima.

## 5.2.2. Estudio de la actividad enzimática.

### 5.2.2.1. Biosensor de lacasa.

Para el estudio de la actividad enzimática de la lacasa se realizaron voltametrías cíclicas en muestras de catecol e hidroquinona, siguiendo el protocolo de medida previamente establecido.

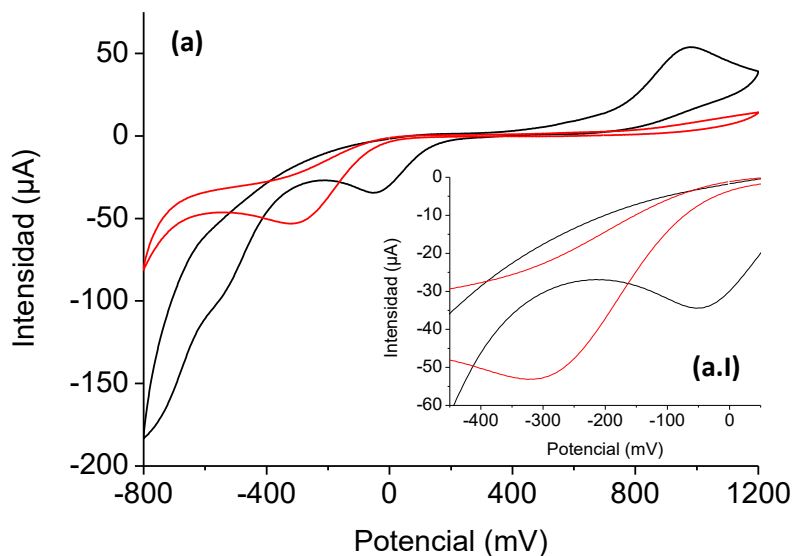
En primer lugar, se examinó el comportamiento electroquímico de la respuesta del ITO recubierto únicamente con lacasa, obteniendo las voltametrías cíclicas que se muestran en la Ilustración 50:



**Ilustración 50.** Voltametría cíclica en ITO con la enzima lacasa inmovilizada sobre muestra de catecol  $10^{-4}$  M (a), detalle del pico catódico para la muestra de catecol (a.I); e hidroquinona  $10^{-4}$  M (b), detalle del pico catódico para la muestra de hidroquinona (b.I) en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

La voltametría en catecol mostró un pico de reducción a un potencial de -198 mV y con una intensidad de -14 µA. En la voltametría correspondiente a la hidroquinona, se observó el pico de reducción a -392 mV con una intensidad de -27 µA.

La respuesta del biosensor formado por las capas LbL con lacasa en catecol se muestra en la Ilustración 51:

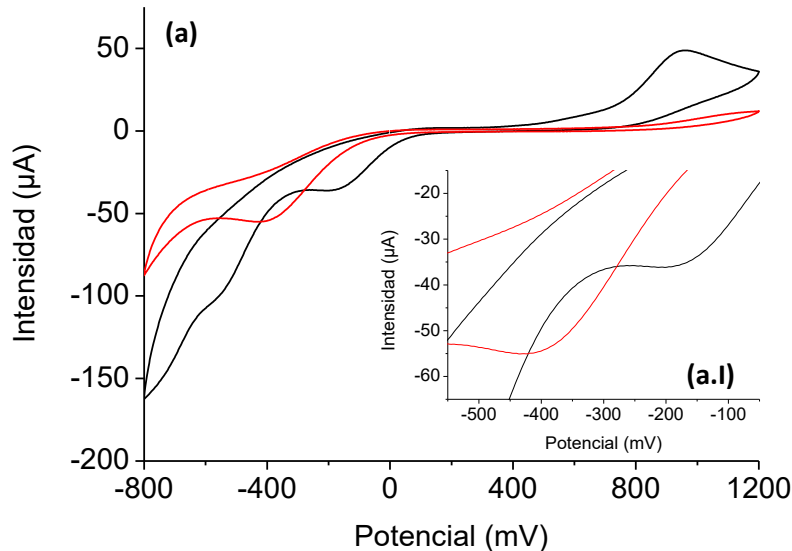


**Ilustración 51.** Respuesta voltamperométrica para el sensor nanoestructurado 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (negro) y el biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac (rojo) (a), detalle del pico catódico (a.I) para muestra de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

Como se observa en la Ilustración 51 (a), con la inmovilización de la enzima sobre la nanoestructura del sensor se obtuvo una importante mejora en la intensidad de la señal para el pico catódico, pasando de  $-34 \mu\text{A}$  a  $-53 \mu\text{A}$ , lo que supuso una mejora de casi el 54 % con respecto al sensor nanoestructurado. Se observó a su vez, que con la inmovilización de la enzima lacasa se pierde por completo el pico anódico.

A su vez se constató un desplazamiento bastante pronunciado del potencial de reducción, pasando de  $-49$  mV, para el sensor nanoestructurado, a  $-318$  mV con la enzima inmovilizada.

De forma idéntica la respuesta del biosensor en hidroquinona se muestra en la Ilustración 52:

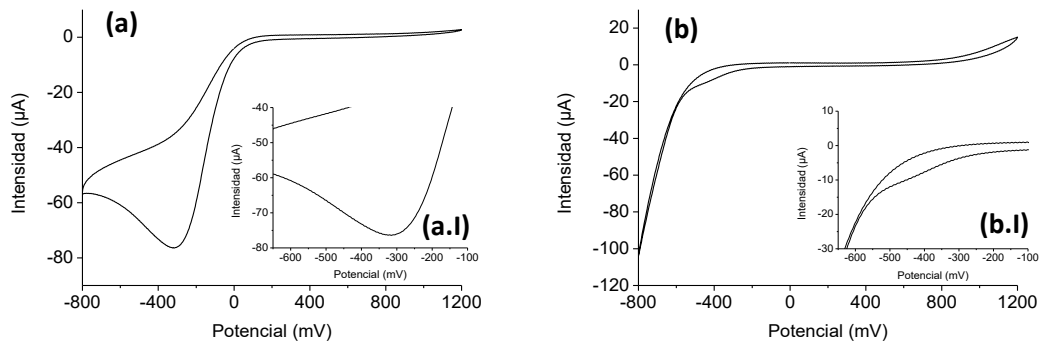


**Ilustración 52.** Respuesta voltamperométrica para el sensor nanoestructurado 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (negro) y el biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac (rojo) (a), detalle del pico catódico (a.I) para muestra de hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

En el caso de la hidroquinona (Ilustración 52 (a)), la presencia de la enzima provocó una significativa mejora en la intensidad de la señal para el pico catódico. Se pasó de una intensidad catódica de  $-35 \mu\text{A}$ , para el sensor nanoestructurado, a  $-55 \mu\text{A}$  para el biosensor. Se obtuvo una mejora del 53 %. Como en el caso anterior se observó un elevado desplazamiento potencial de reducción, pasando de  $-195.05 \text{ mV}$  a  $-421.75 \text{ mV}$  cuando la enzima estuvo inmovilizada. A su vez, se observó que la inmovilización de la enzima lacasa provocó la completa desaparición del pico anódico.

#### 5.2.2.2. Biosensor de tirosinasa.

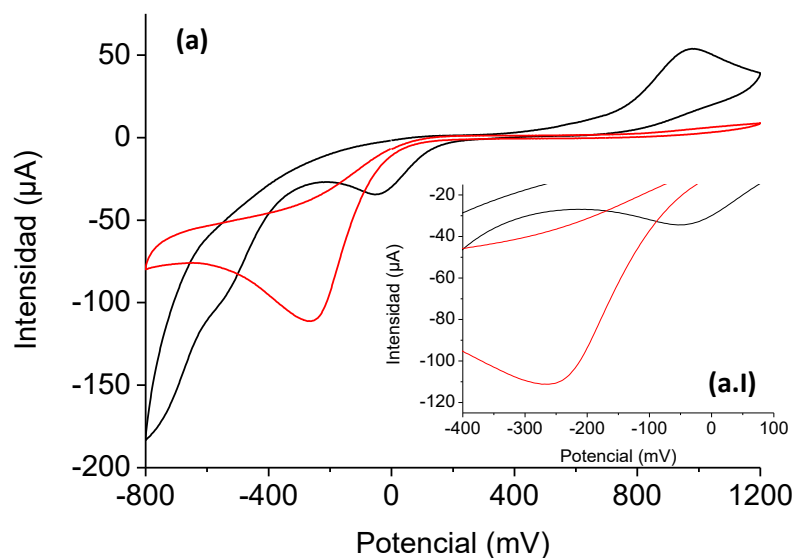
Se inmovilizó la enzima tirosinasa sobre un ITO sin modificar y se realizaron voltametrías cíclicas en muestras de catecol e hidroquinona de concentración de  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7. Las voltametrías cíclicas se muestran en la Ilustración 53:



**Ilustración 53.** Voltametría cíclica en ITO con la enzima tirosinasa inmovilizada sobre muestra de catecol 10<sup>-4</sup> M (a), detalle del pico catódico para la muestra de catecol (a.I); e hidroquinona 10<sup>-4</sup> M (b), detalle del pico catódico para la muestra de hidroquinona (b.I) en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

La respuesta frente a catecol mostró un pico de reducción muy pronunciado a un potencial de -317 mV y con una intensidad de -76 μA. En presencia de hidroquinona no se observó ninguna respuesta.

