



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

# **Sensores basados en la tecnología de impresión molecular modificados con nanohilos de plata para el análisis de azúcares de interés en la industria alimentaria**

Autora:

Granados López, Sara

Tutoras:

Rodríguez Méndez, María Luz

Salvo Comino, Coral

Departamento de Química Física y  
Química Inorgánica

Valladolid, septiembre 2020.



## Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos aquellos que han intervenido en el desarrollo de este trabajo de fin de grado y que de algún modo lo han hecho posible.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi profesora y tutora María Luz Rodríguez Méndez, quien me ha dado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y gracias a la cual, he aprendido y adquirido conocimientos de gran valor.

A mis compañeros de laboratorio quienes desde un principio me hicieron formar parte del equipo, a pesar de esta corta experiencia, gracias chicos por el tiempo compartido. En especial quiero hacer mención a mi cotutora, Coral, por su apoyo, dedicación y por su gran paciencia; estoy segura de que Lucía va a tener una mami fantástica.

A mis amigos, en especial a ti Marta, sin ella esta carrera no hubiera sido lo mismo. A pesar de que el tiempo compartido en clase fue poquito, ha sido el suficiente. Nunca olvidaré aquellas clases de matemáticas y física donde las risas estaban aseguradas o las tardes de exámenes repletas de conversaciones de dudas; lo que está claro es que sin tu apoyo esta carrera hubiera sido una larga cuesta arriba.

Por otro lado, quiero agradecer a mi gran apoyo, mi confidente, mi amigo, mi pareja, Rubén. Gracias por creer en mí en todo momento, por animarme con esta carrera, por hacer que no me rinda, por estar siempre a mi lado a pesar de las circunstancias, y sobre todo, por aguantarme durante estos 5 años que sin duda creo te habrán servido de prácticas para psicología. Sin olvidar a mi segunda familia, Chus y Oscar, con vosotros las palabras de agradecimiento sobran. Sé que no os gusta que os lo diga, pero gracias, gracias por vuestro apoyo incansable, y sobre todo, por tratarme siempre como a la niña de la casa.

Finalmente, gracias a mi familia sin los cuales esto no hubiera sido posible. En especial a mis padres, por vuestro apoyo, confianza, esfuerzo y sacrificio, gracias a ellos soy lo que soy y he podido formarme en lo que más me gusta. Además, quiero dar las gracias a mi hermano Diego con el que siempre he podido contar. Sin él este camino no hubiera sido el mismo, qué sería de nosotros sin discutir sobre las ventajas y dificultades de la física e ingeniería.

Muchas gracias a todos.



## Resumen

Se han desarrollado sensores electroquímicos basados en polímeros de impresión molecular (MIP) para la detección de lactosa, glucosa y galactosa. Éstos se sintetizaron mediante la electropolimerización de una película compuesta por un biopolímero de interés, chitosán, modificada con nanohilos de plata (AgNWs), sobre un electrodo de diamante dopado con boro (BDD) en presencia de la molécula plantilla. Utilizando voltametría cíclica (CV), su funcionamiento se comparó con otros sensores, NIP, obtenidos bajo las mismas condiciones sin la molécula plantilla.

Primero, se sintetizaron AgNWs de tamaño homogéneo a través del método poliol. Además, se caracterizaron mediante espectroscopía: UV-VIS, DRX y AFM.

Posteriormente, se analizó la configuración óptima del sensor frente a lactosa. Se evaluó su repetitividad, reproducibilidad y sensibilidad, donde se comprobó una posible saturación en lactosa  $10^{-3}M$ .

Finalmente, se sintetizaron sensores para la detección de glucosa y galactosa mediante CV, pero como no mostraron un buen funcionamiento es necesario continuar investigando.

## Palabras clave

Sensores electroquímicos, MIP, AgNWs, chitosán, leche.



## Abstract

In this piece of work, electrochemical sensors based on molecular imprinted polymers (MIP) have been developed for the detection of lactose, glucose and galactose. All of these were synthesized through the electropolymerization of a coating composed of a biopolymer of interest, chitosan, modified with silver nanowires (AgNWs), on a boron-doped diamond electrode (BDD) in the presence of the template molecule. Using cyclic voltametry (CV), its performance was compared to other sensors, NIP, obtained under the same conditions without the template molecule.

Firstly, AgNWs of homogeneous size were synthesized through the polyol method. In addition, AgNWs were characterized by spectroscopy: UV-VIS, XRD and AFM.

Secondly, the optimal configuration of the sensor was analyzed against lactose. For which it was studied: its repeatability, reproducibility and sensitivity, where a possible sensor saturation was checked at concentration of lactose in solution  $10^{-3}$  M.

Finally, sensors were synthesized for the detection of glucose and galactose by CV, but as they did not show a good performance, further optimization is needed.

## Keywords

Electrochemical sensors, MIP, AgNWs, chitosan, milk.





# Índice

1.	Introducción y objetivos.....	3
1.1	Introducción.....	3
1.2	Objetivos.....	4
2.	Fundamento teórico.....	8
2.1	Contextualización: Nanociencia y Nanotecnología.....	8
2.1.1	La nanociencia en la industria alimentaria. Nanosensores.....	8
2.2	La industria láctea. Materia prima: leche.....	10
2.2.1	Evaluación de la calidad de la leche.....	12
2.2.2	Características organolépticas de la leche.....	12
2.2.3	Propiedades físico - químicas.....	13
2.2.4	Composición química de la leche.....	16
2.3	Sensores utilizados.....	29
2.3.1	Definición y Clasificación de los sensores.....	29
2.3.2	La tecnología de polímeros de impresión molecular (MIP).....	32
2.3.2.1	Origen e historia de la tecnología de impresión molecular.....	36
2.3.2.2	Sensores basados en la tecnología de impresión molecular.....	38
2.3.3	Agentes reticulantes. Glutaraldehído.....	42
2.4	Electrodos empleados en el análisis electroquímico.....	44
2.4.1	Electrodos BDD.....	45
2.4.1.1	Obtención de los electrodos BDD.....	46
2.5	Sensores basados en nanomateriales.....	47
2.5.1	Los nanohilos de plata (AgNWs).....	48
2.5.2	Desarrollo de sensores basados en AgNWs.....	49
2.5.2.1	Síntesis de AgNWs.....	51
2.5.2.2	Técnicas de caracterización de los AgNWs.....	56
2.6	Técnicas electroquímicas.....	67
2.6.1	Métodos voltamétricos o voltamperométricos.....	73
2.6.1.1	Voltametría cíclica.....	74
2.6.1.2	Cronoamperometría.....	79
2.7	Chitosán o quitosano.....	84
2.7.1	Chitosán combinado con materiales nanoestructurados.....	87

3.	Reactivos, materiales y equipos .....	91
3.1	Reactivos .....	91
3.2	Materiales.....	92
3.3	Equipos .....	92
4.	Metodología y Desarrollo experimental .....	96
4.1	Desarrollo de sensores nanoestructurados .....	96
4.1.1	Preparación de las disoluciones .....	96
4.1.2	Procedimiento experimental .....	99
4.1.2.1	preparación de los AgNWs.....	99
4.1.2.2	Limpieza de electrodos de diamante dopado con boro (BDD) ...	101
4.1.2.3	Preparación de los sensores MIP.....	102
4.1.1.1	Caracterización de AgNWs.....	105
4.1.2	Estudio del comportamiento electroquímico .....	107
4.1.2.1	Elaboración del sensor nanoestructurado MIP y NIP. ....	107
4.1.2.2	voltametría cíclica .....	109
5.	Resultados experimentales y discusión de resultados .....	115
5.1	Caracterización de AgNWs. ....	115
5.1.1	Espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-VIS) .....	115
5.1.2	Espectroscopía de Fuerza Atómica Molecular (AFM) .....	116
5.1.3	Difracción de rayos-X .....	117
5.2	Optimización de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD.....	118
5.2.1	Selección del sensor frente a la detección de lactosa .....	137
5.2.1.1	Estudio de la sensibilidad del sensor frente a lactosa.....	139
5.2.1.2	Estudio de la reproducibilidad del sensor de lactosa.....	141
5.2.1.3	Estudio de la repetitividad del sensor de lactosa .....	142
5.3	Sensor de glucosa: MIP [CHI-AgNWs- Glucosa]/BDD .....	143
5.4	Sensor de galactosa: MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD.....	146
6.	Conclusiones y trabajo futuro .....	152
6.1	Conclusiones .....	152
6.2	Trabajo futuro.....	155
7.	Bibliografía.....	159



# Índice de figuras

<b>FIGURA 1</b> REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA LACTOSA PARA FORMAR GLUCOSA Y GALACTOSA. ....	20
<b>FIGURA 2</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA CASEÍNA.....	25
<b>FIGURA 3</b> ESTRUCTURA DE UN SENSOR. ....	30
<b>FIGURA 4</b> MIP BASADOS EN MÉTODOS DE TRANSDUCCIÓN ELECTROQUÍMICOS (ROJO), MIP BASADOS EN MÉTODOS DE TRANSDUCCIÓN ELECTROQUÍMICOS EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE AZÚCARES (ROSA). PUBLICACIONES CORRESPONDIENTES AL PERIODO 1999-2019 OBTENIDAS DE LA BASE DE DATOS: SCOPUS (ELSEVIER). ....	37
<b>FIGURA 5</b> ESQUEMA DE FABRICACIÓN DE UN SENSOR MIP [CHI-AGNWS-MOLÉCULA PLANTILLA]/BDD EN UNA CELDA ELECTROLÍTICA CON UNA CONFIGURACIÓN DE TRES ELECTRODOS (ELECTRODO DE TRABAJO, CONTRAELECTRODO Y ELECTRODO DE REFERENCIA) DONDE SE REPRESENTA LA DEPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN A TRAVÉS DE ELECTROPOLIMERIZACIÓN POR CRONOAMPEROMETRÍA SOBRE UN ELECTRODO DE DIAMANTE DOPADO CON BORO (BDD). ....	40
<b>FIGURA 6</b> ESQUEMA DE FABRICACIÓN DE UN SENSOR MIP DONDE SE MUESTRA EL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN Y A CONTINUACIÓN, UN SENSOR MIP DONDE SE HA LLEVADO A CABO EL PROCESO DE ELUCIÓN DE LA MOLÉCULA PLANTILLA. ....	42
<b>FIGURA 7</b> REACCIÓN SIMPLIFICADA DEL PROCESO DE ENTRECRUZAMIENTO DEL CHITOSÁN CON GLUTARALDEHÍDO...	43
<b>FIGURA 8</b> ESTRUCTURA GENÉRICAS DE UNA BASE DE SHIFF´S CON TRES RADICALES $R_1$ , $R_2$ Y $R_3$ . ....	43
<b>FIGURA 9</b> DIAMANTE DOPADO CON BORO. SE REPRESENTAN LOS HUECOS INTRODUCIDOS POR EL BORO. ....	45
<b>FIGURA 10</b> PROCESO DE CRECIMIENTO DE LOS AGNWS.....	53
<b>FIGURA 11</b> REPRESENTACIÓN DE LOS PLANOS CRISTALOGRAFICOS [111] Y [100] DE UNA "NANOBARRA". ....	53
<b>FIGURA 12</b> ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE UN MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA. ....	57
<b>FIGURA 13</b> ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO CORRESPONDIENTE A LAS LONGITUDES DE ONDA DE LA REGIÓN UV-VIS. ....	62
<b>FIGURA 14</b> ORBITAL MOLECULAR DE LA BANDA DE VALENCIA Y TRANSICIONES ELECTRÓNICAS. ....	63
<b>FIGURA 15</b> A RECTA DE LA ECUACIÓN DE LA LEY DE LAMBERT-BEER Y B REPRESENTACIÓN DE LAS DESVIACIONES DE LA LEY DE LAMBERT- BEE. ....	65
<b>FIGURA 16</b> ESQUEMA DE UNA CELDA ELECTROLÍTICA CONECTADA A UN POTENCIOSTATO QUE PRESENTA UN SISTEMA DE TRES ELECTRODOS: ELECTRODO AUXILIAR, ELECTRODO DE REFERENCIA Y ELECTRODO DE TRABAJO ....	71
<b>FIGURA 17</b> VOLTAMETRÍA CÍCLICA. SEÑAL DE EXCITACIÓN TRIANGULAR. ....	74
<b>FIGURA 18</b> VOLTAMOGRAMA CÍCLICO. INTENSIDAD FRENTE A POTENCIAL DEL ANALITO DE INTERÉS ....	75
<b>FIGURA 19</b> DIFUSIÓN DE RÉGIMEN TRANSITORIO. ....	80
<b>FIGURA 20.</b> DIFUSIÓN DE RÉGIMEN ESTACIONARIO ....	82
<b>FIGURA 21</b> CRONOAMPEROGRAMA OBTENIDO DE LA ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE UN POLÍMERO. ....	83

<b>FIGURA 22</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CHITOSÁN. "x" UNIDADES REPETIDAS DE 2-AMINO-2-DESOXI-BETA-D-GLUCOPIRANOSA. "y" UNIDADES REPETIDAS DE 2-ACETILAMINA-2-DESOXI-BETA-D-GLUCOPIRANOSA.....	85
<b>FIGURA 23</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CHITOSÁN DONDE SE MUESTRAN LOS ENLACES DE HIDRÓGENO ENTRE LOS GRUPOS ACETILO E HIDROXILO Y EL GRUPO AMINO E HIDROXILO. ....	86
<b>FIGURA 24</b> EQUIPO EMPLEADO EN LA SÍNTESIS DE AGNWS. ....	100
<b>FIGURA 25</b> EN LA PARTE SUPERIOR DE LA FIGURA Y LEYENDO DE IZQUIERDA A DERECHA SE MUESTRAN LAS ETAPAS DEL PROCESO FINAL DE OBTENCIÓN DE AGNWS. 1) Y 2) DISOLUCIÓN OBTENIDA TRAS UN TIEMPO DE REACCIÓN DE 1H EN LA QUE HAY UNA MEZCLA DE AGNPs Y AGNWS, 3) DISOLUCIÓN OBTENIDA DILUIDA CON ETANOL, 4) PRIMERA CENTRIFUGACIÓN DONDE SE APRECIA LA SEPARACIÓN ENTRE EL SOBRENADANTE Y LOS AGNWS, 5) 2ª CENTRIFUGACIÓN DE AGNWS DILUIDOS EN ETANOL DONDE SE APRECIA LA SEPARACIÓN ENTRE EL SOBRENADANTE Y LOS AGNWS, 6) AGNWS DILUIDOS EN ETANOL ANTES DE LLEVAR A CABO LA ÚLTIMA ETAPA DE LA CENTRIFUGACIÓN, 7) AGNWS OBTENIDOS DE LA ÚLTIMA ETAPA DE CENTRIFUGACIÓN DONDE EL SOBRENADANTE HA SIDO ELIMINADO. ....	101
<b>FIGURA 26</b> ELECTRODOS DE DIAMANTE DOPADO CON BORO (BDD).....	102
<b>FIGURA 27</b> ESPECTROFOTÓMETRO EMPLEADO PARA CARACTERIZAR LOS AGNWS.....	106
<b>FIGURA 28</b> EQUIPO DE MICROSCOPÍA DE FUERZA ATÓMICA MOLECULAR. ....	107
<b>FIGURA 29</b> POTENCIOSTATO UTILIZADO PARA EL ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LOS SENSORES MIP Y NIP. ....	107
<b>FIGURA 30</b> ESQUEMA DE TRABAJO PARA LLEVAR A CABO CRONOAMPEROMETRÍA INCLUYENDO EL SISTEMA DE AGITACIÓN. ....	109
<b>FIGURA 31</b> EQUIPO DE TRABAJO EMPLEADO PARA LLEVAR A CABO LA DETECCIÓN DE LACTOSA Y GLUCOSA MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA. ....	110
<b>FIGURA 32</b> EQUIPO DE TRABAJO EMPLEADO PARA LLEVAR A CABO LA DETECCIÓN DE GALACTOSA MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA. ....	111
<b>FIGURA 33</b> ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE UN MIP [CHI-AGNWS-AZÚCAR]/BDD FRENTE A LA DETECCIÓN DEL AZÚCAR DE INTERÉS.....	111
<b>FIGURA 34</b> ESPECTROSCOPÍA UV-VIS DEL PRODUCTO OBTENIDO DE LA SÍNTESIS DE AGNWS SIN LAVAR (ROJO), AGNWS PURIFICADOS (AZUL) Y SOBRENADANTE (NEGRO). ....	116
<b>FIGURA 35</b> FOTOGRAFÍA OBTENIDA MEDIANTE MICROSCOPÍA DE FUERZA ATÓMICA (AFM) DE UNA MUESTRA DE AGNWS DEPOSITADA SOBRE UN ELECTRODO BDD. ....	117
<b>FIGURA 36</b> PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X DE LOS AGNWS. ....	118
<b>FIGURA 37</b> ELECTRODEPOSICIÓN POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA: A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. ....	120
<b>FIGURA 38</b> CRONOAMPEROGRAMA OBTENIDO SIN AGITACIÓN: A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. AMBOS SENSORES CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1MG/ML.....	121
<b>FIGURA 39</b> A) VOLTAMOGRAMA DE UN ELECTRODO BDD EN BLANCO EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01M. B) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M: MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD (NEGRO) CON UNA	

CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1 MG/ML, NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO ) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1 MG/ML Y UN ELECTRODO BDD BLANCO (AZUL). .....	123
<b>FIGURA 40</b> CRONOAMPEROGRAMA OBTENIDO SIN AGITACIÓN: A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. AMBOS SENSORES CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5MG/ML. ....	124
<b>FIGURA 41</b> A) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M: MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD (NEGRO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5 MG/ML, NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5 MG/ML Y DE UN ELECTRODO BDD BLANCO (AZUL). A.1) DETALLE DE LOS PICOS ANÓDICOS DE LOS SENSORES MIP, NIP CORRESPONDIENTES.....	125
<b>FIGURA 42</b> CRONOAMPEROGRAMA OBTENIDO EN PRESENCIA DE AGITACIÓN DE UN: A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y UN B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. AMBOS SENSORES CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5 MG/ML. ....	127
<b>FIGURA 43</b> A) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M: MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD (NEGRO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5 MG/ML, NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5 MG/ML Y DE UN ELECTRODO BDD BLANCO (AZUL). A.1) DETALLE DE LOS PICOS ANÓDICOS DE LOS SENSORES MIP, NIP CORRESPONDIENTES OBTENIDOS EN PRESENCIA DE AGITACIÓN. ....	128
<b>FIGURA 44</b> CRONOAMPEROGRAMA OBTENIDO EN PRESENCIA DE AGITACIÓN DE UN: A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. AMBOS SENSORES CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 10 MG/ML. ....	130
<b>FIGURA 45</b> A) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M: MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD (NEGRO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5 MG/ML, NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5 MG/ML Y DE UN ELECTRODO BDD BLANCO (AZUL). A.1) DETALLE DE LOS PICOS ANÓDICOS DE LOS SENSORES MIP, NIP CORRESPONDIENTES.....	132
<b>FIGURA 46</b> INTENSIDAD DEL PICO ANÓDICO $Ag^{2+}$ DE LOS SENSORES MIP (NEGRO), NIP (ROJO) INMERSOS EN UNA SOLUCIÓN DE LACTOSA EN PBP DE CONCENTRACIÓN 0,01 M Y PH 7,4. SE REPRESENTA UN AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGNWS EN LA PELÍCULA DE CHITOSÁN (0, 5, 10 MG/ML).....	133
<b>FIGURA 47</b> A) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M: MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD (NEGRO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 10 MG/ML, NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 10 MG/ML Y DE UN ELECTRODO BDD BLANCO (AZUL). A.1) DETALLE DE LOS PICOS ANÓDICOS DE LOS SENSORES MIP, NIP CORRESPONDIENTES. ....	135
<b>FIGURA 48</b> A) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA MIP {CHI-AGNWS-LACTOSA}/BDD EN: PBP (0,01 M Y PH 7,4) (NEGRO), EN PBP DESPUÉS DE ELIMINAR LA MOLÉCULA PLANTILLA CON KCL (ROJO) Y EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP (0,01M, PH 7,4). B) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA MIP {CHI-AGNWS-LACTOSA}/BDD EN: PBP (0,01 M Y PH 7,4) (NEGRO), EN PBP DESPUÉS DE ELIMINAR LA MOLÉCULA PLANTILLA	

CON AGUA DESIONIZADA MILLI Q (ROJO) Y EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP (0,01M, PH 7,4). .....	137
<b>FIGURA 49</b> A) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE UN SENSOR MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD EN: PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M (NEGRO), EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M DESPUÉS DE LA ELUCIÓN (ROJO), EN UNA SOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01M (AZUL). RESPUESTA VOLTAMÉTRICA DE UN ELECTRODO BDD BLANCO EN LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M (ROSA). A.1) DETALLE DE LOS PICOS ANÓDICOS.....	139
<b>FIGURA 50</b> ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE UN SENSOR A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD EN: PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M (NEGRO), POSTERIORMENTE EN UN DISOLUCIÓN DE LACTOSA DE CONCENTRACIÓN $10^{-4}$ M (ROJO) EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M Y FINALMENTE, EN UNA DISOLUCIÓN DE LACTOSA DE CONCENTRACIÓN $10^{-4}$ M (AZUL) EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M. A.1) Y B.1) DETALLES DE LOS PICOS ANÓDICOS DE LOS SENSORES MIP, NIP, RESPECTIVAMENTE.....	140
<b>FIGURA 51</b> RECTAS DE LA INTENSIDAD DEL PICO ANÓDICO ( $Ag^{2+}$ ) DE LOS SENSORES MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD (NEGRO) Y NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO) EN PBP (0,01 M Y PH 7,4); PARA UN INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA EN LA SOLUCIÓN (0; 0,1 Y 1 mM) .....	141
<b>FIGURA 52</b> REPRODUCIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA EN LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M. A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD, B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. A.1) Y B.1) DETALLES DE LOS PICOS ANÓDICOS DE LOS SENSORES MIP, NIP, RESPECTIVAMENTE. ....	142
<b>FIGURA 53</b> REPETITIVIDAD MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA EN UNA SOLUCIÓN DE LACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M. A) MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD, B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. A.1) Y B.1) DETALLES DE LOS PICOS ANÓDICOS DE LOS SENSORES MIP, NIP, RESPECTIVAMENTE. ....	142
<b>FIGURA 54</b> CRONOAMPEROGRAMA DE: A) MIP [CHI-AGNWS-GLUCOSA]/BDD Y B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. AMBOS SENSORES CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1MG/ML. ....	144
<b>FIGURA 55</b> A) VOLTAMOGRAMA DE UN ELECTRODO BDD EN BLANCO EN UNA DISOLUCIÓN DE GLUCOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01M. B) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA EN UNA DISOLUCIÓN DE GLUCOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M. DE UN: SENSOR MIP [CHI-AGNWS-GLUCOSA]/BDD (NEGRO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1 MG/ML, SENSOR NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1 MG/ML Y UN ELECTRODO BDD BLANCO (AZUL).....	145
<b>FIGURA 56</b> A) CRONOAMPEROGRAMA DE: A) MIP [CHI-AGNWS-GALACTOSA]/BDD Y B) NIP [CHI-AGNWS]/BDD. AMBOS SENSORES CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1MG/ML.....	147
<b>FIGURA 57</b> A) VOLTAMOGRAMA DE UN ELECTRODO BDD EN BLANCO EN UNA DISOLUCIÓN DE GALACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01M. B) RESPUESTA VOLTAMÉTRICA EN UNA DISOLUCIÓN DE GALACTOSA $10^{-4}$ M EN PBP DE PH 7,4 Y CONCENTRACIÓN 0,01 M DE UN SENSOR: MIP [CHI-AGNWS-GALACTOSA]/BDD (NEGRO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1 MG/ML, NIP [CHI-AGNWS]/BDD (ROJO) CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 1 MG/ML Y UN ELECTRODO BDD BLANCO (AZUL). ....	148

# Índice de tablas

<b>TABLA 1</b> POTENCIAL (MV) CORRESPONDIENTE A LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN DE LOS AGNWS DE UN SENSOR MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD CON 5 MG/ML DE AGNWS. OBTENIDO CON AGITACIÓN Y SIN AGITACIÓN DURANTE LA CRONOAMPEROMETRÍA. ....	129
<b>TABLA 2</b> INTENSIDAD DE CORRIENTE (MA) CORRESPONDIENTE A LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN DE LOS AGNWS DE UN SENSOR MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD CON 5 MG/ML DE AGNWS. OBTENIDO CON AGITACIÓN Y SIN AGITACIÓN DURANTE LA CRONOAMPEROMETRÍA.....	129
<b>TABLA 3</b> CV (%) DE LOS SENSORES MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y NIP [CHI-AGNWS] CON 5 MG/ML DE AGNWS. OBTENIDOS CON AGITACIÓN Y SIN AGITACIÓN DURANTE LA CRONOAMPEROMETRÍA. ....	130
<b>TABLA 4</b> INTENSIDAD DE CORRIENTE (MA) CORRESPONDIENTE A LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN DE LOS AGNWS DE UN SENSOR MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y NIP [CHI-AGNWS]/BDD. AMBOS CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS 5 Y 10 MG/ML.....	133
<b>TABLA 5</b> INTENSIDAD DE CORRIENTE (MA) CORRESPONDIENTE A LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN DE LOS AGNWS DE UN SENSOR MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD, MIP [CHI-GLUTARALDEHÍDO-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y NIP [CHI-AGNWS]/BDD, NIP [CHI-GLUTARALDEHÍDO-AGNWS]/BDD CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 10 MG/ML. ....	136
<b>TABLA 6</b> ESTUDIO DE LA REPETITIVIDAD A TRAVÉS DE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE (MA) DE UN SENSOR: MIP [CHI-AGNWS-LACTOSA]/BDD Y NIP [CHI-AGNWS]/BDD CON UNA CONCENTRACIÓN DE AGNWS DE 5MG/ML. ....	143



# Índice de ecuaciones

<b>ECUACIÓN 1</b> CÁLCULO DE LA DENSIDAD .....	14
<b>ECUACIÓN 2</b> LEY DE SNELL .....	16
<b>ECUACIÓN 3</b> CÁLCULO DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS (%) A PARTIR DEL PESO DE LA LECHE ANTES Y DESPUÉS DE LA DESECACIÓN. ....	17
<b>ECUACIÓN 4</b> ECUACIÓN DE RICHMOND .....	17
<b>ECUACIÓN 5</b> LEY DE PLANCK .....	60
<b>ECUACIÓN 6</b> LEY DE LA TRANSMITANCIA .....	61
<b>ECUACIÓN 7</b> CÁLCULO DE LA ABSORBANCIA.....	61
<b>ECUACIÓN 8</b> ECUACIÓN DE LA LEY DE LAMBERT-BEER. ....	64
<b>ECUACIÓN 9</b> LEY DE BRAGG .....	66
<b>ECUACIÓN 10</b> ECUACIÓN DE NERST.....	68
<b>ECUACIÓN 11</b> ECUACIÓN DEL POTENCIAL RESULTANTE DE UNA CELDA ELECTROQUÍMICA .....	68
<b>ECUACIÓN 12</b> REACCIÓN QUÍMICA GENERAL DE UN PROCESO DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN.....	69
<b>ECUACIÓN 13</b> ECUACIÓN DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO TERMODINÁMICA .....	69
<b>ECUACIÓN 14</b> ECUACIÓN DE LA ENERGÍA LIBRE DE GIBBS .....	69
<b>ECUACIÓN 15</b> ECUACIÓN DE LA ENERGÍA LIBRE DE GIBBS RELACIONADA CON LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO TERMODINÁMICA .....	70
<b>ECUACIÓN 16</b> REACCIÓN DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN EN UN ELECTRODO SCE .....	72
<b>ECUACIÓN 17</b> REACCIÓN DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN EN UN ELECTRODO Ag/AgCl .....	72
<b>ECUACIÓN 18</b> CÁLCULO DEL POTENCIAL DE PICO CATÓDICO PARA UN PROCESO REVERSIBLE. ....	76
<b>ECUACIÓN 19</b> CÁLCULO DEL POTENCIAL DE PICO ANÓDICO PARA UN PROCESO REVERSIBLE. ....	76
<b>ECUACIÓN 20</b> CÁLCULO DEL POTENCIAL DE MEDIA ONDA PARA UN PROCESO REVERSIBLE .....	76
<b>ECUACIÓN 21</b> LEY DE RANDLES SEYCIK PARA UN PROCESO REVERSIBLE .....	77
<b>ECUACIÓN 22</b> RELACIÓN DE LA CORRIENTE DE PICO ANÓDICO Y CATÓDICO PARA UN PROCESO REVERSIBLE. ....	77
<b>ECUACIÓN 23</b> LEY DE RANDLES-SEVCIK PARA UN PROCESO TOTALMENTE IRREVERSIBLE.....	78
<b>ECUACIÓN 24</b> RELACIÓN DE LA CORRIENTE DE PICO ANÓDICO Y CATÓDICO PARA UN PROCESO IRREVERSIBLE .....	78
<b>ECUACIÓN 25</b> POTENCIAL PARA UN PROCESO TOTALMENTE IRREVERSIBLE .....	78
<b>ECUACIÓN 26</b> LEY DE DIFUSIÓN DE FICK .....	79
<b>ECUACIÓN 27</b> ECUACIÓN DE COTTRELL .....	81
<b>ECUACIÓN 28</b> ECUACIÓN DE LEVICH .....	81
<b>ECUACIÓN 29</b> CÁLCULO DEL ESPESOR DE UNA PELÍCULA POLIMÉRICA A PARTIR DE LA 1ª LEY DE FARADAY .....	83
<b>ECUACIÓN 30</b> ECUACIÓN DE HENDERSON-HASSELBACH .....	97
<b>ECUACIÓN 31</b> CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) O (RSD).....	120

<b>ECUACIÓN 32</b> CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN. ....	154
--	-----

# Capítulo I

## Introducción y objetivos



# 1. Introducción y objetivos

## 1.1 Introducción

La industria de la alimentación forma parte del sector de producción industrial cuyo principal objetivo es transformar, conservar y proporcionar productos destinados al consumo humano. Los procesos de transformación y elaboración de alimentos tienen como objeto cumplir con los hábitos de alimentación de las personas, así como alargar la vida útil del producto conservando sus propiedades organolépticas [1].

De acuerdo con los datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la industria de la alimentación da empleo a cerca de 5 millones de personas dentro de la UE generando un total de 1.109.00 M€. España ocupa el 4º puesto en la generación de negocios (8,7 %), quedando por detrás de Francia (16,2%), Alemania (15,4%) e Italia (12%) [2].

En España, este sector, constituye un importante motor dentro de la economía ya que representa el 16% del total de la industria del país. Hay 29.196 empresas que dan empleo a cerca de 450.000 miles de personas, lo que supone el 20,2% del empleo industrial dentro del país [2].

Castilla y León es la 3ª Comunidad Autónoma, por detrás de Cataluña y Andalucía, que genera más producción dentro del sector con una cifra de 10.133 M€ [2]. Valladolid, Burgos y León representan el 60% de las exportaciones dentro del sector agroalimentario destacando subsectores como: la industria láctea, la industria cárnica, industria de vinos y bebidas, azúcar y derivados, pan y galletas [3].

En cuanto al sector lácteo, según los datos proporcionados por el ministerio de agricultura, pesca y alimentación, la comunidad de Castilla y León alcanzó en el año 2017 una producción de 1.169 millones de litros de leche, además, es la primera región productora de la leche de oveja en España [4],[5].

La industria alimentaria está en constante crecimiento y desarrollo, con el fin de adaptarse a sus cambios e innovaciones se hace necesaria la introducción de recursos tecnológicos, es por ello por lo que actualmente se encuentra en la denominada 4ª revolución industrial, industria inteligente o industria 4.0. La industria 4.0 es capaz de mejorar la calidad, eficiencia y competitividad entre diferentes sectores. Dentro de la industria alimentaria, el sector agroalimentario es el más involucrado puesto que busca la automatización y

digitalización de los procesos industriales, para mejorar su eficiencia y productividad, y así cumplir con la demanda del mercado [6]. Además, la industria alimentaria debe garantizar el suministro de productos seguros que no comprometan la salud de las personas, debido a ello se adoptan medidas que aseguren el buen estado de los alimentos, por ello, como en el resto de sectores, el sector lácteo se encuentra sometido a una normativa estricta [7]. La industria 4.0 posibilita llevar a cabo un control y automatización de todo el proceso productivo, para alcanzarlo cuenta con unos pilares fundamentales entre los que cabe destacar el empleo de la nanotecnología. Adaptándose a los cambios que posibilita esta revolución industrial y con objeto de aplicar la industria 4.0 mediante la introducción de sensores basados en nanomateriales surgen equipos de investigación relacionados con este campo.