La respuesta del biosensor modificado con LbL con la enzima tirosinasa se muestra en la Ilustración 54:

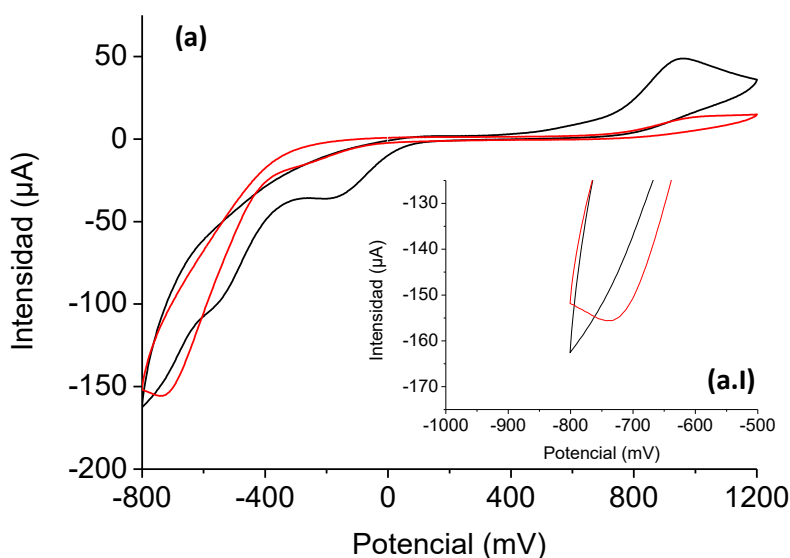


**Ilustración 54.** Respuesta voltamperométrica para el sensor nanoestructurado 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (negro) y el biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir (rojo) (a), detalle del pico catódico (a.I) para muestra de catecol 10<sup>-4</sup> M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

En presencia de la capa LbL de mediador electrónico, el biosensor mostro una notable mejora de la intensidad de la señal con respecto a la señal obtenida para el sensor nanoestructurado. La señal pasó de -34 μA, para el sensor nanoestructurado, a -112 μA para el biosensor nanoestructurado, siendo la mejora de la señal de un 225 %.

Como en el caso de la lacasa, se observó un desplazamiento pronunciado del potencial de reducción, pasando de -49 mV, para el sensor, a -266 mV para el biosensor. Además, con la inmovilización de la enzima tirosinasa desapareció por completo el pico anódico.

Para la hidroquinona la respuesta del biosensor se muestra en la Ilustración 55:



**Ilustración 55.** Respuesta voltamperométrica para el sensor nanoestructurado 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] (negro) y el biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir (rojo) (a), detalle del pico catódico (a.I) para muestra de hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7.

Se observó una extraordinaria mejora en la intensidad de la señal con la inmovilización de la enzima respecto a la señal obtenida con el sensor nanoestructurado sin enzima. La señal obtenida para el sensor nanoestructurado fue de -36 µA, pasando a un valor de -156 µA para el biosensor nanoestructurado. La mejora de la intensidad de la señal fue de un 330 %.

Además, se observó el mismo desplazamiento del potencial de reducción anteriormente descrito, siendo en este caso mucho más pronunciado, pasando de un potencial de reducción de los -201 mV para el sensor, a los -738 mV para el biosensor.

La señal obtenida para el biosensor nanoestructurado con la tirosinasa inmovilizada presentó una intensidad de señal muy superior a la suma de las intensidades del sensor nanoestructurado más la señal del ITO limpio con la enzima tirosinasa inmovilizada en su superficie.

### 5.2.3. Estudio de la reproducibilidad.

Se realizó un estudio de la reproducibilidad para los biosensores nanoestructurados con las configuraciones  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]-\text{Lac}$  y  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]-\text{Tir}$ . Para ello se realizaron dos voltametrías cíclicas a dos biosensores elaborados en las mismas condiciones. Se utilizó como criterio cuantitativo el coeficiente de variación de las intensidades de los dos biosensores ensayados. Las voltametrías cíclicas se realizaron para un rango de potencial entre -800 mV y 1200 mV y con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

#### 5.2.3.1. Biosensor de lacasa.

En primer lugar, se realizaron dos voltametrías cíclicas en una muestra de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7, obteniendo el resultado que se muestra en la Ilustración 56:

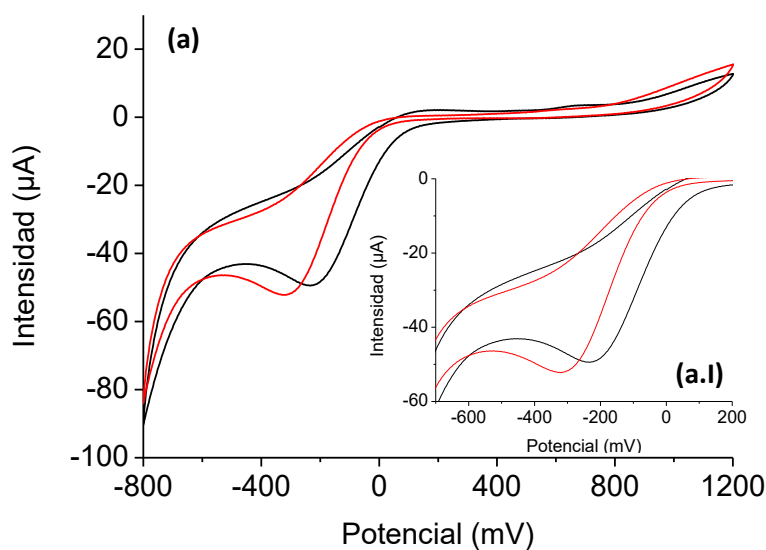


Ilustración 56. Respuesta voltamétrica de dos biosensores  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]-\text{Lac}$  en catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

Las voltametrías de la Ilustración 56 (a) y (a.I), para el biosensor  $2X[(\text{CHI})-(\text{AuNPs})-(\text{CHI})-(\text{CuPc})]-\text{Lac}$  en catecol, presentaron unos picos catódicos a unas intensidades de  $-52 \mu\text{A}$  y  $-49 \mu\text{A}$  a unos potenciales de  $-321 \text{ mV}$  y  $236 \text{ mV}$  respectivamente. Con estos valores de intensidad se determinó el coeficiente de variación obteniendo  $C_v = 4,21 \%$ .

A la vista del coeficiente de variación se pudo afirmar que el biosensor así obtenido presentaba una buena reproducibilidad.

Continuado con el estudio de la reproducibilidad, se realizaron otras dos voltametrías cíclicas en una muestra de hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7 para dos biosensores preparados en las mismas condiciones. Las voltametrías obtenidas se pueden observar en la Ilustración 57:

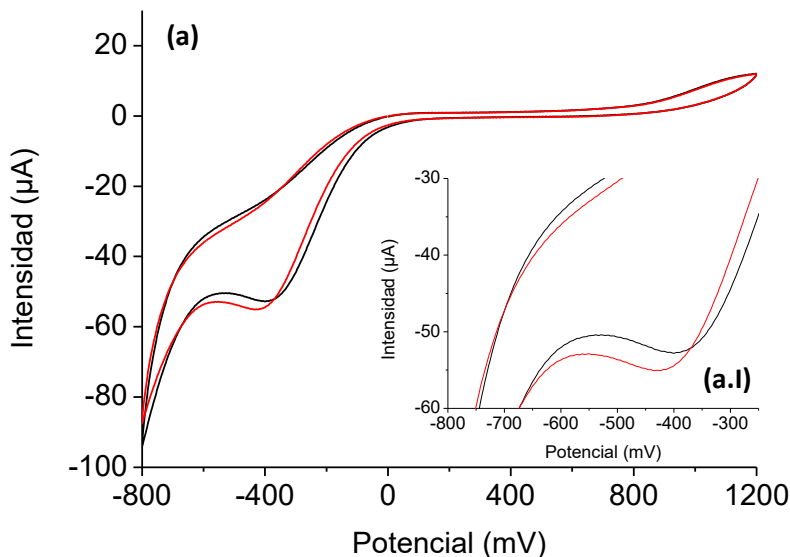


Ilustración 57. Respuesta voltamétrica de dos biosensores  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac$  en hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

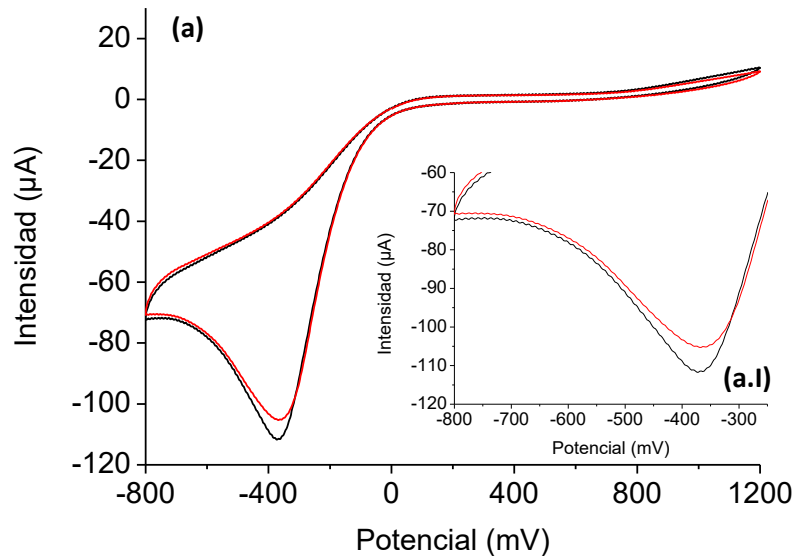
Las voltametrías de la Ilustración 57 (a) y (a.I), para  $2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac$  en hidroquinona, mostraron unas intensidades catódicas de  $-55 \mu A$  y  $-52 \mu A$  para unos potenciales de  $-432$  mV y  $-394$  mV respectivamente. Determinando el coeficiente de variación para estas intensidades se obtuvo un valor de  $C_v = 3,04 \%$ .