En Valladolid, se encuentra el grupo UvaSens dirigido por la catedrática María Luz Rodríguez Méndez del departamento de Química Física y Química inorgánica. UvaSens nació en 1962 y actualmente se encuentra asentado en la escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid. Está integrado por un grupo multidisciplinar con químicos, físicos e ingenieros. El grupo surge con el objeto de elaborar sensores y redes de sensores que sean fiables, reproducibles y que faciliten las tareas de control de calidad en alimentación y bebidas. Actualmente, el grupo trabaja en dos líneas de investigación [8],[9].

La primera, está dirigida al desarrollo de sensores y biosensores nanoestructurados utilizando técnicas como: Layer by layer, Langmuir-Blodgett, spin coating o técnicas electroquímicas [8]. En cuanto a la segunda línea de investigación, el equipo se dedica a la elaboración de sistemas multisensor denominados lenguas electrónicas y narices electrónicas, cuyo fundamento es imitar el sentido del gusto y del olfato respectivamente [10],[11]. Los sensores y biosensores desarrollados por el grupo UvaSens son de especial interés en la industria alimentaria ya que se dedican principalmente al estudio del vino [12], la cerveza [13] y la leche [14].

Este trabajo se centra en el desarrollo de sensores electroquímicos en los que se incorporan nanoestructuras metálicas para detectar azúcares de interés en la industria alimentaria, que pueden encontrarse en bebidas como la leche, zumos, batidos, etc.

## 1.2 Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo ha sido desarrollar sensores voltamétricos basados en la tecnología de impresión molecular, MIPs, para la detección de lactosa, glucosa y galactosa; utilizando nanohilos de plata (AgNWs). Para conseguirlo, se han persigido una serie de objetivos secundarios como son:

1. La optimización de la síntesis de AgNWs a través del método poliol y su caracterización mediante espectroscopía UV-VIS, difracción de rayos-X (DRX) y microscopía de fuerza atómica molecular (AFM).
2. La obtención de MIPs a través de métodos electroquímicos, mediante la deposición de una película polimérica de quitosán, modificada con AgNWs, en presencia de la molécula plantilla de interés.
3. El estudio de la especificidad introducida por la plantilla polimérica en los sensores MIPs llevando a cabo su comparación con sensores preparados en las mismas condiciones, pero en ausencia de la molécula plantilla denominados, NIPs.
4. La determinación del comportamiento electroquímico de los sensores MIPs por medio de técnicas electroquímicas, como la voltametría cíclica, para la detección de lactosa, glucosa y galactosa.
5. La optimización de los sensores MIPs frente a la detección de lactosa, para ello se ha realizado la modificación de distintos parámetros, en el desarrollo del sensor y de medida como son: el método de electrodeposición de la solución que contiene la mezcla para la obtención de los sensores MIP o NIP, desarrollo de los sensores en presencia de agitación o sin ella, concentración de AgNWs, el uso de glutaraldehído como agente reticulante y el empleo de distintos eluyentes de la molécula plantilla.

## Capítulo II

### Desarrollo del TFG





## 2. Fundamento teórico

### 2.1 Contextualización: Nanociencia y Nanotecnología

La nanociencia es una rama de la ciencia en la que convergen conocimientos de la física, química, ingeniería, biología, entre otros. Se define como la tecnología encargada del diseño y manejo de la materia a nivel de átomos o moléculas para la fabricación de productos a nano-escala [10].

La nanotecnología implica controlar y comprender la materia a escala nanométrica por lo que se basa en el estudio de nanomateriales de tamaño entre 1 y 100 nanómetros. Su interés radica en que las sustancias a esta escala presentan propiedades: físicas, químicas y biológicas diferentes a las que tienen los materiales a escala macroscópica. Una de sus características más interesantes, es que su tamaño y área de superficie, de tamaño nanométrico, les confieren una mayor estabilidad, reactividad química y biológica, haciendo posible el desarrollo de nuevos materiales con múltiples aplicaciones en diferentes sectores, como en la fabricación de sensores [10].

El término “nanotecnología” fue utilizado por primera vez en 1974 por Norio Tanigushi, pero no fue hasta la década de 1980 con el desarrollo del microscopio de Túnel de Barrido (STM) cuando la nanotecnología comenzó a abrirse camino entre los investigadores hasta la actualidad. A lo largo del S.XX han tenido lugar acontecimientos que han marcado el mundo de la nanotecnología como el descubrimiento de los fullerenos (1985) o de los nanotubos de carbono (1991) [15]. La nanotecnología ha seguido evolucionando a lo largo del S.XXI donde se han desarrollado nanomateriales interesantes, como los AgNWs que resultan de especial interés en la elaboración de sensores, por sus excelentes propiedades ópticas y eléctricas, los primeros estudios acerca de estos nanomateriales datan en el año 2006 [16], [17].

En la actualidad la nanotecnología encabeza una revolución tecnológica que forma parte de múltiples sectores. Actualmente, se trabaja en diversos campos como: el análisis sensorial, electrónica, comunicación, producción de energía, medicina e industria de los alimentos [18].

#### 2.1.1 La nanociencia en la industria alimentaria. Nanosensores

En la industria alimentaria la nanotecnología se abre camino asegurando la inocuidad y calidad de los alimentos, aunque su incorporación en este sector resulta algo tardía debido al rechazo por parte de la población a la inclusión de nanomateriales, por miedo a que provoquen efectos adversos en el organismo [18].

A pesar de ello, la nanotecnología representa un claro sector con un enorme potencial en la industria alimentaria, donde se encuentra en pleno desarrollo. Las cuatro vertientes en los que se divide son [18]:

- La necesidad de mejorar y simplificar la **producción primaria y el procesamiento de alimentos**:
  - Desarrollo de sensores inteligentes.
  - Incorporación de nuevos pesticidas.
  - Refuerzo de la alimentación animal.
  - Producción de antiaglomerantes y nanoencapsulación de sabores.
- Garantizar la **inocuidad**. Seguridad alimentaria:
  - Diagnóstico y detección de la presencia de contaminantes.
- **Embalaje** de los alimentos
  - Antimicrobiales.
- **Nutrición**
  - Fabricación de nanoemulsiones que mejoran la distribución de los ingredientes farmacéuticos activos [19].

Adicionalmente, con el fin de proporcionar alimentos y bebidas que no comprometan la salud del consumidor, se debe asegurar la detección de sustancias en concentraciones extremadamente pequeñas. Por ello, es interesante la implementación de la nanotecnología en este ámbito ya que posibilita llevar a cabo detecciones más precisas mediante el empleo de nanosensores y la incorporación de nanocompuestos. Con estas innovaciones se consigue incrementar la sensibilidad, selectividad y la relación

área/volumen de los sensores permitiendo realizar análisis más precisos y exactos [18].

## 2.2 La industria láctea. Materia prima: leche

La industria láctea es un sector cuya materia prima principal es la leche, este sector produce anualmente cerca de 7,6 millones de toneladas de productos lácteos. La mayoría de leche que se produce en España es de origen vacuno (88%) quedando por detrás la leche de oveja, cabra y de otros animales productores de leche [20]. La comercialización de la leche puede llevarse a cabo en diferentes formas: leche líquida, leche evaporada o concentrada, leche condensada y leche en polvo [21].

La leche se considera un producto básico en la alimentación desde la antigüedad ya que se obtiene de manera natural y constituye un alimento completo rico en proteínas, vitaminas, grasas, minerales, entre otros componentes. Se define como un “producto íntegro y fresco de la ordeña de vacas, sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro y que cumple con las características físicas y microbiológicas establecidas” [22], [23].

La leche es un producto muy complejo susceptible a que en él se produzcan importantes cambios que afecten a su calidad. Por ello, se establecen una serie de factores que determinan su variabilidad, alterabilidad y complejidad [22].

- **Variabilidad**

La leche es un producto natural de origen biológico por lo que su composición y propiedades físico - químicas vendrán determinados por:

- **Raza y especie:** la leche entre diferentes especies (vaca, oveja, cabra, etc.) presenta importantes diferencias respecto al contenido de extracto seco, materia grasa, carbohidratos, etc [22].  
Por otro lado, dentro de la misma raza también surgen importantes diferencias debidas al contenido proteico y tamaño de los glóbulos lipídicos [23].
- **Factores fisiológicos:** el momento de extracción y el número de lactaciones afectan enormemente a la composición química de la leche, teniendo en cuenta que los primeros días de lactancia se

obtiene calostro de composición química muy distinta a la leche [22], [23].

- **Alimentación:** la calidad de los productos utilizados en la alimentación del animal puede afectar a su valor nutritivo [22].
- **Patologías:** los animales pueden presentar enfermedades, como la mastitis, que alteran el sabor de la leche, haciendo que ésta adquiera un gusto salado [24].
- **Tratamientos:** el calentamiento es uno de los tratamientos térmicos más importantes que se llevan a cabo en la leche, ya que, para garantizar su calidad higiénica, es necesario eliminar el agua. Sin embargo, estos tratamientos pueden producir efectos negativos sobre la composición y propiedades de la leche. Por ejemplo, un excesivo calor provoca la precipitación de proteínas solubles de la caseína, aumento de la acidez, reducción de calcio, etc [22].

- **Alterabilidad**

La leche es un producto fácilmente alterable ya que en él se pueden producir importantes cambios que afecten a sus buenas propiedades o a su calidad. Los principales cambios que pueden tener lugar en la leche se describen a continuación.

Durante el ordeño del animal se pueden provocar **cambios físicos**, estos tienen lugar si se lleva a cabo un ordeño inadecuado haciendo que entre en la ubre aire, lo cual ocasiona la incorporación de oxígeno y nitrógeno. Otros cambios físicos importantes que se pueden producir se deben al efecto de la temperatura. Por ejemplo, temperaturas demasiado bajas provocan la cristalización de la materia grasa, dando lugar a cambios en la textura de la leche [22].

Debido a su riqueza nutricional, la leche es un producto susceptible a que se desarrollen microorganismos después de los procesos de tratamiento, los **cambios microbiológicos** más frecuentes se deben al desarrollo de bacterias lácticas que llevan a cabo los procesos de fermentación de la lactosa. Con la fermentación, la lactosa se transforma en ácido láctico lo que provoca un aumento de la acidez en la leche, además, se producen compuestos volátiles aportando olores desagradables [22].

En cuanto a los **cambios químicos**, la luz puede ejercer un efecto catalizador dando lugar a reacciones de oxidación indeseables, un ejemplo, es la oxidación

del  $\alpha$ -tocoferol o de la vitamina E (un antioxidante natural de la grasa) y de los carotenos [22], [26]. Los cambios químicos también pueden ser debidos a la **acción de enzimas** [22].

### 2.2.1 Evaluación de la calidad de la leche

Los productores de leche deben asegurar una entrega de producto con ausencia de alteraciones, defectos o posibles contaminantes. Para ello, se realizan una serie de pruebas tanto de control de calidad como sanitario y así asegurar el suministro de leche que no afecte negativamente a la salud del consumidor [27].

El control de calidad generalmente se lleva a cabo mediante la evaluación de las propiedades físico - químicas, microbiológicas y sensoriales de las muestras de leche con pruebas y controles como son:

- **Pruebas realizadas en planta:** control de temperatura, caracteres organolépticos, lactofiltración (informa sobre la presencia de contaminantes a causa de la falta de limpieza durante la producción de la leche) y control de peso específico (el peso específico varía con la composición química de la leche por lo que se emplea para detectar posibles casos de adulteración) [27].
- **Pruebas realizadas en el laboratorio:** prueba de acidez, pH, reducción de colorantes, etc [27].

### 2.2.2 Características organolépticas de la leche

Físicamente la leche se define como un compuesto líquido, opaco, de color blanco y con el doble de viscosidad que el agua [23].

Las características organolépticas de la leche contribuyen a ofrecer una primera percepción de la calidad del producto y son aquellas características que se pueden distinguir a través de nuestros sentidos. Un color inusual advierte sobre la presencia de microorganismos, un aroma desagradable, podría indicar la presencia de bacterias debido a que la leche ha estado en contacto con utensilios sucios o a que se ha almacenado inadecuadamente [27]. Otro factor fundamental que determina la calidad de la leche es la alimentación del animal, además, el tipo de terreno, pienso y pasto determinan los nutrientes de la leche y por tanto, también su calidad [23].

Las características organolépticas de la leche son [27]:

- **Textura:** la viscosidad es un factor que determina la textura de la leche, la leche líquida tiene una viscosidad de aproximadamente  $2 \cdot 10^{-3} Pa \cdot s$ , su valor depende de la presencia de microorganismos capaces de producir polisacáridos y de su contenido en materia grasa y proteínas [27], [28].
- **Color:** el color natural de la leche es el blanco, este color es el resultado del fenómeno óptico de refracción que se produce cuando un haz de luz incide sobre las partículas coloidales que hay en ella [22].

Los coloides están presentes en la materia grasa, cuando la leche es semidesnatada presenta un color azulado y cuando es rica en grasa, el color es gris amarillento. La percepción de otras tonalidades (rosado, amarillo o azul) se debe a la contaminación o al crecimiento de microorganismos en la leche [27].

- **Sabor:** la leche en buen estado presenta un sabor ligeramente dulce por la presencia de azúcares como la lactosa. Otros sabores informan sobre el mal estado del producto. Por ejemplo, el sabor ácido, se produce por la presencia del ácido láctico; el sabor salado, se debe a la presencia de cloruros procedentes del último periodo de lactancia del animal [27].
- **Aroma:** la leche presenta un olor característico debido a la presencia de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular como: aldehídos, cetonas, ácidos, entre otros. [27]

### 2.2.3 Propiedades físico - químicas

La leche tiene una estructura física compleja ya que en ella se encuentran tres estados de agregación de la materia [23]:

- **Emulsión:** en la leche se encuentra la materia grasa en forma de glóbulos, los cuales se encuentran en emulsión en el seno de un líquido acuoso, a este conjunto se le denomina suero.
- **Dispersión coloidal:** una dispersión coloidal está formada por partículas sólidas, no disueltas, en una fase dispersante (el agua). En esta fase principalmente se encuentran las micelas de caseína.

Cuando las partículas sólidas presentan gran afinidad por el agua se forma una disolución coloidal, dentro de esta fase se encuentran las proteínas del suero.

- **Disolución verdadera:** formada principalmente por lactosa y minerales.

A continuación, se describen las propiedades físicas de la leche:

- **Densidad:** la densidad de la leche depende del contenido total de algunos de sus componentes como: agua, proteínas, minerales, lactosa y sólidos no grasos a una determinada temperatura. A 15°C la densidad de la leche varía entre un valor de 1,027 g/mL y 1,040 g/mL [23].

La densidad se puede calcular mediante la siguiente expresión [22], [28] :

$$\frac{1}{\rho} = \left( \frac{m_x}{\rho_x} \right) \quad (1)$$

*Ecuación 1 Cálculo de la densidad*

Donde  $\rho_x$  es la densidad de cada componente,  $m_x$  es la masa de cada componente y  $\rho$  es la densidad total.

La densidad es un buen indicador de posibles alteraciones que haya podido sufrir la leche, ya que disminuye al añadir agua, grasa y con el aumento de la temperatura [28].

- **Acidez:** la acidez de la leche es función de la acidez actual (pH) y de la titulable. La acidez actual depende de la concentración de iones hidrógeno libres  $H^+$  y la acidez titulable se corresponde con la acidez de los componentes que por medio de la titulación liberan iones  $H^+$  al medio [29].

La acidez total de la leche de vaca varía entre un 0,14-0,18% y depende principalmente de la acidez de la caseína, sales minerales, ácidos orgánicos, reacciones secundarias debidas a los grupos fosfatos y de la presencia de ácido láctico liberado por la actividad microbiana [29].