El coeficiente de variación obtenido confirmó la excelente reproducibilidad de los biosensores.



### 5.2.3.2. Biosensor de tirosinasa.

Para el estudio del comportamiento electroquímico de los biosensores elaborados con tirosinasa, se realizaron dos voltametrías cíclicas en una muestra de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7, obteniendo las voltametrías que se muestran en la Ilustración 58:

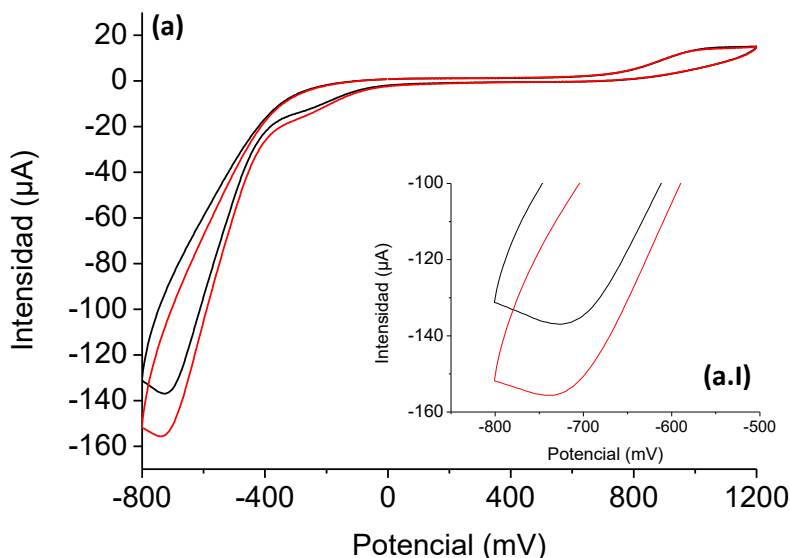


**Ilustración 58.** Respuesta voltamétrica de dos biosensores 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

Las voltametrías de la Ilustración 58 (a) y (a.I), para dos réplicas del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en catecol, presentaron unas intensidades catódicas de  $-112 \mu\text{A}$  y  $-105 \mu\text{A}$  a unos potenciales de  $-372 \text{ mV}$  y  $367 \text{ mV}$  respectivamente. El coeficiente de variación para las intensidades catódicas fue  $C_v = 4,43 \%$ .

El coeficiente de variación obtenido para la intensidad y los potenciales de reducción mostrados, evidencian una excelente reproducibilidad de los biosensores preparados con tirosinasa en catecol.

Se continuó con el estudio la reproducibilidad de los biosensores preparados con tirosinasa en hidroquinona.



**Ilustración 59.** Respuesta voltamétrica de dos biosensores 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

Las voltametrías mostradas en la Ilustración 59 (a) y (a.I) para las dos réplicas del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en hidroquinona, presentaron unas intensidades de  $-156 \mu\text{A}$  y  $-139 \mu\text{A}$  para unos potenciales de  $-737 \text{ mV}$  y  $-727 \text{ mV}$  respectivamente. Determinando el coeficiente de variación para estas intensidades se obtuvo un valor de  $C_v = 8.11 \%$ .

El coeficiente de variación obtenido y los potenciales mostrados exhibieron una reproducibilidad aceptable para la hidroquinona.

Los resultados obtenidos para los biosensores elaborados con tirosinasa muestran una mejor reproducibilidad para la muestra de catecol, tanto para el valor de la intensidad como del potencial. Este resultado resulta lógico pues la tirosinasa cataliza, preferentemente, las reacciones redox de orto-fenoles.

#### 5.2.4. Estudio de la repetitividad.

Para validar la respuesta de los biosensores 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac y 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en una determinación en continuo, se realizó un estudio de la repetitividad tras varios ciclos de uso. El procedimiento fue la realización de cinco ciclos consecutivos de voltametría cíclica en catecol e hidroquinona. El rango de potenciales

empleado para todas las voltametrías se encontró entre 1200 mV y -800 mV y la velocidad de barrido fue de 100 mV/s.

#### 5.2.4.1. Biosensor de lacasa.

Para el estudio de la repetitividad en catecol se realizó una voltametría en una muestra de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7. La respuesta voltamétrica para los 5 ciclos consecutivos se puede observar en la Ilustración 60:

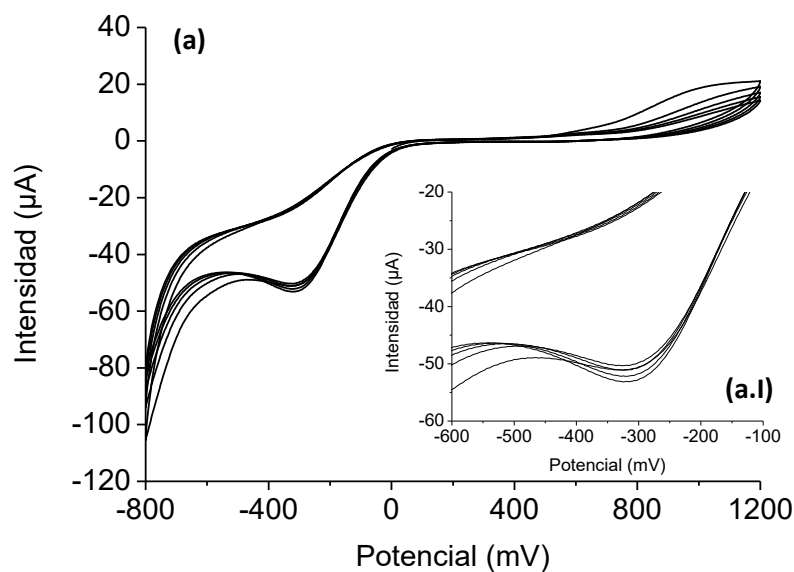
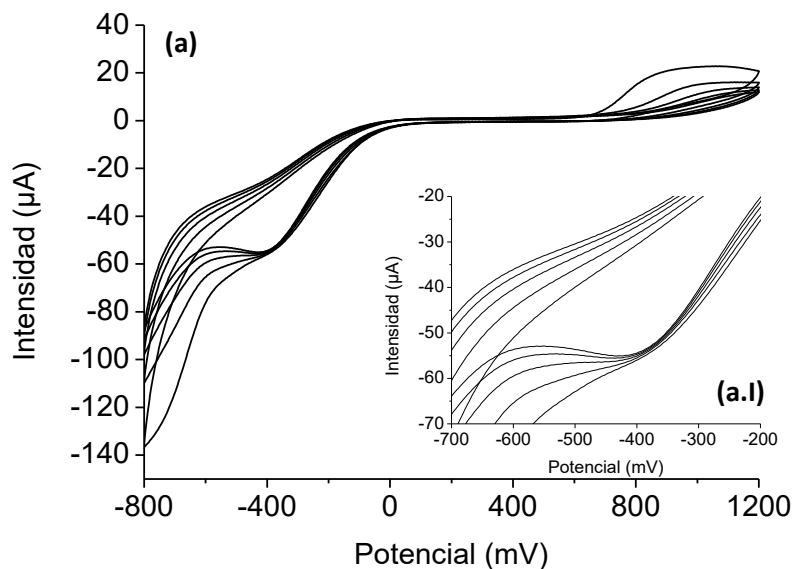


Ilustración 60. Respuesta voltamétrica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac en catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

Con los valores de intensidad catódica de los ciclos consecutivos, se obtuvo un coeficiente de variación de  $C_v = 2,3 \%$ , evidenciando una excelente repetitividad para la intensidad catódica, con un potencial de reducción constante y estable de -320 mV. La estabilidad en el valor de a intensidad y del potencial evidencia la correcta inmovilización de la enzima y buena conservación de la actividad catalítica de la enzima tras varios ciclos de uso. Se observó a su vez una leve tendencia a la oxidación, que menguó a medida que avanzó la voltametría.

En segundo lugar, se obtuvo la respuesta voltamétrica para los 5 ciclos consecutivos en hidroquinona como muestra la Ilustración 61:



**Ilustración 61.** Respuesta voltamétrica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac en hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

De forma similar, el coeficiente de variación de las respuestas frente a hidroquinona se determinó mediante los valores de intensidad catódica obteniendo un valor de  $C_v = 1,24$  %. El biosensor exhibió un potencial constante de -411 mV a lo largo de todos los ciclos. La inmovilización fue correcta y no se produjeron pérdidas de actividad catalítica durante la determinación. No obstante, a medida que avanzaron los ciclos de voltametría, se observó una mejora en la definición de los picos catódicos.