- **pH:** el pH de la leche representa la acidez actual y se mide con la concentración de iones  $H^+$  libres [29]. La leche generalmente presenta un valor de pH ligeramente ácido entre 6,5 y 6,9, valores inferiores o superiores no son normales e indicarían un posible caso de adulteración [29]. Además, el pH es un factor que se ve muy afectado por la temperatura disminuyendo su valor con el aumento de ésta debido a la insolubilidad del fosfato [29].
- **Viscosidad:** se refiere a la resistencia de un líquido a fluir, en la leche depende del contenido total en materia grasa, de las proteínas, de la temperatura y en menor grado del estado físico de las sustancias disueltas en ella. A temperatura ambiente, la leche presenta una viscosidad entre un valor de  $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$  y  $2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$  [24].

La viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura, es decir, con el aumento de la temperatura la viscosidad disminuye. Además, también depende de la composición química de la leche, siendo la leche entera más viscosa que la leche desnatada [22].

- **Calor específico:** se define como las calorías necesarias para elevar en un grado centígrado un gramo de leche. El valor típico del calor específico de la leche entera es de  $0,93 \text{ cal/ g}\cdot\text{C}$  [22],[23].
- **Punto de congelación:** se define como la temperatura a la que se produce la solidificación de un líquido. Es una propiedad física importante pues permite detectar adulteraciones en la leche. El punto de congelación de la leche se encuentra en un valor de temperatura comprendido entre  $0,513 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $0,565 \text{ }^\circ\text{C}$  [22].
- **Punto de ebullición:** se define como el punto en el que un líquido hierve al aumentar la temperatura. El punto de ebullición de la leche es de  $100,17^\circ\text{C}$  [22].
- **Índice de refracción (n):** el índice de refracción mide el cambio de la dirección que sufre la luz cuando la radiación atraviesa un medio con un índice de refracción distinto del que proviene [28]. En el caso de la leche, el índice de refracción mide la variación de la dirección que experimenta un haz de luz al pasar del aire a leche. El valor del índice de refracción “n” se calcula con la ley de Snell mediante la siguiente expresión [28]:

$$n_1 \cdot \text{sen}\theta_1 = n_2 \cdot \text{sen}\theta_2 \quad (2)$$

*Ecuación 2 Ley de Snell*

Donde  $n_1$  y  $n_2$  son el valor de los índices de refracción de cada medio,  $\theta_1$  es el ángulo con el que incide el haz de luz y  $\theta_2$  es el ángulo de refracción de la luz.

La refracción de la luz es una propiedad aditiva, es decir que la refracción total es el resultado de la suma de los índices de refracción de cada uno de los componentes de la leche [28]. Se trata de un factor relevante ya que permite detectar posibles casos de adulteración en la leche, por ejemplo, si está aguada el índice será próximo al del agua lo que puede indicar un fraude [28]. Por otro lado, se ha demostrado que el valor de  $n$  disminuye con la edad del animal y aumenta con la acidez del medio; por lo que la reflectometría aplicada en muestras de leche es una herramienta muy útil para determinar dichas características [28].

- **Potencial de oxidación-reducción (Eh):** el potencial redox se refiere a la capacidad de oxidación (pérdida de electrones) o reducción (ganancia de electrones) que tiene una solución [30].

El potencial redox de la leche a 25°C generalmente varía entre 250 mV - 350 mV, este potencial se debe a la presencia del oxígeno disuelto y a la existencia de sustancias reductoras naturales. Esta propiedad es importante ya que informa sobre la calidad de las características organolépticas de la leche, por ejemplo, el proceso de fermentación de las bacterias de la lactosa a ácido láctico supone una caída del potencial por el consumo del oxígeno [30]. Además, el poder reductor de ciertas especies que se encuentran naturalmente en la leche, las cuales se mencionarán más adelante, impiden que se desarrollen sabores desagradables en ella [23].

#### 2.2.4 Composición química de la leche

La leche se considera un alimento completo por su importante carga nutritiva. El componente mayoritario de la leche es el agua que representa entre el 86 y el 88 % del total de sus constituyentes, el agua está en equilibrio con los

nutrientes que se encuentran en diferentes fases: disolución, dispersión coloidal y emulsión. [31]

A continuación, se presenta la composición química de la leche:

- **El agua:** es la fase continua de la leche y se puede encontrar en forma de agua ligada y agua libre. El agua libre se encuentra en mayor proporción y en ella están la lactosa y las sales. El agua ligada o de enlace se encuentra en la superficie de los compuestos no solubles formando enlaces con los componentes y es más complicada de extraer [22].
- **Extracto seco de la leche:** el extracto seco lo forman las sustancias de la leche, (a excepción del agua) que se obtienen por desecación o evaporación del agua [22]. El contenido de materia o extracto seco de la leche es del 12% - 12,5% de sólidos totales [22]. Para determinarlo se puede utilizar el peso (Kg) de la leche antes y después de la desecación o a través de la densidad y del contenido en materia grasa de la leche. Para ello, se utilizan las siguientes ecuaciones [22], [31]:

$$\text{sólidos (\%)} = \left( \frac{P'}{P} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

*Ecuación 3 Cálculo del contenido de sólidos (%) a partir del peso de la leche antes y después de la desecación.*

- Donde P' es el peso en g de la leche después de la desecación y P es el peso de la leche antes de la desecación.

$$\%S.T = (0,25 \times D) + (1,21 \times \%G) + 0,66 \quad (4)$$

*Ecuación 4 Ecuación de Richmond*

- Donde D es el valor de la densidad de la leche en g/mL y G es el contenido en materia grasa de la leche.

- **Glúcidos**

La cantidad total de glúcidos que hay en la leche de vaca oscila entre un 4,8% y un 5,2%, siendo algo superior la carga en la leche humana [22].

Los carbohidratos o glúcidos se definen como polihidroxialdehídos (todos los átomos de carbono están unidos a un grupo hidroxilo -OH excepto uno que esta enlazado a un grupo aldehído -CHO) o polihidroxicetonas (todos los átomos de carbono están unidos a un grupo hidroxilo -OH excepto uno que esta enlazado a un grupo cetona C=O) y sus derivados, también se incluyen aquellas sustancias que por hidrólisis dan lugar a este tipo de compuestos. En general están formados por carbono, hidrogeno y oxígeno por lo que su fórmula molecular presenta la forma  $C_nH_{2n}O_n$  [32].

Los glúcidos se pueden clasificar en función del número de subunidades de monosacáridos en [32]:

- Monosacáridos o azúcares simples: están formados por una unidad de un polihidroxialdehído o una polihidroxicetona, que se conocen como aldosas o cetosas respectivamente. Dentro de este grupo se encuentran los azúcares que no pueden descomponerse en otros azúcares más simples.
- Oligosacáridos: están formados por dos a diez unidades de monosacáridos, por lo que se pueden transformar en unidades más simples mediante hidrólisis. A su vez, dentro de este grupo los carbohidratos se clasifican según el número de unidades en: monosacáridos, disacáridos, etc.
- Polisacáridos: consisten en largas moléculas formadas por la unión de unidades de monosacáridos.

En la designación de los azúcares, además, se incluye un signo que puede ser (+) o (-) seguido de la letra D o L, esta designación está relacionada con la actividad óptica del compuesto. La actividad óptica se refiere a la rotación del plano de luz polarizada, en un azúcar, este efecto es el resultado producido por la actuación conjunta de todos sus átomos de carbono asimétricos (átomo de C enlazado a cuatro constituyentes diferentes). Los azúcares con el signo (+) se denominan dextrógiros y los azúcares con el signo (-) se denominan levógiros. La asignación de las letras D y L depende de la distribución de los

grupos funcionales del carbón asimétrico que se encuentra representado en cadena abierta según la proyección de Fisher. Si el grupo funcional se encuentra a la derecha se denomina D y si se encuentra a la izquierda se denomina L [32], [33].

Finalmente, en la designación también se incluyen los símbolos griegos  $\alpha$  y  $\beta$ , esto es debido a la ciclación de los monosacáridos en solución acuosa. Esta estructura es función de la orientación espacial del grupo hidroxilo del carbón C1 de la estructura del anillo ( $\alpha$  si el grupo -OH está orientado hacia abajo y  $\beta$  si el grupo -OH está orientado hacia arriba) [32], [33]. Se denomina anillo pirano cuando es un ciclo de 6 átomos de carbono y furano cuando es un anillo de 5 átomos de carbono [32], [33].

Los carbohidratos constituyen una parte importante de la dieta de los hombres pues están presentes en un 65% de los alimentos que consumimos (leche, arroz, pan, etc.) [32]. El carbohidrato principal que forma la leche es la lactosa, disacárido constituido por glucosa y galactosa, a continuación, se presenta una descripción detallada de cada uno de estos azúcares.

### ➤ Lactosa

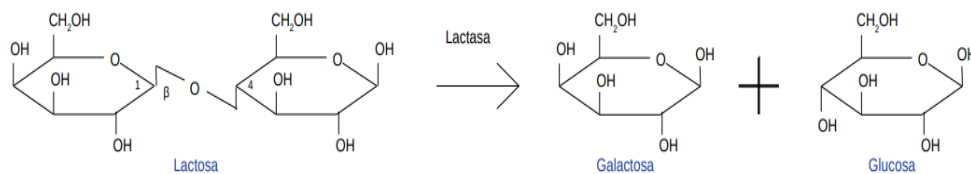
La lactosa o  $\beta$ -D-Galactopiranosil-(1→4)-D-glucopiranososa es un disacárido compuesto por unidades de monosacáridos de glucosa y galactosa unidos mediante un enlace  $\beta$  (1,4) glucosídico. En dicho enlace, el grupo funcional -OH del carbono C1 en posición beta de la galactosa está unido al grupo -OH del carbono C4 de la glucosa [34],[35],[36].

La lactosa constituye el principal azúcar de la leche, biológicamente se produce en las glándulas mamarias de los mamíferos. Dietéticamente es considerada un azúcar extrínseco dado que no forma parte de la estructura celular del alimento, sino que se encuentra de forma libre en la leche y en sus derivados lácticos [34], [35], [36].

La determinación de lactosa en la industria alimentaria ha cobrado una gran importancia en los últimos años debido a la intolerancia que presenta gran parte de la población a este azúcar. La lactosa puede ser digerida por el cuerpo humano gracias a la presencia de una enzima, la lactasa, que degrada la lactosa en sus dos monosacáridos (glucosa y galactosa). Cuando la enzima no funciona o no presenta la actividad suficiente se produce la intolerancia [22].

La descomposición de la lactosa en glucosa y galactosa (**figura 1**) es importante puesto que permite su detección mediante el empleo de técnicas tradicionales de análisis como son: la cromatografía de líquidos de alta resolución,

cromatografía de gases, polarimetría, gravimetría, entre otras. Sin embargo, debido al elevado coste y a los elevados tiempos de análisis que supone el empleo de estas técnicas, en los últimos años se han desarrollado sensores que ofrecen una detección más rápida, menos costosa y más precisa [14].



**Figura 1** Reacción enzimática de la lactosa para formar glucosa y galactosa.

En disolución a temperatura ambiente la lactosa se puede encontrar en dos configuraciones:  $\alpha$ -lactosa y  $\beta$ -lactosa con una proporción del 40% de la configuración  $\alpha$  y el 60% de la configuración  $\beta$ . Siendo ambas configuraciones consecuencia de la mutarrotación, (el carbono hemiacetal está en equilibrio con el grupo aldehído de la cadena abierta y forma los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ ) [37].

La lactosa es considerado un azúcar reductor, ya que en su estructura química tiene un grupo carbonilo intacto a través del cual puede reaccionar con otras moléculas, por lo que es un azúcar sensible a sufrir las reacciones de Maillard [34], [38]. Las reacciones de Maillard son un conjunto de reacciones en cadena, no enzimáticas, que pueden tener lugar en la leche como consecuencia de la reacción entre el grupo carbonilo del azúcar y el grupo amino de las proteínas o aminoácidos que se encuentran presentes en la leche. Estas reacciones son indeseables dado que suponen una pérdida en el valor nutricional (disminución de aminoácidos esenciales) y en la calidad (pardeamiento del producto, aparición de aromas desagradables, generación de subproductos tóxicos, etc.) de la leche [39]. Para que tengan lugar se deben dar unas condiciones determinadas de temperatura, pH, tiempo, entre otros factores [34], [38], [39].

La lactosa a temperatura ambiente es un sólido en forma de polvo cristalino blanco, con un punto de fusión de 252°C, una solubilidad en agua buena (50 g por 100 g de agua), una densidad de 1,52 g/cm<sup>3</sup>, tiene una masa molecular de 342,3 g/mol y un poder endulzante muy inferior en comparación con otros azúcares como la glucosa [34], [35], [36].

## ➤ Glucosa

La glucosa o D-glucopiranososa es un monosacárido de fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$  con un grupo aldehído en su estructura química, constituye el monosacárido de mayor abundancia dentro de la naturaleza (se encuentra presente en polímeros como el chitosán) y es utilizado por las células del organismo para obtener energía [32], [33].

Su uso abusivo en la industria alimentaria en productos de consumo diario (productos lácteos, carne, bebidas, etc.) está asociado al padecimiento de ciertas enfermedades como la diabetes; además, se encuentra presente en la leche formando parte de la lactosa. Debido a la importancia que presenta la glucosa en el sector de la alimentación, cada vez son más las investigaciones centradas en el desarrollo de sensores que permitan la identificación de este azúcar [40], [41].

La glucosa en solución presenta dos formas cristalinas:  $\alpha$ -Glucosa y  $\beta$ -Glucosa, cuando la  $\alpha$ -glucosa se disuelve en agua la actividad óptica varía debido al fenómeno de mutarrotación y una parte de las moléculas se convierten en la forma  $\beta$ . Pasado un tiempo, se alcanza el equilibrio donde la mayor parte de la solución lo forma el anómero beta y una pequeña parte de la solución (1/3 aproximadamente) lo forma el anómero alfa [32], [33].

La glucosa es un azúcar con un fuerte carácter reductor (mayor que el de la lactosa) debido a la presencia del grupo aldehído en su estructura abierta, por lo que también es sensible a sufrir las reacciones de Maillard [33].

La glucosa a temperatura ambiente es un sólido inodoro en forma de polvo cristalino de color blanco, temperatura de fusión de  $146^{\circ}C$ , solubilidad en agua alta (91g por 100 mL de agua), densidad  $1,56 \text{ g/cm}^3$ , tiene una masa molecular de  $180,16 \text{ g/mol}$  y un poder endulzante (74,3%) notablemente superior al que presentan la galactosa y la lactosa [32], [42], [43].

## ➤ Galactosa

La galactosa, aldehído D-galactosa o D-(+)-galactosa es un monosacárido de fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ . La galactosa es muy similar a la glucosa por lo que son considerados epímeros, se diferencian en su estructura química, en la posición que ocupa el grupo  $-OH$  del carbono C4 [36].

Nutricionalmente, su mayor importancia radica en que es uno de los azúcares que forman parte de la lactosa de la leche. Como se ha indicado anteriormente,

debido al creciente número de casos en personas con intolerancia a la lactosa, se han desarrollado sensores dirigidos a la evaluación del contenido en lactosa por medio de la detección de galactosa (obtenida de la hidrólisis de la lactosa al añadir la enzima galactosa oxidasa) [14].

En solución su estructura abierta adquiere forma de anillo y puede dar lugar a dos configuraciones diferentes:  $\alpha$ -D-galactosa y  $\beta$ -D-galactosa; siendo la segunda forma el isómero predominante [44], [45]. Como el resto de los azúcares descritos, es un azúcar reductor ya que presenta un grupo aldehído libre en la forma de cadena abierta según la proyección de Fischer [44], [45].

La galactosa es un sólido inodoro en forma de polvo de color blanco, punto de fusión 168-170°C, solubilidad en agua buena (47,25 g por 100g de agua), densidad de 1,5 g/cm<sup>3</sup>, su peso molecular es de 180,16 g/mol y presenta un grado de dulzura más elevado que el de la lactosa y menor que la glucosa [46].

- **Materia grasa** [22], [23], [47], [48]

La materia grasa es un importante componente de la leche, ya que además de ser una rica fuente de energía para las personas, es el vehículo de vitaminas liposolubles (A, D, E y K). El nivel de materia grasa que contiene la leche puede variar desde el 3% hasta el 6%.

La materia grasa de la leche son lípidos en forma globular que se encuentran dispersos en ella y se pueden clasificar en:

- **Lípidos saponificables:** es la fracción lipídica que se encuentra en mayor proporción ya que forma entre el 99% y el 99,5% de los lípidos totales que hay en la leche. Dentro de los lípidos saponificables se encuentran los lípidos apolares y polares.
  - **Lípidos apolares:** son lípidos insolubles en la fracción acuosa de la leche dentro de los cuales caben destacar los triglicéridos, ya que son los que se encuentran en mayor proporción (96% - 98%). Otros, como los diglicéridos y monoglicéridos, se encuentran en cantidades muy pequeñas.
  - **Lípidos polares:** son fosfolípidos que representan entre el 0,20% y el 1% de los lípidos saponificables que contiene la leche, se encuentran formando parte de la membrana de los glóbulos grasos. En la leche su importancia radica en su poder



emulsionante y a su actuación como solventes de sustancias no polares presentes en ella, como el colesterol.

- **Lípidos insaponificables:** es la fracción lipídica de menor proporción formada por carotenoides (son los responsables de aportar una coloración amarilla en la grasa) y vitaminas liposolubles.

La materia grasa está presente en la leche formando glóbulos grasos, alrededor de ellos hay una estructura denominada, membrana de los glóbulos grasos. Esta membrana tiene una gran importancia dado a su función protectora que protege a los lípidos de sufrir reacciones enzimáticas. A pesar de ello, una de las reacciones enzimáticas que más afecta a la materia grasa es la lipólisis.

La lipólisis es una reacción química llevada a cabo por la acción de las enzimas lipasas que catalizan la hidrólisis de los glicéridos en la interfase aire-agua. A causa de la lipólisis, se forman ácidos grasos libres y glicerol, los cuales son los responsables de algunos de los sabores indeseables que se producen en la leche. Por ejemplo, durante esta reacción se libera ácido butírico que da lugar a un sabor y aroma "a rancio"; otra de las reacciones enzimáticas que causan, además de olores desagradables una pérdida del valor nutricional es el enranciamiento oxidativo llevado a cabo por la enzima xantino oxidasa. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en la leche.

Finalmente, una característica importante de la materia grasa es la diferencia de densidad que hay entre la materia grasa que se encuentra emulsionada en el suero y el suero, lo que permite una rápida separación entre ambos componentes. La separación se logra mediante la aplicación de métodos centrífugos que dan lugar a dos fases distintas: por un lado, se obtiene la leche desnatada, y por otro lado, una crema rica en glóbulos grasos. Esta característica es interesante en la industria alimentaria ya que permite obtener derivados lácteos, como la nata.

- **Proteínas**

Las proteínas son compuestos químicos formados a partir de aminoácidos, de hecho, la mayor parte del nitrógeno que contiene la leche (alrededor del 95%) se encuentra formando parte de ellas. Las proteínas representan una fracción compleja de la composición química de la leche, su interés en ella radica en

que son esenciales para todos los seres vivos representando un importante valor en la dieta nutricional de las personas. La concentración de las proteínas en la leche comprende valores entre el 3 % y el 4 % [22], [47], [48].

Como se ha indicado anteriormente, la leche es un producto fácilmente alterable por lo que parte de sus cambios en sus características físico - químicas se deben a cambios causados en las proteínas. Cuando se lleva a cabo un proceso térmico severo (pasteurización a altas temperaturas o esterilización) puede tener lugar la desnaturalización de las mismas liberando sabores indeseables. Además, las proteínas también pueden ser atacadas por enzimas dando lugar a su proteólisis (degradación de las proteínas), las principales responsables de esta reacción son las enzimas proteasas provenientes de la actividad bacteriana que puede desarrollarse en la leche [22].

Las proteínas que forman la leche se pueden clasificar en dos grupos: caseína ( ~80 %), y las proteínas del suero (~20 %). [48]

#### ➤ **La caseína**

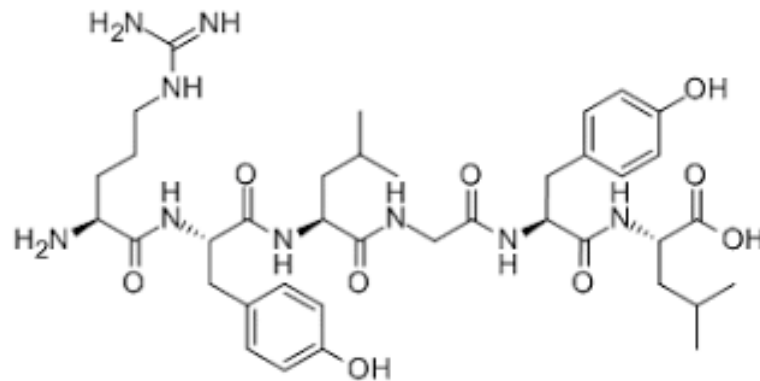
La caseína es la fracción más característica de las proteínas que forman la leche, es un producto único producido en las glándulas mamarias [23]. Se encuentra en la leche formando agregados y micelas; la micela de las caseínas se compone de un 94% de proteínas y un 6% de minerales [23], [47]. Son bastante resistentes y estables, por lo que soportan bien los procesos industriales, sin embargo, cuando la leche es sometida a tratamientos térmicos agresivos (temperaturas superiores a 120°C) precipitan [23], [47].

Una propiedad de interés de la caseína es que afecta a las características organolépticas de la leche disimulando el dulzor de la lactosa, lo cual permite el consumo diario de la leche sin que presente un efecto negativo para el organismo por ser demasiado dulce [23].

Finalmente, otra característica importante de la caseína en el sector lácteo (entre otros sectores) es que puede determinarse fácilmente. Cuando se aplica un pH isoelectrico en la leche las proteínas del suero se mantienen solubles mientras que la caseína precipita; la separación de las proteínas a través del pH isoelectrico se conoce industrialmente como electroforesis (este método consiste en aplicar un campo eléctrico en una muestra de leche, como las proteínas presentan grupos ionizables:  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$  se pueden cargar positivamente, negativamente o bien, permanecer neutras. La carga neta de

las proteínas depende del pH del medio en el que se encuentre, en el punto isoeléctrico la carga neta es cero) [49].

En la **figura 2**, se muestra la composición química de la caseína.



*Figura 2 Estructura química de la caseína.*

### ➤ Las proteínas del suero

Las proteínas que forman el suero láctico representan el 20% del total de proteínas que forman la leche y constituyen la parte de las proteínas no caseicas [47]. Son grupos proteicos, con una estructura globular, organizados en proteínas con una estructura secundaria y terciaria. Se pueden clasificar en:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoglobulina, inmunoglobulina y seroalbúmina [47].

-La  $\beta$ -lactoglobulina es la proteína más abundante en la leche de la mayoría de los mamíferos, sin embargo, no está presente en la leche humana [23].

-La  $\alpha$ -lactoglobulina es la 2ª más abundante, en este caso se encuentra particularmente en la leche humana, se trata de la molécula con menor peso molecular de las proteínas que forman el suero e interviene en la síntesis de la lactosa en las glándulas mamarias [23], [47].

-Las inmunoglobulinas están presentes en todas las leches de cualquier procedencia animal y son el grupo de estructuras proteicas más largas y heterogéneas [23], [47].

-La seroalbúmina es la proteína de mayor peso molecular de las proteínas que forman el suero láctico [47].

- **Vitaminas**

La leche presenta importantes valores nutricionales ya que en ella se encuentran todas las vitaminas necesarias para el organismo [22], [23]. El mayor inconveniente que presentan los grupos vitamínicos es que son compuestos fáciles de destruir ya sea por una exposición prolongada a la luz, por acción enzimática o por tratamientos de calor demasiado agresivos [22].

Las vitaminas que se encuentran en la leche se pueden clasificar en dos grupos: las vitaminas liposolubles, que se encuentran en forma de emulsión junto con la grasa y las vitaminas hidrosolubles, que son solubles en el agua.

- **Las vitaminas liposolubles:**

-Vitamina A. En la leche de vaca se puede encontrar como retinol, ésteres del retinol y carotenoides en una concentración de 100-500 mg/L, esta vitamina se produce a partir de la hidrólisis de los  $\beta$ -carotenos [26], [47].

-Vitamina D. También es conocida con el nombre de calciferol, se encuentra en la leche en una concentración de 1 mg/L [26], [47].

-Vitamina E. También recibe el nombre de  $\alpha$ -Tocoferol, esta vitamina se encuentran en la leche en una concentración de 500-1000 mg/L [26]. Esta vitamina es un antioxidante natural, por lo que protege de las reacciones de oxidación a las grasas y a los carotenos que se encuentran en la leche [23].

-Vitamina K. Esta vitamina se encuentra en cantidades de trazas (3,5 y 18  $\mu\text{g/L}$ ) en la leche por lo que no ejerce un valor importante a nivel nutricional para el organismo [47].

- **Las vitaminas hidrosolubles:**

-Vitaminas C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>. Entre estas vitaminas cabe destacar la vitamina C o ácido ascórbico, presente en la leche en una concentración de 20 mg/L, por su poder reductor. Es decir, su bajo potencial redox protege de la oxidación a la materia grasa de la leche impidiendo que se oxide y se desarrolle el sabor a óxido [47], [50]. El resto de vitaminas del grupo B se encuentran en concentraciones inferiores y se caracterizan por ser fuertemente inestables ante la exposición a la radiación y al calor [47].

- **Enzimas**

Las enzimas son complejos de naturaleza proteica que se encuentran en la leche en cantidades ínfimas, sin embargo, su presencia es fundamental dado que catalizan reacciones importantes determinando las propiedades y composición química de la leche.

La importancia de las enzimas en la industria láctea radica en que se emplean como indicadores de calidad ya que pueden proporcionar información sobre el grado de tratamiento térmico que se debe aplicar, pureza y frescura de la leche [51]. Por ejemplo, la presencia de la enzima catalasa es un indicador de que la vaca tiene mastitis (la catalasa produce un aumento en el número de leucocitos cuando el animal padece esta enfermedad). La presencia de la enzima fosfatasa alcalina se utiliza para determinar el grado de tratamiento térmico al que debe someterse la leche, puesto que la muerte de esta enzima tiene lugar a una temperatura similar a la que mueren microorganismos patógenos que puedan encontrarse en la leche. Otras enzimas, se utilizan para controlar la presencia de microorganismos contaminantes debido a su actividad antimicrobiana [52].

Otra consecuencia de la alterabilidad de la leche, además de las explicadas anteriormente, son los cambios enzimáticos que causan el deterioro de las características organolépticas de la leche [47]. Por esta razón, es importante llevar a cabo un buen control de su composición química durante todo su proceso de fabricación, la actividad enzimática es un factor que se monitoriza en la industria láctea mediante la estimación de enzimas presentes en la leche [47].

El origen de las enzimas que se encuentran en la leche de origen animal puede ser por motivos naturales, habiendo sido sintetizadas por las células somáticas del organismo (células que forman tejidos u órganos); estas enzimas se encuentran asociadas a la membrana de los glóbulos grasos, caseína y proteínas del suero. El segundo origen de las enzimas que pueden estar

presentes en la leche es debido a su liberación por microorganismos a causa de la contaminación microbiológica indeseada [47].

Las enzimas que hay en la leche se pueden clasificar en los siguientes grupos [22]:

- **Las enzimas hidrolasas:** son aquellas que catalizan reacciones de hidrólisis, en la leche catalizan la hidrólisis de la lactosa. Dentro de este grupo cabe destacar la enzima lipasa, fosfatasa, amilasa y lactasa. Su importancia en la leche se debe a que afectan a sus características organolépticas.
- **Las enzimas oxidorreductasas:** son enzimas que catalizan las reacciones de oxidación - reducción que se llevan a cabo en la leche. Entre ellas destacan las siguientes enzimas: catalasa, lactoperoxidasa y xantino - oxidasa. La importancia de estas enzimas se debe a que influyen en el sabor (xantino-oxidasa), además, algunas de ellas presentan actividad antimicrobiana. La enzima lactoperoxidasa cataliza la reacción del tiocianato en presencia de  $H_2O_2$  liberando compuestos con actividad antibacteriana y fungicida [47], [52].
- **Las enzimas transferasas:** son enzimas que transfieren grupos activos que han sido liberados por la ruptura de alguna molécula a otra sustancia que actúa como receptor. Por su abundancia en la leche de vaca cabe destacar, la enzima ribonucleasa, que se encuentra en una concentración de 25 mg/L (en la leche materna se encuentra en menor cantidad). Esta enzima produce la hidrólisis de ácidos ribonucleicos y está asociada a las proteínas del suero de la leche [23], [53].

- **Minerales**

Los minerales junto con las enzimas forman los constituyentes de la leche que están en menor proporción. Se pueden encontrar formando sales solubles o como una dispersión coloidal insoluble (son los minerales asociados a las micelas de la caseína) [22], [23].

El grupo de sales solubles lo forman minerales que se encuentran en forma de cloruros, citrato y bicarbonato de compuestos como son el calcio, magnesio, potasio y sodio. Los cloruros en forma de cloruro de sodio son los que se encuentran en mayor cantidad, en una proporción del 0,20%. El análisis de cloruros en la leche se utiliza para detectar posibles alteraciones, si el

contenido en estas sales es superior al normal puede indicar que la leche procede de una vaca con patología [22], [23].

Las sales coloidales representan el otro grupo en una proporción próxima al 0,33% [22]. Principalmente se refieren al contenido en calcio y fosfato, dado a la presencia predominante de ambos componentes [47]. El calcio es una de las sales de mayor valor nutricional ya que contribuye al mantenimiento de los huesos [48].

## 2.3 Sensores utilizados

### 2.3.1 Definición y Clasificación de los sensores

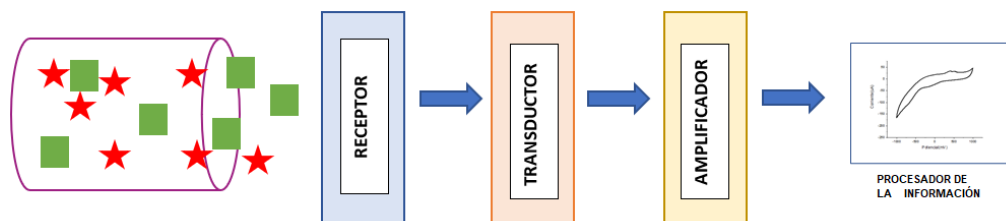
El constante crecimiento y desarrollo de la industria alimentaria hace necesario la aplicación de técnicas de análisis que sean capaces de adaptarse a los cambios del proceso industrial, permitiendo llevar a cabo controles rápidos y precisos con el fin de satisfacer la demanda de los consumidores. Además, el estigma de la industria alimentaria debe ser garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos y bebidas suministrados a las personas. En este contexto, surge el análisis por medio de sensores definido como la práctica fundamental en el control de calidad para garantizar la seguridad e inocuidad de los alimentos y bebidas.

Un sensor es un dispositivo capaz de convertir un estímulo externo en una señal, generalmente eléctrica, que se pueda medir para obtener información útil tanto cuantitativa como cualitativa [54]. La idealidad de un sensor se evalúa mediante el análisis de parámetros como la **sensibilidad** (habilidad de detectar cantidades pequeñas), **selectividad** (capacidad de detectar el analito de interés ante otros que actúan como interferencia), **reproducibilidad** (concordancia entre resultados independientes obtenidos con el mismo método y a partir de la misma muestra, en distintas condiciones experimentales) y **repetitividad** (concordancia entre resultados independientes obtenidos con el mismo método y a partir de la misma muestra bajo las mismas condiciones experimentales) [54], [55]. Además de estos parámetros, es importante tener en cuenta que en la industria se valoran otros aspectos del sensor como su coste de fabricación, tiempo de vida, tiempo de respuesta, etc [54], [55].

Los sensores presentan tres partes bien diferenciadas en su estructura: la zona de reconocimiento, la zona de transducción y el amplificador [55].

- **Zona de reconocimiento:** en esta zona se encuentra el receptor, es el dispositivo que interactúa directamente con la sustancia que se va a detectar. La interacción entre el receptor y la sustancia genera una señal primaria (óptica, másica, térmica o eléctrica) que será interpretada por un transductor [55], [56], [57].
- **Zona de transducción:** en esta zona se encuentra integrado el transductor. Este dispositivo recibe la señal primaria que le llega del receptor, de manera que es transformada en una señal eléctrica medible [58].
- **Amplificador** la mayoría de las señales eléctricas generadas necesitan ser amplificadas para poder interpretar la información; por lo que este dispositivo incrementa la intensidad de la señal eléctrica de salida que recibe del transductor. Finalmente, esta señal es enviada a un sistema de procesamiento donde se registran los datos y se presenta la información obtenida [58], [59].