Se observó, a su vez, la presencia de un pico anódico poco definido en los primeros ciclos, que fue desapareciendo gradualmente, a medida que fue avanzando la voltametría.

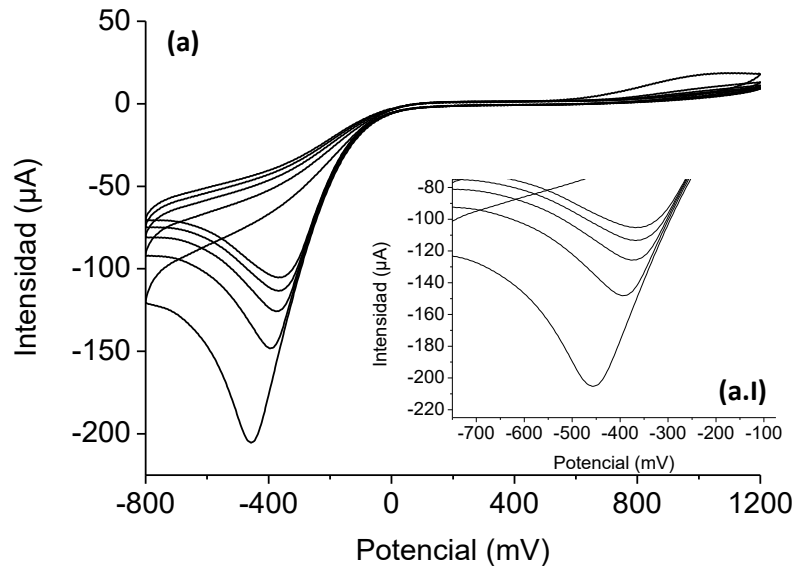
Los biosensores con lacasa exhibieron una buena reproducibilidad para los dos difenoles, con un potencial de reducción constante a lo largo de las voltametrías y con un bajo coeficiente de variación para intensidades catódicas.

#### 5.2.4.2. Biosensor de tirosinasa.

Se determinó la repetitividad de biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir mediante la realización de voltametrías cíclicas en muestras de catecol e hidroquinona, realizadas con los mismos parámetros anteriormente descritos. La validación de los biosensores se

realizó, como en los casos anteriores, mediante el coeficiente de variación entre las intensidades catódicas de los ciclos de voltametría.

La respuesta voltamétrica de los ciclos en catecol para la tirosinasa se observan en la Ilustración 62:



**Ilustración 62.** Respuesta voltamétrica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

Se calculó el coeficiente de variación para las intensidades obteniendo un valor de  $C_v = 26$  %. Así mismo, se calculó el coeficiente de variación de los potenciales a los que aparece el pico y se obtuvo un valor de  $C_v = 9,48$  %.

Los coeficientes de variación para el potencial y la intensidad muestran una mala repetitividad del biosensor. Se produjo una caída simultanea muy pronunciada de los valores de intensidad y potencial catódicos observándose, no obstante, una estabilización de dichos valores a medida que avanzaron los ciclos de voltametría. La posible explicación de esta caída simultanea de intensidad y potencial es la perdida de actividad catalítica de la tirosinasa tras varios ciclos de uso o la saturación del biosensor. La saturación del biosensor se produce cuando la concentración del sustrato,  $[S]$ , es tal, que ocupa los centros activos de la enzima, alcanzando la velocidad máxima de reacción,  $V_{max}$ , de la ecuación de Michaelis-Menten.

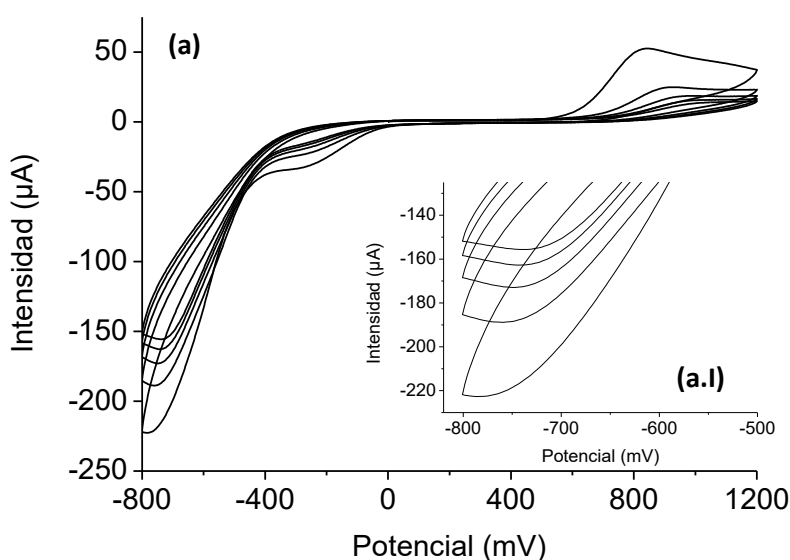
$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \text{ Si } [S] \uparrow \text{ es alta } \approx \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S]} = V_{max}$$

**Ecuación 24.** Ecuación de Michaelis-Menten para un único sustrato en condiciones de saturación.

A su vez, se observó una fuga de enzimas desde la superficie del biosensor al medio a determinar. Esta fuga de enzimas se observa a simple vista, como una ligera decoloración del biosensor en la parte sumergida en la muestra a determinar.

Como se ha comentado con anterioridad, la tirosinasa está compuesta por cuatro subunidades unidas entre sí por interacciones polares e hidrofóbicas. El carácter hidrofóbico de la tirosinasa crea fuerzas repulsivas cuando el medio analizado es acuoso, propiciando la fuga de la enzima. El entrecruzamiento con glutaraldehído no evitó la fuga de enzimas no unidas covalentemente al soporte o entre sí.

Prosiguiendo con la repetitividad del biosensor en hidroquinona se realizaron las voltametrías consecutivas que se muestran en la Ilustración 63:



**Ilustración 63.** Respuesta voltamétrica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (a), detalle del pico catódico (a.I).

Se obtuvieron unos coeficientes de variación de  $C_v = 14,86 \%$  y  $C_v = 2,34 \%$  para la intensidad y potencial catódicos respectivamente.

Los resultados obtenidos para la hidroquinona fueron dispares. Se obtuvo una mala repetitividad en cuanto a intensidad se refiere, pero para el potencial se logró una repetitividad aceptable, con un valor bastante estable a lo largo de los ciclos. Se observó la misma estabilización de los valores de intensidad a medida que avanzaron los ciclos de voltametría.

Como en el caso del catecol, las posibles explicaciones para esta caída simultánea de intensidad y potencial fueron, la pérdida de actividad catalítica tras varios ciclos de uso y la saturación del biosensor.



De la misma forma que en el caso anterior, se observó una fuga parcial de enzimas no enlazadas covalentemente, debido al carácter hidrofóbico de los enlaces entre las subunidades de la tirosinasa.

En la primera de las voltametrías se observó como el pico catódico se encontró poco definido y que, a medida que avanzaron los ciclos, el pico se volvió más definido y más visible.

A su vez se observó también, un segundo pico catódico, muy similar en potencial e intensidad catódica al obtenido para el sensor nanoestructurado de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]. Este pico fue desapareciendo a medida que avanzaron los ciclos de voltametría.

Los biosensores elaborados con tirosinasa mostraron una mala reproducibilidad frente a ambos difenoles, tanto en la intensidad catódica como en la estabilidad del potencial de reducción, siendo no obstante mejor para el caso de la hidroquinona.

#### 5.2.5. Estudio de los límites de detección.

Las sensibilidades y los LODs se determinaron mediante la realización de las cronoamperometrías catódicas en muestras de catecol e hidroquinona para los biosensores. La sensibilidad se obtuvo mediante la pendiente de la recta de los valores de intensidad en función de la concentración.

Con un volumen inicial de 40 mL de tampón fosfato 0,01 M a pH 7, se realizaron adiciones de 1 mL de catecol o hidroquinona  $10^{-4}$  M preparado en tampón fosfato 0,01 M a pH 7. La primera adición se produjo tras la estabilización del sistema a 200 s y se realizó una adición cada 100 s.

##### 5.2.5.1. Biosensor de lacasa.

Se determinaron los límites de detección y la sensibilidad mediante la realización de dos cronoamperometrías catódicas en muestras de catecol e hidroquinona de los biosensores basados en la enzima lacasa, 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac.