En la **figura 3** se muestra el funcionamiento de un sensor.



*Figura 3 Estructura de un sensor.*

Los sensores se pueden clasificar en función de la naturaleza de la señal primaria, generada por la interacción entre el receptor y la sustancia a medir [57]:

- **Físicos:** la zona receptora recibe una información de tipo físico. Dentro de este grupo se encuentran los sensores que miden propiedades físicas como la absorbancia, temperatura, cambio de masa, presión, entre otras.



- **Químicos:** La interacción del receptor con el analito da lugar a una reacción química.

Dentro de los sensores nombrados, los de mayor interés son los sensores químicos, su importancia en el análisis sensorial radica en que se presentan como una nueva herramienta para el control y monitoreo del proceso productivo debiendo dar una respuesta rápida y selectiva [54], [55]. Un sensor químico es un dispositivo que transforma una señal química en una señal analíticamente útil; siendo capaz de proporcionar información acerca de la concentración de uno o más analitos presentes en la muestra [60].

Los sensores químicos se pueden clasificar en función de las propiedades que mida el transductor en:

- **Electroquímicos:** estos sensores miden una propiedad eléctrica generada por un sistema de electrodos. La señal producida (potencial o intensidad) es consecuencia de la interacción electroquímica que tiene lugar entre el analito y el sensor [55], [58].
- **Piezoeléctricos:** son dispositivos cuya respuesta se emite en forma de un cambio en la frecuencia de resonancia de un cristal piezoeléctrico. El cambio en la frecuencia depende de la cantidad de analito en masa depositado sobre la superficie del receptor [55], [58].
- **Ópticos:** son dispositivos que responden a la interacción de la radiación electromagnética de la luz (generalmente de la región del infrarrojo) con el analito; se basan en la medida del cambio en las propiedades ópticas del analito [55].
- **Térmicos:** son dispositivos que registran el calor de reacción generado por el analito a causa de su oxidación o por reacción con una sustancia del medio [55].
- **Multiarreglo:** son dispositivos sensibles a distintos analitos, cuyas respuestas son analizadas de manera simultánea para caracterizar a un sistema en concreto [55].

Los sensores electroquímicos son los sensores más destacados entre los que se han nombrado, ya que son los sensores más versátiles y los que más se han investigado a lo largo de los años [55]. En función de la propiedad eléctrica que

miden, los sensores electroquímicos se pueden clasificar en tres grupos. Los sensores **potenciométricos**, son dispositivos que miden el voltaje debido a una reacción química, generan una respuesta estableciendo una relación entre la diferencia de potencial entre un sistema de dos electrodos (electrodo de referencia y electrodo de trabajo) y la concentración del analito (líquido o vapor) [55], [58]. En los sensores **voltamétricos o voltamperométricos** se aplica un potencial variable con el tiempo, de esta manera se obtiene información del cambio del potencial con la intensidad de la corriente eléctrica [58], [61]. Los **sensores amperométricos**, son dispositivos en los que se aplica un potencial fijo obteniendo información de la variación de la intensidad de la corriente con el tiempo [58], [61]. Finalmente, los sensores electroquímicos se clasifican en sensores **conductimétricos**, son dispositivos en los que se aplica un potencial de corriente alterna y se mide el aumento de la conductividad eléctrica provocado por la presencia de iones en una solución [58], [62].

Dentro de los sensores electroquímicos, los sensores basados en métodos de transducción voltamétricos son los más indicados para el estudio de los procesos de oxidación - reducción de los compuestos mediante el análisis de voltamogramas. Debido a que presentan importantes ventajas como su elevada sensibilidad y selectividad [63].

En el desarrollo de este trabajo de investigación se presenta un innovador sensor electroquímico de tipo voltamétrico, basado en la tecnología de impresión molecular, denominado MIP (“molecular imprinted polymer”), esta nueva tecnología promete mejoras en la estabilidad y reproducibilidad de los análisis químicos.

### 2.3.2 La tecnología de polímeros de impresión molecular (MIP)

Los MIP son materiales que han sido sintetizados para el reconocimiento de moléculas específicas. Esta tecnología consiste fundamentalmente en la formación de una película polimérica en la que una molécula actúa como una plantilla, posteriormente la molécula se extrae y deja cavidades de reconocimiento específico sobre el polímero [64].

Los parámetros principales que intervienen en la formación de polímeros de impresión molecular son: el polímero, la molécula plantilla y un agente reticulante.

- Selección del polímero

Existen una gran variedad de polímeros que se puedan utilizar en la impresión molecular, pero deben cumplir unas características estrictas:

-El polímero tiene que ser químicamente compatible con la molécula plantilla, además debe ser capaz de unirse a ésta para crear las cavidades de reconocimiento [65].

-El polímero tiene que poder contener los sitios de reconocimiento complementarios a la molécula original.

Entre los polímeros empleados, cabe destacar el quitosán debido a sus características de biocompatibilidad y afinidad por diferentes tipos de moléculas [65]. Otros polímeros de impresión molecular están compuestos por ácido metacrílico [66], o-fenilendiamina [67], pirrol [68], etc.

- **Selección de la molécula plantilla**

Una de las mayores ventajas de los MIPs es la utilización, de prácticamente, cualquier tipo de analito, como azúcares, aminoácidos, fenoles, entre otras sustancias. Generalmente los compuestos empleados presentan grupos polares (-COOH,-OH) por lo que el complejo plantilla-polímero que se forma es bastante estable. Otro tipo de compuestos utilizados son: iones metálicos, macromoléculas, etc [69].

- **Agente reticulante o cross-linker**

Un agente reticulante (Cross-linker) es un compuesto que facilita la unión entre moléculas para dar lugar a una red mucho más estable y resistente. Por ello, la reticulación (o el cross-linking) se puede emplear para mejorar la estabilidad mecánica de ciertas sustancias químicas, como los polímeros. Consiste en una reacción química entre cadenas poliméricas que se mantienen unidas por medio de enlaces covalentes u otro tipo de enlaces, como las fuerzas de Van der Waals [70].

El empleo de cross-linkers en los procesos de síntesis de polímeros de impresión molecular es muy utilizado ya que estos influyen en tres aspectos importantes: intervienen en la morfología de los MIP, fijan las cavidades de

reconocimiento específico e Intervienen en la estabilidad mecánica del MIP [69]. Si el número de entrecruzamientos es insuficiente, se puede producir la pérdida de las cavidades específicas formadas en el polímero, ya que estas no se pueden mantener por no ser lo suficientemente estables. Como resultado de este fenómeno, el MIP pierde en cierto grado su capacidad de reconocimiento [69].

El proceso de fabricación de un MIP se pueden clasificar en las siguientes etapas [69]:

- **1º: Interacción entre la molécula y el polímero**

Los tipos de interacción que se pueden dar son [71], [72]:

- **Impresión covalente:** se establece un enlace covalente entre un polímero y la molécula plantilla, es un método complejo ya que este enlace se debe romper previamente para que la molécula se pueda eluir de la matriz polimérica.
- **Impresión no covalente:** la interacción entre la molécula plantilla y el polímero se lleva a cabo mediante interacciones débiles no covalentes. Se trata del método más utilizado para la elaboración de MIP debido a su simplicidad y facilidad de eliminar la molécula plantilla de la matriz del polímero.
- **Impresión iónica:** como plantilla se utilizan diferentes tipos de iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , etc.), se trata de una técnica desarrollada recientemente.

En el presente trabajo de investigación se utilizó como matriz polimérica quitosán y como molécula plantilla un azúcar (lactosa, glucosa o galactosa). La unión se llevó a cabo mediante el método no-covalente, como se ha explicado, en este método el enlace entre el polímero y la molécula plantilla tiene lugar mediante fuerzas de interacción débiles de tipo fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno [73], [74].

- **2ª: Polimerización.**

La polimerización del polímero en presencia de la molécula plantilla se realiza para obtener una plantilla polimérica de la molécula de interés. En la elaboración de MIPs existen una gran variedad de procesos de polimerización, en concreto, en la elaboración de sensores destacan los sensores de impresión superficial sobre el electrodo de trabajo, cuyos principales métodos de polimerización se describen a continuación [69]:

- **Electropolimerización.** Es un proceso de deposición, realizado en presencia de la molécula plantilla, en el que se forma una película polimérica sobre un electrodo de trabajo. Se puede llevar a cabo a través de diferentes técnicas electroquímicas, tales como, métodos voltamétricos ( el proceso empleado suele ser mediante voltametría cíclica aplicando un intervalo de potencial), métodos potenciométricos (se aplica un potencial constante) y métodos galvanostáticos (se aplica una corriente constante) [68].
- **Fotopolimerización in situ.** Es una técnica de deposición in situ que al igual que la anterior permite depositar la plantilla polimérica directamente sobre el electrodo de trabajo. El proceso se lleva a cabo por polimerización radicalaria, la mezcla de preparación MIP contiene un iniciador sensible a la luz, de manera que al incidir la radiación sobre él, absorbe la energía lumínica y proporciona radicales libres. De esta manera, se inicia el proceso de polimerización del polímero [75].
- **Sandwich.** Esta técnica consiste en depositar unas gotas de la solución MIP sobre un electrodo, para ello la solución se coloca en una superficie metálica o sobre dos láminas metálicas. Después de llevarse a cabo la polimerización, se separan las láminas logrando obtener películas muy finas [76].  
El principal problema de esta técnica es la falta de reproducibilidad que se produce al aplicar fuerzas de compresión durante la polimerización, por lo que se emplea con menor frecuencia que la anteriores descritas [76].

- **3º: Elución de la molécula plantilla**

La molécula plantilla se elimina de la matriz polimérica utilizando un disolvente adecuado, de esta manera se forma una plantilla polimérica de la molécula empleada. Es por ello, por lo que los MIP presentan la capacidad de reconocer moléculas con una alta selectividad, dado que tras la elución las cavidades creadas en el polímero presentan múltiples sitios de unión con una configuración espacial que es complementaria al analito [69].

### 2.3.2.1 Origen e historia de la tecnología de impresión molecular

En 1949 Dickey fue el primero en investigar el concepto de impresión molecular, el cual fue inspirado por los experimentos llevados a cabo por Linus Pauling quien defendía la formación de anticuerpos usando el antígeno como una molécula plantilla [71]. Dickey es el responsable de la creación de la técnica de impresión molecular de gel de sílice (MISC) y basó sus investigaciones en la precipitación de silicagel en presencia de tintes orgánicos, descubriendo que la impresión de sílice proporcionaba una gran selectividad hacia el tinte [71]. Desde entonces, se han llevado a cabo varios estudios basados en la impresión molecular a base de sílice, por ejemplo, en 2013 se estudió la detección del ácido salicílico mediante esta técnica [77].

En 1972 Wulff y Klotz dos líderes de grupos de investigación independientes, llevaron a cabo los primeros mecanismos de impresión molecular [78]. El primero desarrolló un complejo basado en la impresión molecular de tipo covalente, que incluía un monómero y la molécula plantilla para la detección de azúcares [79]. Al mismo tiempo Klotz sintetizó polímeros de impresión molecular utilizando polímeros y uniones de tipo covalente entre la molécula y la plantilla. Años después, Mosback llevó a cabo la síntesis de impresión molecular utilizando otros métodos de unión entre la molécula plantilla y el polímero, en concreto enlaces de tipo no covalentes [71].

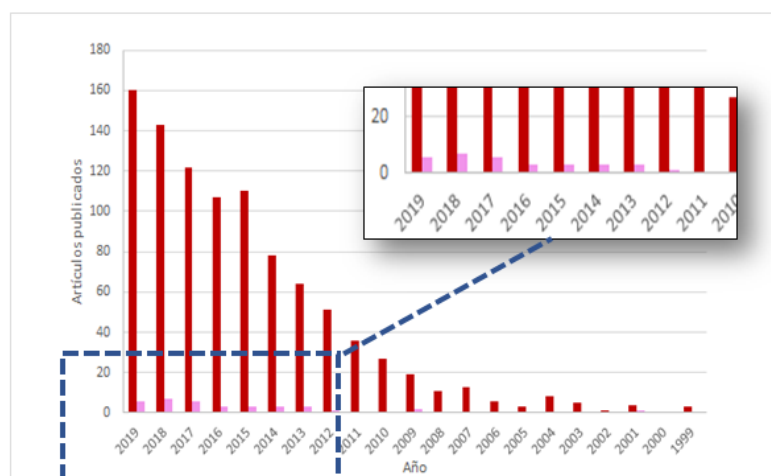
Debido a sus excelentes propiedades los MIP han cobrado una mayor importancia en estos últimos años habiendo sido utilizados en multitud de aplicaciones. Se han elaborado MIP para la separación de compuestos quirales y de proteínas, los cuales son muy utilizados en la industria farmacéutica [80]. En el análisis ambiental, para la purificación de aguas y eliminación de metales pesados [80]. En el desarrollo de sensores basados en diferentes métodos de transducción (electroquímicos [64], ópticos [81], etc.). En medicina, para la liberación de fármacos [80] y como catalizadores, imitando las funciones de las enzimas pero con una mayor estabilidad [82].

Los primeros sensores que emplearon la tecnología de impresión molecular fueron elaborados entorno a los años 2000. En 1996 se publicó el primer

artículo elaborado por Franz L. Dicker referido a sensores MIP basados en métodos de transducción piezoeléctricos. En el experimento se crearon plantillas poliméricas con varios tipos de disolventes orgánicos volátiles, una vez creada la plantilla se calculó la masa de analito depositada midiendo el cambio en la frecuencia de resonancia de una microbalanza de cuarzo. Con los resultados de la investigación se concluyó que estos sensores presentarían un futuro prometedor puesto que fueron capaces de reconocer selectivamente disolventes orgánicos según su tamaño y forma [83].

Recientemente se han desarrollado sensores electroquímicos basados en la impresión molecular para el reconocimiento de azúcares, principalmente para la glucosa, por su impacto en enfermedades como la diabetes. W. Zhen et al. desarrollaron un sensor basado en polímeros de impresión molecular para el reconocimiento de glucosa [84]. A. Diouf et al. sintetizaron un sensor electroquímico para la cuantificación de glucosa presente en la saliva [41]. También, se han desarrollado sensores MIP para el reconocimiento de disacáridos, por ejemplo, H. Shekarchizadeh et al. fabricaron un sensor MIP electroquímico para la detección de sacarosa en el zumo de remolacha [83].

Tal y como se muestra en la **figura 4**, el desarrollo de sensores MIP ha ido creciendo con el paso del tiempo, siendo su empleo en el análisis electroquímico cada vez más pronunciado. Su aplicación para la identificación de azúcares se encuentra todavía en sus primeros indicios, encontrándose las mayores referencias entre los años 2018 y 2019. Debido al interés que presentan los MIP, es interesante llevar a cabo nuevas investigaciones que contribuyan al estudio iniciado en estos últimos años dirigido a la detección de azúcares.



**Figura 4** MIP basados en métodos de transducción electroquímicos (rojo), MIP basados en métodos de transducción electroquímicos empleados en la detección de azúcares (rosa). Publicaciones correspondientes al periodo 1999-2019 obtenidas de la base de datos: SCOPUS (Elsevier).

### 2.3.2.2 Sensores basados en la tecnología de impresión molecular

Los sensores MIP son una buena alternativa frente a los métodos tradicionales de análisis (cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución, etc.) debido a sus excelentes propiedades como estabilidad, bajo coste y especificidad [85]. Estos sensores son capaces de detectar una gran variedad de analitos como: proteínas [86], virus [87], azúcares [84], fenoles [12], etc. Por ello, presentan un gran potencial en diferentes campos: industria alimentaria, análisis ambiental, análisis clínico o análisis químico, entre otros [88].

Para un mayor entendimiento del presente trabajo es necesario especificar en que consiste un sensor NIP (“no molecularly imprinted polymer”). Dicho sensor, es análogo al MIP, sin embargo éste se obtiene en ausencia de la molécula plantilla, por lo que no cuenta con las cavidades de reconocimiento específico.