La determinación de la sensibilidad del biosensor en catecol se realizó fijando un potencial de -200 mV. La respuesta cronoamperométrica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac se muestra en la Ilustración 64 y la recta de calibrado en la Ilustración 65:

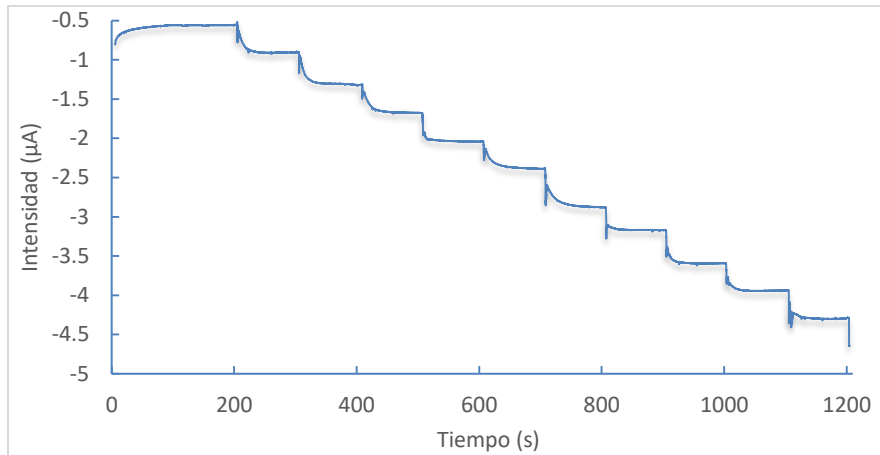


Ilustración 64. Cronoamperometría catódica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac a un potencial fijo de -200 mV con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7.

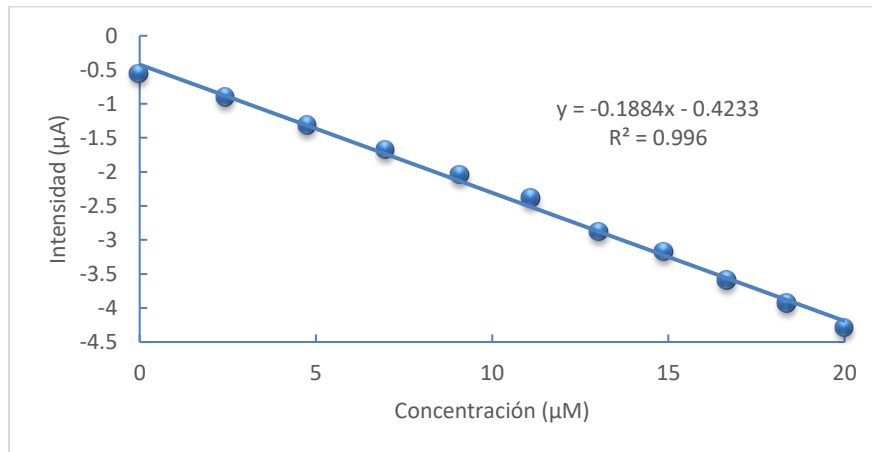


Ilustración 65. Regresión lineal del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac para el catecol.

El límite de detección se calculó mediante la pendiente y la desviación típica del valor de la intensidad de 5 blancos mediante la Ecuación 25:

$$\text{Limite de detección } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{m} = \frac{3 \cdot 0.0011524 \mu A}{0.1884 \mu A/\mu M} = 1.84 \cdot 10^{-2} \mu M$$

Ecuación 25. Límite de detección del biosensor de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac para el catecol.

Se obtuvo para el sensor nanoestructurado de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)] en catecol una sensibilidad de  $0.0011 \mu A/\mu M$  que, con la inmovilización de la enzima lacasa, pasó a  $0.1884 \mu A/\mu M$ . Se logró una extraordinaria mejora de la sensibilidad con la inmovilización de la enzima. Además, se obtuvo un excelente ajuste a la linealidad de  $R^2 = 0.996$ , que evidencia un comportamiento lineal entre los valores de intensidad catódica y la concentración de catecol.

El límite de detección obtenido para el sensor nanoestructurado fue de  $LOD = 5.7 \cdot 10^{-1} \mu M$ , mientras que para el biosensor con la enzima lacasa inmovilizada a  $LOD = 1.84 \cdot 10^{-2} \mu M$ . La



mejora obtenida tras la inmovilización enzimática permitió obtener un límite de detección inferior, y por tanto un sensor más sensible.

La presencia de la enzima lacasa en el biosensor produjo una trascendental mejora en aspectos determinantes del sensor como son la sensibilidad y el límite de detección.

De forma análoga, se obtuvo el valor de la sensibilidad del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac en la hidroquinona. La cronoamperometría catódica se realizó a un potencial de reducción de -400 mV. La respuesta cronoamperométrica del biosensor con lacasa en hidroquinona se muestra en la Ilustración 66:

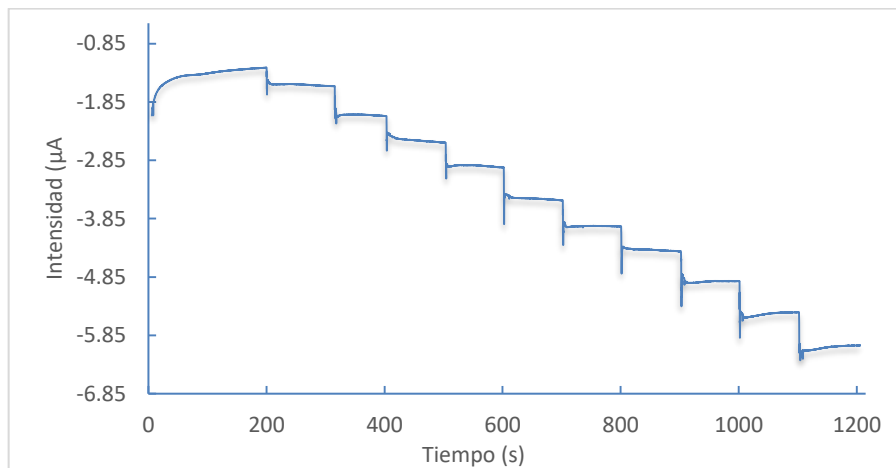


Ilustración 66. Cronoamperometría catódica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac a un potencial fijo de -400 mV con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución de hidroquinona  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7.

Con los valores de intensidad obtenidos inmediatamente antes de cada adición y los valores de concentración correspondientes, se realizó la recta de calibrado que se presenta en la Ilustración 66:

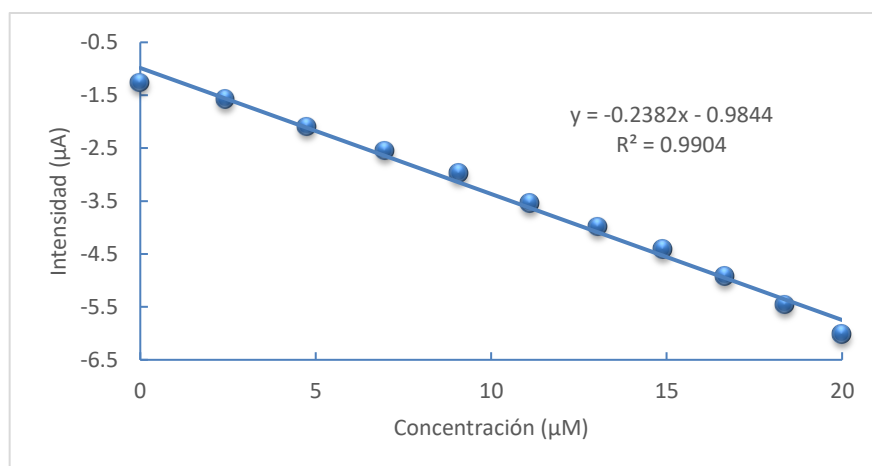


Ilustración 67. Regresión lineal del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac para la hidroquinona.



Mediante la pendiente y el valor de la desviación típica de 5 blancos se calculó el límite de detección:

$$\text{Limite de detección } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{m} = \frac{3 \cdot 0.000101 \mu A}{0.2382 \mu A / \mu M} = 1.27 \cdot 10^{-3} \mu M$$

**Ecuación 26. Límite de detección del biosensor de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac en hidroquinona.**

La sensibilidad obtenida para el sensor nanoestructurado en hidroquinona fue de 0.0053  $\mu A/\mu M$ , alcanzando para el biosensor modificado con lacasa una sensibilidad de 0.2382  $\mu A/\mu M$ . Como en el caso anterior, el ajuste a la linealidad fue excelente de  $R^2 = 0.9904$ , exhibiendo una alta relación lineal entre la intensidad y la concentración de hidroquinona para el funcionamiento del biosensor.

El límite de detección que se obtuvo para el sensor nanoestructurado fue de  $LOD = 1.74 \cdot 10^{-1} \mu M$  mientras que, para el biosensor fue de  $LOD = 1.27 \cdot 10^{-3} \mu M$ , por lo que se logró un límite de detección inferior, demostrando así una mejora en el funcionamiento del sensor tras la inmovilización enzimática.

La inmovilización de enzima lacasa produjo una notable mejora en todos los aspectos característicos del sensor como son la sensibilidad y el límite de detección, lo que convierte al biosensor estudiado en una alternativa potente para el análisis de trazas de fenoles.

#### **5.2.5.2. Biosensor de tirosinasa.**

Para el biosensor nanoestructurado con la enzima tirosinasa inmovilizada en su superficie, se realizaron dos cronoamperometrías catódicas para la determinación de las sensibilidades y de los límites de detección en muestras de catecol e hidroquinona siguiendo el protocolo de ensayo descrito con anterioridad.

Se determinó, en primer lugar, la sensibilidad del biosensor en catecol. Para ello se procedió con una cronoamperometría catódica fijando un potencial de -270 mV. La respuesta cronoamperométrica se puede observar en la Ilustración 68:

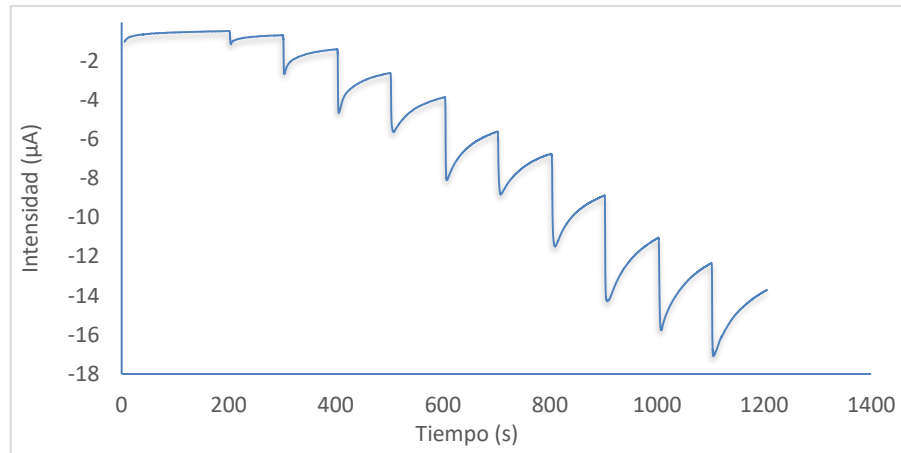


Ilustración 68. Cronoamperometría catódica del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir a un potencial fijo de -270 mV con adiciones sucesivas de 1 mL de disolución de catecol  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 0,01 M pH 7.

Con la recta de regresión mostrada en Ilustración 69 entre la intensidad y la concentración se obtuvo la sensibilidad:

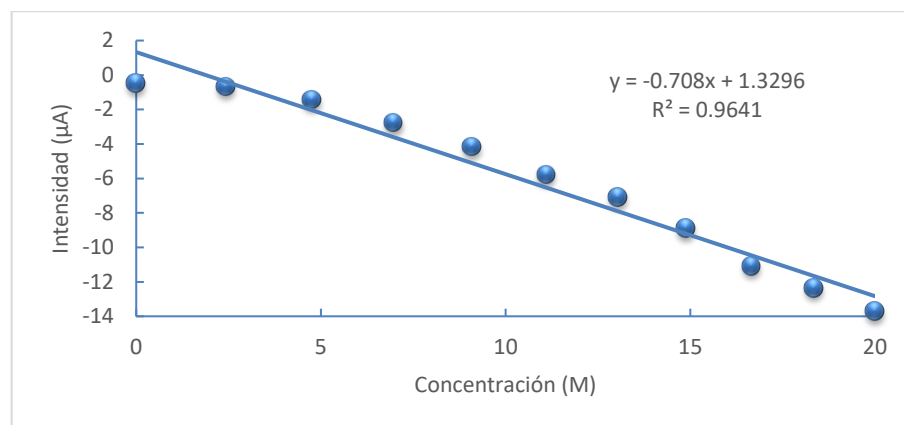


Ilustración 69. Regresión lineal del biosensor 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir para el catecol.

El límite de detección obtenido fue:

$$\text{Limite de detección } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{m} = \frac{3 \cdot 0.000207 \mu A}{0.708 \mu A/\mu M} = 8.8 \cdot 10^{-4} \mu M$$

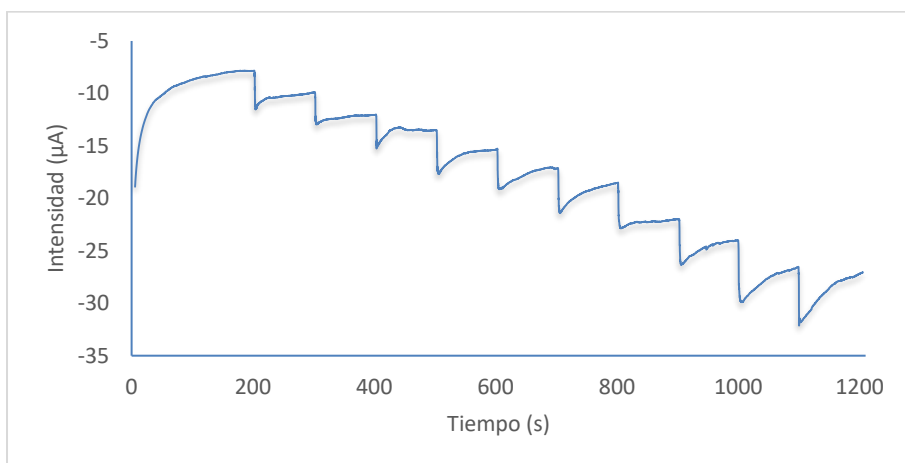
Ecuación 27. Límite de detección del biosensor de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir en catecol.

La sensibilidad paso de un valor de  $0.0011 \mu A/\mu M$  para el sensor nanoestructurado a  $0.708 \mu A/\mu M$  para el biosensor con la enzima tirosinasa. La intensidad presentó un fuerte carácter lineal en función de la concentración con un ajuste de  $R^2 = 0.9641$ .

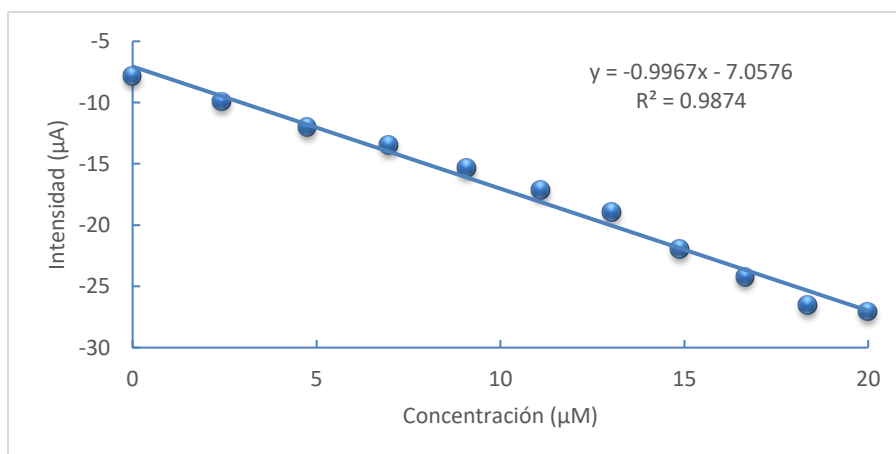
El límite de detección del sensor nanoestructurado fue de  $LOD = 5.7 \cdot 10^{-1} \mu M$ , pasando para el caso del biosensor a  $LOD = 8.8 \cdot 10^{-4} \mu M$ .

La presencia de la enzima tirosinasa otorgó al biosensor una extraordinaria mejora de todos sus parámetros. El límite de detección obtenido propicia el uso de este biosensor para la detección a nivel de trazas del catecol.

Finalmente se determinó la sensibilidad en hidroquinona. Para este propósito se realizó una cronoamperometría catódica a un potencial fijo de -740 mV obteniendo el resultado mostrado en la Ilustración 70:



La recta de regresión correspondiente a las adiciones de catecol para el biosensor se obtuvo:



El límite de detección se calculó mediante el valor de la pendiente de la recta y el valor de la desviación típica de 5 blancos mediante la Ecuación 28:



$$\text{Limite de detección } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{m} = \frac{3 \cdot 0.000258 \mu A}{0.9967 \mu A / \mu M} = 7.77 \cdot 10^{-4} \mu M$$

**Ecuación 28. Límite de detección del biosensor de configuración 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir para la hidroquinona.**

Si se comparan los resultados obtenidos con los del sensor nanoestructurado, se pasó de una sensibilidad de 0.0053  $\mu A/\mu M$  a una sensibilidad de 0.9967  $\mu A/\mu M$  tras la inmovilización enzimática. El ajuste a la linealidad presentó un valor de  $R^2 = 0.9874$ , demostrando un comportamiento lineal muy pronunciado entre la intensidad y la concentración de hidroquinona.

El LOD tránsito desde un valor de  $LOD = 1.74 \cdot 10^{-1} \mu M$  en el sensor nanoestructurado, hasta un  $LOD = 7.77 \cdot 10^{-4} \mu M$  para el biosensor con tirosinasa.

La inmovilización de la enzima tirosinasa, combinado con el efecto amplificación del sustrato proporcionado por el mediador electrónico (ftalocianina de cobre), proporcionó un biosensor con una extraordinaria mejora en la respuesta de la señal de la intensidad catódica y con una excelente sensibilidad. Por el contrario, el biosensor presentó el pico de reducción para un potencial muy elevado. El límite de detección que se obtuvo proporcionó unos biosensores que responden a una concentración a nivel de trazas del analito, la hidroquinona.