Para obtener un buen funcionamiento, un sensor MIP debe tener las siguientes propiedades [69]:

- **Rigidez.** Las cavidades de reconocimiento deben mantener su forma y tamaño después de que la molécula sea eliminada de la matriz polimérica.
- **Flexibilidad.** Se debe optimizar el proceso de reconocimiento, consiguiendo un equilibrio entre las cavidades creadas y la concentración de analito.
- **Estabilidad mecánica.** El sensor debe mantenerse estable con cada medida.

Al igual que los sensores tradicionales, los sensores basados en MIPs se pueden clasificar en función de su principio de funcionamiento en los siguientes sensores:

- **Sensores de afinidad (“Affinity sensors”):** son sensores capaces de detectar moléculas con características medibles. Dentro de este tipo se encuentran los sensores basados en métodos de transducción piezoeléctricos (se basan en el empleo de un cristal piezoeléctrico que



vibra al aplicarse un potencial, la frecuencia de oscilación del cristal varía en función de la masa de analito depositada en el sensor MIP) [76], [89]; sensores MIP electroquímicos [76] (se basan en diferentes técnicas electroquímicas como la voltametría, amperometría y potenciometría) y sensores MIP ópticos; en los que el sensor detecta un cambio en alguna propiedad óptica durante el enlace entre los grupos funcionales del polímero y la molécula plantilla [90].

- **Receptores.** Estos sensores se basan en la detección directa del analito, aprovechan el momento de unión entre la molécula y la plantilla cuando tiene lugar un cambio en alguna característica del MIP (conductividad eléctrica, potencial superficial o permeabilidad). Dentro de este grupo hay sensores MIP electroquímicos y ópticos [76]. Por ejemplo, se han desarrollado sensores MIP electroquímicos para la detección de glucosa basados en el efecto denominado “gate effect”. El enlace entre la glucosa y los sitios de unión de la plantilla produce un cambio en la configuración del polímero, modificándose la permeabilidad de la película polimérica, dificultando por tanto, el proceso de difusión de las moléculas a su través. Así la detección, en este experimento, se llevó a cabo registrando la disminución de la intensidad de la señal en presencia de glucosa [91].
- **Sensores MIP Catalíticos.** Constituyen la última generación de sensores MIP, en este grupo se fabrican sensores que imitan la actividad catalítica de las enzimas. Actualmente, son pocos los sensores desarrollados según este principio, un ejemplo, ha sido la fabricación de un sensor MIP que imita el funcionamiento de la enzima tirosinasa. El sensor consiste en utilizar un complejo como molécula plantilla similar a la enzima, para catalizar las reacciones de oxidación del catecol (análito de interés en el estudio de la calidad del vino) [79].

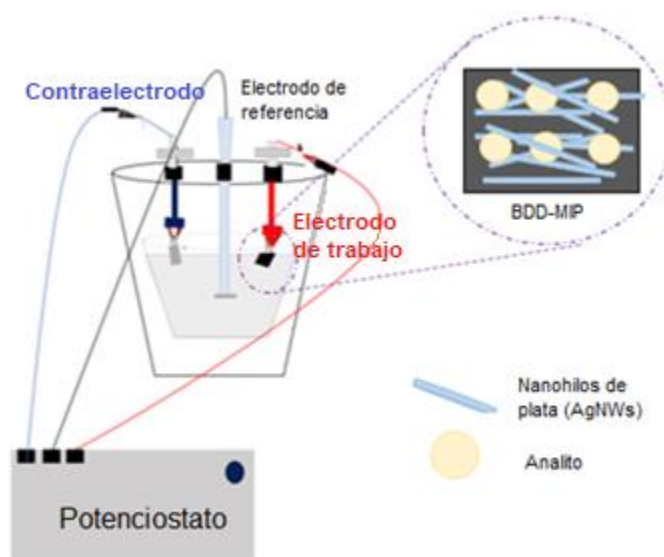
Entre los sensores que se han nombrado, los sensores MIP electroquímicos son los que representan el mayor interés en el análisis químico, debido a su bajo coste y facilidad de obtención [85].

La fabricación de sensores MIP electroquímicos se puede clasificar en dos etapas:

- **Electrodo modificado mediante la técnica de impresión molecular**

El método de integración más utilizado para la deposición del MIP en el electrodo de trabajo es la electropolimerización por ser rápido y eficaz [85]. La principal ventaja de esta técnica es que los parámetros controlables como el tiempo de deposición y el potencial aplicado permiten controlar aspectos importantes como el grosor de la película polimérica [79].

En el presente trabajo de investigación el sensor MIP fue elaborado mediante técnicas de electropolimerización a través de cronoamperometría. El proceso consistió en aplicar un potencial constante para producir la polimerización del polímero, en presencia de la molécula plantilla, sobre la superficie del electrodo. A continuación, se muestra una imagen esquemática de este proceso.



**Figura 5** Esquema de fabricación de un sensor MIP [CHI-AgNWs-molécula plantilla]/BDD en una celda electrolítica con una configuración de tres electrodos (electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia) donde se representa la deposición de la solución a través de electropolimerización por cronoamperometría sobre un electrodo de diamante dopado con boro (BDD).

- **Elución y reconocimiento del analito**

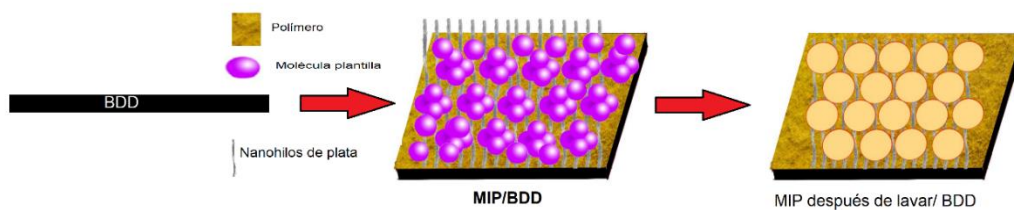
La elución consiste en eliminar la molécula plantilla de la matriz del polímero, de esta manera se crean cavidades de reconocimiento con una estructura tridimensional que coincide en tamaño y forma con el analito de interés, es decir, se forma un plantilla polimérica. Esta plantilla aporta especificidad al sensor lo que le permite llevar a cabo la detección selectiva de la molécula plantilla [69]. Dado a la importancia que esto supone, se deben tener en cuenta las condiciones en la que se realice el análisis puesto que el uso de ciertos

disolventes orgánicos, las altas temperaturas o el empleo de solventes donde el polímero sea soluble podrían dañar la plantilla sintetizada en el MIP [65]. A pesar de ello, no se trata de una etapa costosa y en ella, se pueden emplear distintos tipos de eluyentes. Por ejemplo, se ha utilizado agua caliente presurizada para la elución de moléculas de clorofila de una matriz polimérica elaborada a partir de ácido metacrílico y metacrilato de etilenglicol [65]. También, se ha empleado cloruro de potasio (KCl) para eliminar catecol de una matriz polimérica de chitosán [12]. Otros disolventes, como el HCl se han utilizado para la elución de glucosa de una matriz polimérica compuesta por ácido 3-aminobenzenoborónico (APBA) [84]. En conclusión, la elección del eluyente dependerá principalmente de las características de la molécula plantilla y del polímero, debiendo seleccionar en todo momento un solvente que no dañe a la película polimérica y en el que la molécula plantilla sea soluble.

Una vez eliminada la molécula plantilla se lleva a cabo la detección de ésta, durante este momento tiene lugar la selectividad entre la molécula y la plantilla polimérica. Este proceso se corresponde con la última etapa del análisis electroquímico y puede verse afectado por distintos factores [69].

- **Presencia de compuestos inhibidores.** Puede haber grupos inhibidores que impidan que la molécula se adapte perfectamente en las cavidades ocupando sus sitios de unión.
- **Cambios en la orientación espacial** de los grupos funcionales del polímero. Factores como los cambios de temperatura o los disolventes empleados pueden causar cambios en la configuración espacial de los grupos funcionales, en consecuencia, no se produce el enlazamiento entre el analito y las cavidades del polímero.
- **Fenómenos de repulsión.** Puede haber grupos funcionales en las cadenas del polímero que impidan que la molécula y los sitios de unión reaccionen.
- **Selección del disolvente.** Como se ha explicado anteriormente, el disolvente puede dañar al polímero, debido a ello es importante utilizar un solvente en el que el polímero no sea soluble.

A continuación, se muestra un esquema del proceso de las etapas descritas:



*Figura 6* Esquema de fabricación de un sensor MIP donde se muestra el proceso de polimerización y a continuación, un sensor MIP donde se ha llevado a cabo el proceso de elución de la molécula plantilla.

### 2.3.2.2.1 Ventajas de la impresión molecular

La elaboración de sensores electroquímicos a partir de MIP es una tecnología relativamente reciente desarrollada para reconocer bajas concentraciones del analito. La impresión molecular es una de las pocas tecnologías que permite la fabricación de receptores sintéticos, además presenta importantes ventajas sobre otros compuestos utilizados para el reconocimiento específico, como las enzimas. Entre las ventajas más destacadas de los sensores basados en esta tecnología se encuentran [80]:

- **Estabilidad:** los MIP son estables en un amplio rango de pH, temperaturas y presión, por estas razones son buenos sustitutos de agentes biológicos [80].
- **Bajo coste.** Los sensores basados en polímeros de impresión molecular resultan más baratos comparados con el empleo de receptores biológicos como las enzimas [80].
- **Preparación del sensor MIP sencilla** [80].
- Los polímeros pueden formar plantillas para una gran cantidad de analitos [80].
- **Reconocimiento específico y selectivo** en disolventes orgánicos, por lo que no están limitados a detecciones en medios acuosos [80].

### 2.3.3 Agentes reticulantes. Glutaraldehído

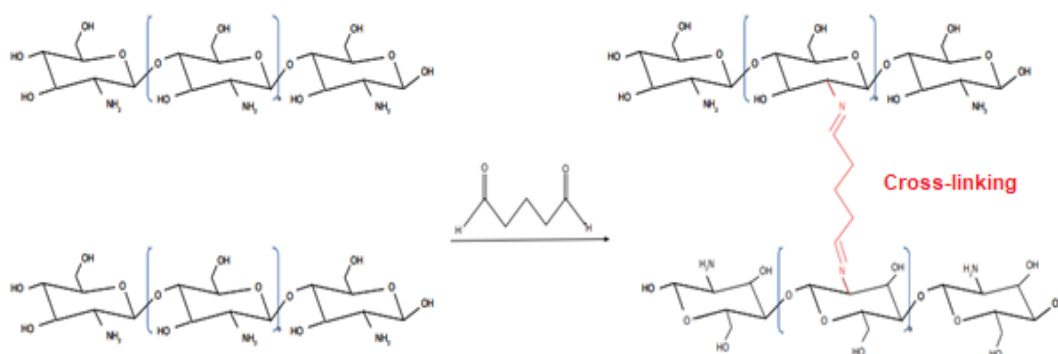
En la elaboración de MIP, se suele utilizar un agente reticulante para obtener una plantilla del polímero más estable, y por ende, un mejor comportamiento

del sensor [69]. En este trabajo uno de los experimentos para fabricar el MIP se llevó a cabo en presencia de glutaraldehído como agente reticulante.

El glutaraldehído es un compuesto químico perteneciente a la familia de los aldehídos, a temperatura ambiente es un líquido oleaginoso incoloro o con una leve coloración amarilla, su fórmula molecular es  $\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$  [92].

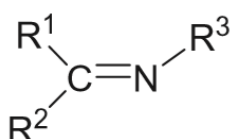
El glutaraldehído se ha empleado porque es considerado un buen agente reticulante para el desarrollo de MIPs basados en quitosán, dado a que este polímero presenta grupos amino reactivos ( $-\text{NH}_2$ ) que reaccionan con los grupos aldehído ( $-\text{CHO}$ ) del glutaraldehído [93]. Esta reacción es selectiva, por lo que los grupos hidroxilo  $-\text{OH}$  del quitosán no intervienen en la reacción con el glutaraldehído [94].

El proceso simplificado de entrecruzamiento del quitosán con el glutaraldehído se puede ver en la **figura 7**.



**Figura 7** Reacción simplificada del proceso de entrecruzamiento del quitosán con glutaraldehído.

El producto de reacción entre el quitosán y el glutaraldehído da lugar a una base de Schiff's [95], una base de schiff's es un enlace imina constituido por un carbono y un nitrógeno unidos a través de un doble enlace ( $\text{N}=\text{C}$ ), su estructura típica se muestra en la **figura 8**, tal y como se observa, esta compuesta por tres radicales  $\text{R}_1, \text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  que pueden ser grupos alquilo o arilo [96].



**Figura 8** Estructura genéricas de una base de Schiff's con tres radicales  $\text{R}_1, \text{R}_2$  y  $\text{R}_3$ .

## 2.4 Electroodos empleados en el análisis electroquímico.

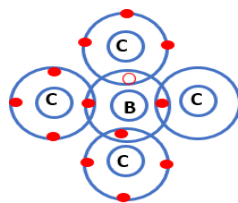
El tipo de electrodos de trabajo empleados en el análisis electroquímico varía en función de las técnicas electroquímicas de análisis, en voltametría, los electrodos de metales nobles son los más empleados, entre ellos destacan: los electrodos de plata [97], los electrodos de oro [98] y los electrodos de platino [99]. Estos electrodos destacan por sus buenas características de conductividad y por ser materiales inertes, por lo que no intervienen en las reacciones de oxidación-reducción que tienen lugar en la celda electrolítica. Sin embargo, presentan problemas de reproducibilidad por la formación de óxidos en su superficie [99], [100].

Debido a ello, los electrodos metálicos se han ido remplazando en los últimos años por los electrodos de carbono cuya principal ventaja es su amplia ventana de potencial y su facilidad de limpieza (las impurezas de la superficie de los electrodos de carbono se eliminan fácilmente) [99].

Dentro de los electrodos de carbono existen varios tipos, pues es un compuesto con diferentes formas alotrópicas. En concreto, el diamante es la segunda forma más estable del carbono después del grafito, además, tiene una de las estructuras moleculares más destacables, por sus propiedades extraordinarias como son: su extremada dureza y alta conductividad térmica [101]. A pesar de estas características, el diamante (sin dopar) no se emplea como electrodo dado a su alta resistividad eléctrica ( $10^{20} \Omega/\text{cm}$ ) que le hace funcionar como un sólido aislante, lo que es debido a su ancho de banda prohibida (según el modelo de la teoría de bandas, en un sólido aislante, la banda de valencia (BV) y la banda de conductividad (BC) se encuentran separadas por una banda prohibida de una energía muy alta, por lo que no es posible el salto del electrón de la BV a la BC [102]). Por esta razón, los electrodos de diamante se dopan con otros elementos con el fin de mejorar su conductividad eléctrica.

Los electrodos de diamante dopados con boro (BDD) constituyen un material semiconductor de "tipo p" (un material de "tipo p" se obtiene al introducir huecos libres en la estructura química del elemento, **figura 9**) ya que el boro presenta tres electrones en su banda de valencia y el carbono 4, por lo que se genera un hueco libre en su estructura química, de esta manera se consigue reducir su resistividad a la décima parte  $10^2 \Omega/\text{cm}$  [102], [103].

Otros electrodos de carbono destacables son los electrodos de carbón vítreo que son muy utilizados en electroquímica por ser electrodos inertes, duros y por presentar una resistencia eléctrica muy baja [104], [105].



*Figura 9* Diamante dopado con boro. Se representan los huecos introducidos por el boro.

Dentro de los electrodos que se han explicado, los BDDs son los materiales más destacables en el análisis electroquímico, debido a que algunas de sus propiedades como su baja resistividad eléctrica y amplia ventana de potencial los convierten en materiales de especial interés en este campo.

Cuando se utilizan estos materiales como electrodos de trabajo, para obtener una buena reproducibilidad del análisis, se deben tener en cuenta los aspectos descritos a continuación [106].

- Cuando se utilizan finas películas de BDD depositados en sustratos conductores la limpieza de su superficie se tiene que realizar mediante métodos químicos y no mediante métodos físicos (pulido mecánico), para no dañar a la misma [106].
- Antes de usarles en el análisis químico se lleva a cabo un pretratamiento o limpieza de su superficie que contribuye a la mejora de sus características químicas y físicas. Por ejemplo, puede llevarse a cabo mediante métodos electroquímicos aplicando un potencial o corriente eléctrica [106].
- Los tratamientos demasiado fuertes (ej. aplicar potencial o una corriente elevada) pueden dañar el material del electrodo, afectando negativamente a la reproducibilidad o al rendimiento del mismo (aumento de la corriente de fondo) [106].