### 5.2.6. Tabla de resumen de las prestaciones de los biosensores

A modo de resumen, se presenta la siguiente tabla con las principales prestaciones de los biosensores elaboradas:

Biosensor →	2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Lac		2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)]-Tir		
	Catecol	Hidroquinona	Catecol	Hidroquinona	
<i>Difenol</i> →					
<i>Reproducibilidad</i>					
<i>Cv %</i>	4.21%	3.04%	4.43%	8.11%	
<i>Repetitividad Cv</i>					
<i>%</i>	2.30%	1.24%	26.00%	14.86%	
<i>Límite de detección (<math>\mu M</math>)</i>	0.0184	0.00127	0.00088	0.000777	$\mu M$
<i>Potencial catódico (mV)</i>	-200	-400	-270	-740	mV



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## *Conclusiones*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES





## 6. Conclusiones.

Se han desarrollado con éxito biosensores voltamétricos para el análisis de dos difenoles de interés en la industria alimentaria, catecol e hidroquinona, empleando para ello, películas delgadas elaboradas con materiales electrocatalíticos, mediante la técnica Layer by Layer (LbL) sobre las que se inmovilizaron las enzimas oxidorreductasas lacasa y tirosinasa.

- Utilizando la técnica LbL se han preparado capas sensibles con cargas electrostáticas alternadas, chitosán (+), AuNPs (-) y CuPc (-). Esta disposición ha proporcionado las propiedades combinadas de los tres materiales. El chitosán facilita la inmovilización de la enzima en la superficie. Las AuNPs mejoran la transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo. La CuPc es un mediador electrónico que potencia la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato.
- Se han evaluado multitud de configuraciones con el fin de optimizar los fenómenos de mediación electrónica, necesaria para obtener una mejora en la catálisis enzimática. La configuración nanoestructurada seleccionada ha sido aquella en la que la CuPc está en la última capa, 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)].

La caracterización de los sensores mediante espectroscopía ultravioleta-visible e infrarroja, ha evidenciado la correcta adsorción de los tres materiales y el buen control del espesor de las distintas películas. Los coeficientes de variación obtenidos para la reproducibilidad del sensor (2,24 % y 0,65 % para catecol e hidroquinona respectivamente) demuestran que la técnica LbL es una técnica que permite un excelente control de la estructura.

La respuesta electroquímica de las películas LbL ha permitido concluir que la mediación electrónica en el sensor es un fenómeno de superficie. Una vez aportada una cantidad superficial suficiente de mediador electrónico, no es posible mejorar la intensidad de la señal. El espesor óptimo del sensor resultó ser  $n=2$ , obteniendo la estructura 2X[(CHI)-(AuNPs)-(CHI)-(CuPc)].

Asimismo, la repetitividad obtenida, pone de manifiesto que el sistema de películas elaborado es robusto y estable con unos coeficientes de variación de 0,69 % y 3,64 % para catecol e hidroquinona respectivamente.

Las cronoamperometrías realizadas para los sensores elaborados mediante LbL muestran unos buenos límites de detección, que fueron de  $5.7 \cdot 10^{-1} \mu\text{M}$  y  $1.74 \cdot 10^{-1} \mu\text{M}$  para catecol e hidroquinona respectivamente. La sensibilidad obtenida para la hidroquinona fue casi 5 veces superior a la obtenida para el catecol.



- Se han obtenido biosensores, depositando las enzimas lacasa (Lac) y tirosinasa (Tir) sobre las películas LbL y se han inmovilizado mediante Cross-Linking con glutaraldehído. La inmovilización de las enzimas confiere a los sensores una mayor especificidad hacia los analitos, un aumento de sensibilidad y un límite de detección varios ordenes de magnitud inferior.
- Se ha demostrado que el efecto catalítico de las enzimas se ve favorecido por la nanoestructura del sensor. Así, la presencia de CuPc mejora de la transferencia electrónica entre la enzima y el sustrato, propiciando un aumento de la intensidad catódica en el biosensor, y en consecuencia una importante mejora de la sensibilidad del sensor. Las AuNPs mejoran la transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo, permitiendo obtener un menor potencial de reducción.
- El Cross-Linking empleado permite la retención de la enzima sin pérdida de actividad enzimática.
  - Se ha corroborado que los biosensores con la enzima lacasa poseen una buena reproducibilidad, repetitividad y unos límites de detección muy bajos para catecol e hidroquinona. La inmovilización realizada propicio la retención de la enzima y evito su fuga al medio analizado.
  - La inmovilización de la tirosinasa en los biosensores proporciona una extraordinaria sensibilidad y unos límites de detección excelentes para el catecol y la hidroquinona. Se observó, sin embargo, una leve fuga de la enzima tirosinasa no enlazada covalentemente. Sin embargo, esta fuga de enzimas es casi instantánea y no presenta influencia sobre los valores de intensidad y potencial del pico catódico, quedando está afirmación demostrada por la pronunciada linealidad entre la concentración y la intensidad de la señal obtenida en las cronoamperometrías para ambos fenoles.

Los biosensores elaborados pueden ser utilizados indistintamente para la determinación de catecol o hidroquinona, pero presentan unas propiedades distintas que los capacitan mejor para una muestra o un tipo de determinación.

Los biosensores constituidos con lacasa resultan más adecuados para determinaciones en las que se requiera una menor sensibilidad, siendo válidos para determinaciones preferentemente de hidroquinona, con un límite de detección de  $LOD = 1,27 \cdot 10^{-3} \mu M$ . Al presentarse una mejor repetitividad ( $C_v = 1,24\%$  para hidroquinona), estos sensores se podrían utilizar para determinaciones en continuo y discontinuo indistintamente, y pueden ser de varios usos. Son unos sensores más económicos por ser reutilizables y por ser la lacasa una enzima mucho más económica que la alternativa.



Los sensores constituidos con tirosinasa resultan más adecuados para determinaciones en las que se requiera una alta sensibilidad, y son válidos preferentemente para determinación de catecol con un límite de detección de  $LOD = 8,8 \cdot 10^{-4} \mu M$ . Para la determinación de hidroquinona, el potencial de reducción requerido resulta demasiado alto. Los sensores con tirosinasa poseen una mala repetitividad ( $C_v = 26 \%$  para la intensidad en catecol), lo que hace que resulten más adecuados para medir en discontinuo requiriéndose, además, un tiempo de estabilización hasta alcanzar el valor definitivo de la intensidad. Los biosensores con tirosinasa son menos competitivos ya que, pese a ser reutilizables, el precio de esta enzima es mucho mayor que el de la otra opción, la lacasa.

En cuanto a los inconvenientes de los biosensores indicar que, en la fase inicial de prototipo, los biosensores resultan costosos y tienen una elaboración compleja y laboriosa. Pese a la dificultad en la elaboración, las etapas de preparación del sensor son susceptibles de automatización, lo que reduciría en gran medida el coste de elaboración.

Los biosensores obtenidos en el actual trabajo, y validados para muestras patrón de catecol e hidroquinona, muestran unos resultados muy prometedores para su implementación en la industria alimentaria. Estos biosensores poseen unas excelentes prestaciones para la determinación de fenoles en muestras alimentarias, lo que permitiría realizar un control en todas las fases del proceso productivo. Dependiendo del tipo de muestra a analizar, del tipo de proceso y teniendo en cuenta los requerimientos y restricciones anteriormente mencionadas, estos biosensores son susceptibles de implementación en la industria alimentaria.



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## *Bibliografía.*



Universidad de Valladolid

DESARROLLO DE BIOSENSORES  
NANOESTRUCTURADOS PARA EL ANÁLISIS DE  
FENOLES DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## 7. Bibliografía.

- [1] P. y A. Ministerio de Agricultura, “Industria agroalimentaria.” [Online]. Available: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/>. [Accessed: 15-Jan-2019].
- [2] M. Orive Palacín, “La Gestión de la Cadena de Suministro en la Era de la Industria 4.0,” p. 78, 2017.
- [3] C. Jaimes, J., Rios, I. y Severiche, “Nanotecnología y sus aplicaciones en la industria de alimentos Nanotechnology and its applications in the food industry,” *Rev. Aliment. Hoy*, vol. 25, no. 41, pp. 51–76, 2017.
- [4] G. Mendoza Uribe and J. L. Rodríguez López, “La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso,” *Rev. Perfiles Latinoam.*, vol. 14, no. 29, pp. 161–186, 2007.
- [5] M. De Educación, A. E. Sileoni, L. María, R. Almandoz, and I. R. Díaz, “Materiales y Materia primas,” p. 41, 2011.
- [6] “Grupo UvaSens.” [Online]. Available: <http://www.eis.uva.es/inorganica/index.php/component/content/article/73-grupo-uvasens>. [Accessed: 05-Nov-2018].
- [7] ESTIIC, “Aplicaciones industriales de la nanotecnología Proyecto NANO-SME,” *Rev. Inf. Technol. y Soc.*, pp. 58–61, 2009.
- [8] S. Alegret, M. del Valle, and A. Merkoçi, “Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores : curso teórico-práctico,” 2004.
- [9] M. E. D. Serrano, M. L. López, and T. D. R. S. Espuñes, “Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal,” *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 37, no. 4, pp. 58–68, 2006.
- [10] J. M. Peñarrieta, L. Tejeda, P. Mollinedo, J. L. Vila, and J. A. Bravo, “Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos,” *Rev. Boliv. Química*, vol. 31, no. 2, pp. 68–81, 2014.
- [11] E. G. CREUS, “Compuestos fenólicos Un análisis de sus beneficios para la salud,” vol. 23, pp. 80–84, 2004.
- [12] M. Lampreave, J. Valls, M. Nadal, and L. Arola, “Compuestos Fenólicos En La Calidad De Los Vinos Tintos De Crianza,” *Aliment. equipos y Technol.*, vol. 19, no. 2, pp. 119–124, 2000.
- [13] R. Pallàs Areny, *Sensores Y Acondicionadores De Señal*, vol. XXXIII, no. 2. 2005.
- [14] N. Castellanos, “Reactores Químicos y Biológicos,” pp. 1–19, 2014.
- [15] M. De, L. Velázquez, M. Ángel, O. Vargas, and F. E. Buch-, “Termodinámica , Cinética y Enzimas,” 2014.
- [16] J. M. López Nicolás and C. Francisco García, “Los cuatro mosqueteros de la cinética



- enzimática," *Rev. Eubacteria Los*, vol. 34, pp. 39–43, 2015.
- [17] A. C. and A. Lodeiro, *Catálisis enzimática: fundamentos químicos de la vida*. 2016.
- [18] B. Franklin, *Las enzimas*, vol. 2. 1995.
- [19] A. L. Lehninger, *Las bases moleculares de la estructura y su función celular*. 2003.
- [20] M. F. Fernández, "Laccase immobilization: methods and potential industrial applications," 2013.
- [21] Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education, "ACTIVE LACCASE FROM TRAMETES VERSICOLOR COMPLEXED WITH 2,5-XYLIDINE," *RCSB PROTEIN DATA BANK*. [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/3d-view/1KYA/1>. [Accessed: 11-Oct-2018].
- [22] G. Juanita, "Purificación y Caracterización Parcial de las Lacasas de Trametes maxima CU1 y su Aplicación en la Degradación de Colorantes Textiles," 2009.
- [23] A. I. C. PORTILLA, "DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS LACASA-MEDIADOR: EMPLEO DE MEDIADORES DE ORIGEN NATURAL Y MEJORA DE LACASAS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA," 2007.
- [24] M. Zamora, "Inmovilización De Tirosinasa Sobre Esteres Cinámicos De Carbohidratos," 2013.
- [25] Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education, "Crystal structure of PPO3, a tyrosinase from *Agaricus bisporus*, in deoxy-form that contains additional unknown lectin-like subunit," *RCSB Protein Data Bank*. [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/3d-view/2Y9W/1>. [Accessed: 15-Nov-2018].
- [26] E. O. Piñero, "Purificación y Clonación de Sistemas Enzimáticos para la Bioconversión de Monofenoles en Difenoles: Polifenol Oxidasa Tirosinasa y Fenol Hidroxilasa," 2007.
- [27] M. S.-P. López, "BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS DE TIROSINASA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN MEDIOS ACUOSOS Y NO ACUOSOS," 1959.
- [28] B. S. Fernández, "Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos," 2012.
- [29] N. T. Tan, *Nanociencia Y Nanotecnología*. 2018.
- [30] R. M. Iost and F. N. Crespilho, "Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–10, 2012.
- [31] M. Keeney, X. Y. Jiang, M. Yamane, M. Lee, S. Goodman, and F. Yang, "Nanocoating for biomolecule delivery using layer-by-layer self-assembly," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 45, pp. 8757–8770, 2015.
- [32] W. Yuan, Z. Lu, and C. M. Li, "Controllably layer-by-layer self-assembled polyelectrolytes/nanoparticle blend hollow capsules and their unique properties," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 13, pp. 5148–5155, 2011.





- [33] S. V. y Parraguirre, "Fabricación y caracterización de óxidos conductores transparentes depositados por medio de Sputtering para aplicaciones en dispositivos fotovoltaicos," 2016.
- [34] S. Al-Qadi and C. Remuñán-López, "Nanopartículas metálicas: oro," *Monogr. XXVIII Nanotecnología Farm.*, pp. 8–17, 2009.
- [35] A. C. Lucioni, "SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS POR REDUCCIÓN DE H[AuCl<sub>4</sub>]," 2007.
- [36] B. Y. Wu *et al.*, "Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 12, pp. 2854–2860, 2007.
- [37] V. Carralero Sanz, *Preparación De Biosensores Enzimáticos E Inmunosensores Basados En Electrodo Modificados Con Nanopartículas De Oro*. 2009.
- [38] J. G. Monter-Miranda *et al.*, "EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE QUITINA Y QUITOSANO DE *Brachystola magna* (Girard)," 2016.
- [39] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.
- [40] P. Kumar Dutta, J. Dutta, and V. S. Tripathi, "Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications," *J. Sci. Ind. Res.*, vol. 63, no. January, pp. 20–31, 2004.
- [41] L. Ángel, G. Rodríguez, and B. I. Kharisov, "Pigmentos tipo ftalocianinas no sustituidas: Obtención y propiedades," *Ingenierías*, vol. XI, no. 38, pp. 43–51, 2008.
- [42] B. Ballesteros Moyano, "Nuevos sistemas dador-aceptor y ftalocianina-nanotubo: síntesis, caracterización y estudios fotofísicos," 2008.
- [43] A. T. G. SUÁREZ, "SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA FTALOCIANINA DE ALUMINIO SULFONADA MEDIANTE ÁCIDO CLOROSULFÓNICO," 1973.
- [44] M. P. Carrillo, "Caracterización Cinética y Aplicaciones Biotecnológicas de Peroxidasas," 2007.
- [45] C. Biol, M. Tfno, and DR. MIGUEL ARROYO, "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones," *Ars Pharm.*, pp. 1–17, 1998.
- [46] C. V.-M. Raúl Fajardo-Ochoa, Juan Alberto Osuna-Castro, "INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS Y ENZIMAS," *Acta Química Mex.*, vol. 3, no. 6, pp. 42–56, 2011.
- [47] L. Cedillo- Romero, C. M. Hernández-Mejía, A. Zapata-Sánchez, N. Balagurusamy, and M. P. Escareño-Luévanos, "Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas," *Rev. Cient. la Univ. Auton. Coahuila*, vol. 6, no. 11, pp. 1–9, 2014.
- [48] L. S. Saldaña and E. S. Anduaga, "Antisépticos y desinfectantes," *Dermatología Peru.*, vol. 15, no. 2, pp. 82–103, 2005.
- [49] C. Lárez Velásquez, "Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos," *Rev. Iberoam.*



- Polímeros*, vol. 4, no. 2, pp. 91–109, 2003.
- [50] L. Salazar and L. Mendoza, “Utilization of chitin and chitosan based materials for protease immobilization: stabilization effects and applications,” *Rev. Mex. Ing. Quim.*, vol. 8, no. 3, pp. 129–150, 2014.
- [51] H. Chen, Q. Zhang, Y. Dang, and G. Shu, “The Effect of Glutaraldehyde Cross-Linking on the Enzyme Activity of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase on Chitosan Bead,” vol. 5, no. 7, pp. 932–935, 2013.
- [52] L. Perentena, C. Gonzáles, B. Celis, A. Valbuena, and M. Colina, “Síntesis de bases de schiff derivadas del quitosano por reacción con p-dimetilaminobenzaldehído y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído,” 2015.
- [53] F. Rouessac, F. Rouessac, G. Ourisson, and L. Cuadros Rodríguez, *Análisis químico : métodos y técnicas instrumentales modernas*. 2003.
- [54] E. D. Olsen, *Metodos Opticos de Analisis*. 1990.
- [55] J. F. R. Kenneth A. Rubinson, *Analisis Instrumental - Rubinson y Rubinson*. .
- [56] Francisco Bermejo Martínez; Adela Bermejo Barrera; M del Pilar Bermejo Barrera, *Tratado de Química Analítica General Cuantitativa e Instrumental*. 1991.
- [57] A. J. B. L. R. Faulkner, *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*, vol. 30, no. 1. 2000.
- [58] J. E. B. A. J. B. Amemiya Shigeru, Melisa D. Arning, *Handbook of Electrochemistry*. .
- [59] L. F. Hamilton, S. G. Simpson, and D. W. Ellis, *Cálculos de química analítica*. 1981.
- [60] C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, C. García-Cabezón, and M. Rodríguez-Méndez, “Discrimination of Milks with a Multisensor System Based on Layer-by-Layer Films,” *Sensors*, vol. 18, no. 8, p. 2716, 2018.
- [61] Alejandro Baeza Reyes y M. en C. Arturo de Jesús García Mendoza, “Principios de electroquímica analítica Colección de documentos de apoyo,” *Scr. Mater.*, vol. 43, no. 11, pp. 997–1001, 2000.
- [62] J. M. Carriel, A. A. Obrebska, R. Bru-martínez, and M. C. Patiño, “Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento,” vol. 7, no. 1, pp. 23–31, 2014.
- [63] A. P. Porras and A. López, “Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos,” *Temas Sel. Ing. Aliment.*, vol. 3, no. 1, pp. 121–134, 2009.
- [64] U. E. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo, Ministerio de trabajo y asuntos sociales, “Fichas Internacionales de Seguridad Química Fichas Internacionales de Seguridad Química,” pp. 66–67, 1994.
- [65] M. Abraham López, “Estudio del proceso de degradación electroquímica de colorantes de tipo ftalocianina en matrices acuosas contaminadas con azul lanasol,” 2006.