### 2.4.1 Electrodo BDD

Los electrodos BDD se caracterizan por ser materiales semiconductores con importantes ventajas respecto a otros electrodos semiconductores por su amplia ventana de potencial, baja corriente de fondo, alta estabilidad electroquímica, por ser químicamente inertes y no tóxicos [107], [102].

A continuación, se describen de una manera más precisa las características nombradas.

- **Amplia ventana de potencial.** La ventana de potencial constituye el intervalo donde se llevan a cabo las reacciones de oxidación-reducción de las especies químicas, por lo que los analitos deben ser electroactivos dentro de este intervalo [108].

La ventana de potencial que ofrece el diamante permite distinguir reacciones a potenciales altos y bajos [109]. Por ejemplo, la reacción del oxígeno a 2,25 V y del hidrógeno a -1,1V se puede distinguir en los electrodos BDD mientras que en otros electrodos como: el grafito, el carbón vítreo, el oro o el platino no se puede apreciar [110].

- **Estabilidad electroquímica.** El diamante se forma por hibridación  $sp^3$  mediante un enlace sigma que une a los átomos de carbono. La fortaleza de este enlace le confiere al diamante una gran estabilidad electroquímica [102].
- **Baja corriente de fondo.** En electroquímica la corriente de fondo se refiere a las reacciones de electrólisis debidas a las impurezas presentes en la solución, electrólisis del analito, electrólisis del material del electrodo y la corriente capacitiva. Las tres primeras son corrientes farádicas debidas a las reacciones químicas que tienen lugar en el electrodo, mientras que la corriente capacitiva se debe al comportamiento de la celda electroquímica como un condensador (interfaz entre el electrodo y la solución) [111], [112] .

La corriente de fondo generalmente es indeseable excepto la referida a la corriente generada por el analito. Los electrodos BDD presentan una corriente de fondo pequeña, esta propiedad es de gran interés en electroquímica, ya que permite llevar a cabo un análisis más sensible, además de conseguir límites de detección más bajos [111], [112].

#### 2.4.1.1 Obtención de los electrodos BDD

Dado a la repercusión que tiene el método de fabricación de los electrodos BDD en el análisis electroquímico se han investigado varios métodos para su obtención.



El método más empleado para la síntesis de BDDs es el proceso de deposición química de vapor (CVD). Este método permite controlar la presencia de impurezas de grafito que pudiese haber en el electrodo y que pudieran repercutir negativamente en el análisis electroquímico causando un aumento de la corriente de fondo y una disminución de la ventana de potencial del electrodo BDD. Dentro de este método se emplean distintos sustratos para la deposición de los BDDs, entre los más empleados destacan: los sustratos metálicos (Ti, Mo y W) y los sustratos de materiales cerámicos como el silicio [106], [107], [110].

La deposición química de vapor a altas temperaturas y presiones (HTHP) constituye otra de las formas para obtener polvo de diamante dopado con boro compacto. A pesar de que este proceso permite obtener BDDs con características similares a la deposición química de vapor, es un proceso que se lleva a cabo en condiciones de presión y temperatura más restrictivas por lo que es una técnica menos utilizada para la obtención de este tipo de electrodos [107].

## 2.5 Sensores basados en nanomateriales

Con el desarrollo de la nanotecnología en el campo del análisis sensorial se han podido introducir nanomateriales que mejoran en gran medida el comportamiento de los sensores electroquímicos. Debido a la importancia que esto supone, la modificación de sensores con superficies nanoestructuradas ha representado el epicentro de estudio de un gran número de grupos de investigación.

En los últimos años se han modificado sensores electroquímicos con nanotubos de carbono por sus características de resistencia mecánica, y propiedades físicas y químicas [64]. Se han sintetizado sensores MIP modificados con nanopartículas de oro con objeto de mejorar la intensidad de corriente alcanzada por el sensor [85]. También, se han empleado nanohilos metálicos para mejorar el rendimiento del sensor incrementando su área efectiva [98].

La plata, por si sola, representa uno de los metales con mejores características de conductividad eléctrica y térmica [113]. Por esta razón, los nanomateriales basados en dicho metal son de gran interés en la industria de la nanotecnología. En concreto, los nanohilos de plata (AgNWs) constituyen uno de los nanomateriales más interesantes ya que presentan excelentes propiedades que les convierten en materiales muy adecuados para el desarrollo de los sensores electroquímicos [114], [115], [116], [117].

Wagner se considera uno de los primeros desarrolladores de los electrodos semiconductores basados en nanohilos de diferentes materiales. En 1964 sintetizó microhilos de silicio, utilizando el oro como catalizador del proceso, mediante métodos de vapor-líquido-sólido (VLS) a través de los cuales consiguió sintetizar nanoestructuras por deposición química de vapor. En 2001 se lograron sintetizar los primeros AgNWs a través del mismo proceso [118]. Desde este momento, en la primera década de S.XXI se han realizado números estudios dedicados a la obtención de AgNWs teniendo en cuenta que su tamaño, forma y estructura son parámetros que determinan sus propiedades [113], [119], [120].

### 2.5.1 Los nanohilos de plata (AgNWs)

Los AgNWs son nanoestructuras consideradas de una dimensión (1D) que cuentan con una largura mucho mayor a su diámetro, generalmente el diámetro varía entre 10 - 200 nm y su longitud puede variar entre 5 - 100  $\mu\text{m}$  [113], [120]. Gracias a su configuración exhiben propiedades extraordinarias, como son [121]:

- **Transparencia óptica y conductividad eléctrica:** El empleo de AgNWs como conductores transparentes representa un futuro prometedor, su importancia en este campo radica en su propiedades como son: su elevada conductividad, sus propiedades ópticas y su sencillez de obtención junto con el bajo coste de preparación [121], [122], [123].
- **Flexibilidad:** los AgNWs presentan una estructura cúbica centrada en las caras (FCC) que les proporciona una alta flexibilidad y resistencia a la tracción [124]. La fabricación de dispositivos electrónicos flexibles constituye uno de los campos en los que más se ha investigado en los últimos años, siendo la flexibilidad de los AgNWs (entre otras propiedades) lo que hace que puedan ser empleados en dispositivos electrónicos que pueden ser curvados. Por ello, se han incorporado en células solares y TCF (películas térmicas conductoras transparentes) [121].
- **Área efectiva:** los AgNWs presentan un relación Longitud/Diámetro elevada lo que hace que tengan una gran superficie en comparación al volumen que ocupan [125]. Esta característica es importante porque influye en las propiedades conductoras y ópticas de éstos. Se ha

demostrado que, en los AgNWs de diámetros superiores a 50 nm, cuanto mayor es su diámetro mayor es su conductividad. Por el contrario, en AgNWs cuyos diámetros son inferiores a 20 nm, cuánto menor es el diámetro mejores son sus propiedades conductoras y ópticas [126].

- **Confinamiento cuántico:** el confinamiento cuántico tiene lugar cuando el tamaño del nanocrystal es muy pequeño en comparación con la longitud de onda de un electrón, por lo que se dice que los electrones se encuentran encerrados en un espacio cuántico ocupando diferentes niveles de energía a los que ocuparían en el mismo material de tamaño macromolecular. Este fenómeno hace que las propiedades ópticas y eléctricas sean diferentes en comparación a las que tendría el material a una escala superior [127].
- **Efecto catalítico:** se ha demostrado que el empleo de nanoestructuras, como AgNWs, mejoran la transferencia electrónica de polímeros de mala conductividad eléctrica. También, actúan como mediadores electrónicos mejorando la transferencia de electrones de la solución al electrodo [64], [128].
- **Resonancia de plasmón superficial:** es el fenómeno que tiene lugar cuando los electrones que están situados en la capa superficial de un metal son excitados por los fotones de un haz de luz y después se propagan paralelamente a lo largo de la superficie del metal [129]. Los AgNWs presentan un plasmón de resonancia muy intenso que se puede apreciar en la banda de absorción UV- VIS lo que permite estudiar las propiedades ópticas de dichos materiales [130].

## 2.5.2 Desarrollo de sensores basados en AgNWs

Los AgNWs constituyen nanomateriales de gran importancia en la síntesis de sensores nanoestructurados. En concreto, su utilización en sensores electroquímicos representa uno de sus principales campos de aplicación debido a que ciertas de sus propiedades (conductividad, área efectiva, entre otras) les convierten en materiales predilectos para el desarrollo de los mismos [131]. Por ello, son varios los estudios dedicados a la integración de estas nanoestructuras para la detección de compuestos de interés.

El equipo de investigación de X. Gao et al. llevaron a cabo el desarrollo de un sensor electroquímico para la detección de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la leche de vaca. La detección de dicho producto es muy importante dentro de la industria alimentaria, y en concreto en el sector lácteo. Su presencia se debe a que es una sustancia muy empleada para el control del desarrollo bacteriano en productos lácteos, sin embargo, a elevadas concentraciones puede causar daños en el organismo. El sistema de medida desarrollado por el equipo de investigación contaba con un electrodo de trabajo de carbón vítreo que se modificó depositando AgNWs a través de “drop coating” sobre la superficie del electrodo, finalmente, mediante la misma técnica depositaron una solución de quitosán utilizada como soporte para los AgNWs. El comportamiento del sensor frente a la detección del  $H_2O_2$  fue evaluado a través de técnicas electroquímicas, como la amperometría, en muestras de leche donde se demostró una gran sensibilidad del sensor debido principalmente a la capacidad electrolítica, área efectiva y conductividad eléctrica que proporcionaron los AgNWs [114].

J. Turan et al. llevaron a cabo el desarrollo de un biosensor modificado con AgNWs para la detección de plaguicidas, como el paraoxón, que pueden estar presente en la leche (muchos plaguicidas acaban en productos de consumo diario debido a que forman parte de la cadena alimentaria de los animales). El sistema de medida basado en métodos de transducción amperométricos contaba con un electrodo de trabajo de grafito modificado con AgNWs, la enzima que cataliza los procesos redox del compuesto de interés (butirilcolinesterasa) y un polímero conductor que sirve de soporte para dicha enzima. El comportamiento del sensor fue evaluado mediante amperometría a través de la inmersión del electrodo en muestras de leche con paraoxón. El equipo concluyó que la presencia de los AgNWs a una concentración específica junto con el polímero conductor contribuía a mejorar la sensibilidad, selectividad y estabilidad de la enzima en el electrodo [115].

Por su repercusión en el presente trabajo, también es de interés señalar el desarrollo de electrodos que han sido modificados con AgNWs y que se han empleado para la detección de azúcares. V. H. Luan et al. desarrollaron un sensor electroquímico para la detección de glucosa, analito de gran interés en la industria alimentaria y en medicina. El sistema sensor contaba con un electrodo de trabajo de carbón vítreo modificado con AgNWs y grafeno. La sensibilidad del sensor fue evaluada a través de amperometría, en este estudio se concluyó que los AgNWs combinados con el grafeno mejoraban significativamente la sensibilidad del mismo debido a su actividad electrocatalítica [116].

Finalmente, un biosensor elaborado para la monitorización de glucosa fue fabricado por X. Jang et al. El equipo de investigación obtuvo un sensor para la

monitorización de glucosa a través de la detección de  $H_2O_2$  (la enzima glucosa oxidasa con oxígeno genera peróxidos), cuyo funcionamiento se evaluó mediante voltametría cíclica. El sistema sensor contaba con un electrodo de trabajo de carbón vitreo modificado con AgNWs, los cuales funcionaron como agentes electrocatalíticos de los procesos de reducción del  $H_2O_2$  que tenían lugar en la celda electrolítica. Los AgNWs mejoraron la transferencia electrónica de los electrones de la solución al electrodo y demostraron una mejora en la intensidad de los picos catódico mostrados en el voltamograma correspondiente a los procesos de reducción del  $H_2O_2$  [117].

### 2.5.2.1 Síntesis de AgNWs

Existen una gran variedad de métodos de obtención de AgNWs que se han ido perfeccionando a lo largo de estos últimos años, ya que el método de fabricación influye en su organización estructural y en su dimensión. Los procesos de fabricación de AgNWs se pueden clasificar en: métodos físicos y métodos químicos.

Los **métodos físicos** se fundamentan en procesos de pulverización mecánica, los AgNWs obtenidos mediante este tipo de técnicas no son uniformes y presentan impurezas, por lo que estos métodos actualmente ya no se emplean [121].

Los **métodos químicos** se caracterizan por ser procesos relativamente sencillos y aplicables a gran escala, entre los más destacados están: el empleo de plantillas, el método poliol o la fotorreducción por radiación ultravioleta, entre otros procesos [121].

Entre los métodos descritos, el método poliol destaca por ser un método sencillo, de bajo coste y muy eficiente. Por estas razones, esta técnica constituye uno de los procesos más utilizados para la síntesis de AgNWs [121].

- **Método poliol**

Un poliol es un compuesto orgánico que presenta varios grupos hidroxilo, el poliol empleado por excelencia en la síntesis de AgNWs es el etilenglicol (EG). El método poliol consiste en llevar a cabo la reacción de reducción de una sal metálica mediante la aplicación de calor en presencia de un poliol [120].

En este proceso se utiliza un agente reductor, un solvente, un agente precursor y una sal. El EG presenta una función doble, por un lado, actúa como reductor y, por otro lado, actúa como disolvente. La polivinilpirrolidona (PVP) se utiliza como agente de recubrimiento para controlar el crecimiento anisótropo de los átomos de plata, y además, evita que se formen agregados de nanopartículas (NPs). Por último, el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) es el agente precursor encargado de proporcionar los iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) para la síntesis de AgNWs [121], [120].

En mayor detalle, el método poliol comienza con la reacción de reducción de una sal metálica ( $\text{CuCl}_2$ ) en presencia de glicolaldehído (GA), este compuesto es un agente reductor obtenido de la reacción de oxidación del EG cuando se alcanza una temperatura de reacción próxima a  $160^\circ\text{C}$  [121]. A continuación, se añaden simultáneamente la sal de  $\text{AgNO}_3$  y el PVP; durante este momento manteniendo la temperatura de reacción constante, la velocidad de agitación y la relación molar [PVP/  $\text{AgNO}_3$ ] añadida; se puede controlar un mecanismo de formación homogéneo de los AgNWs [121].

El proceso de síntesis de AgNWs se puede seguir a simple vista debido a los cambios de coloración que toma la disolución a medida que los AgNWs crecen, este fenómeno es debido a que las nanopartículas de plata (AgNPs) presentes en la solución absorben la radiación electromagnética de una longitud de onda cercana a 400 nm haciendo que ésta adquiere un color amarillento [132].

El proceso de crecimiento de los AgNWs comienza a partir del mecanismo de nucleación de los átomos de plata ( $\text{Ag}^0$ ) presentes en la solución, los cuales proceden de la reacción de reducción de los iones  $\text{Ag}^+$  en presencia de EG [113]. Los  $\text{Ag}^0$  comienzan a nuclearse dando lugar a AgNPs de distintos tamaños y morfologías. Durante este momento la actuación del PVP es vital, para evitar que se formen agregados de las mismas [113], [120], [133].

A medida que evoluciona la reacción con los parámetros de temperatura y velocidad de agitación fijados, como las AgNPs más pequeñas no son estables (necesitan una energía superficial mayor) comienzan a disolverse favoreciendo el crecimiento de las AgNPs más grandes siguiendo el proceso denominado “maduración de Ostwald” [113]. Posteriormente, gracias a la adsorción del PVP sobre la superficie de los cristales que forman las AgNPs, se promueve el crecimiento anisotrópico de los mismos de manera que se produce la evolución de las AgNPs más grandes a nanobarras o “nanorods” (son otras estructuras 1D distintas de los AgNWs). Finalmente, el crecimiento de las nanobarras da lugar a la formación de los AgNWs, durante esta etapa el PVP evita que los AgNWs se agreguen [113], [120].

El resultado final es una disolución que contiene los AgNWs y una dispersión de las AgNPs más grandes [97]. Para la obtención pura de los AgNWs, las NPs

se eliminan al finalizar el proceso de síntesis por medio de técnicas de centrifugación.

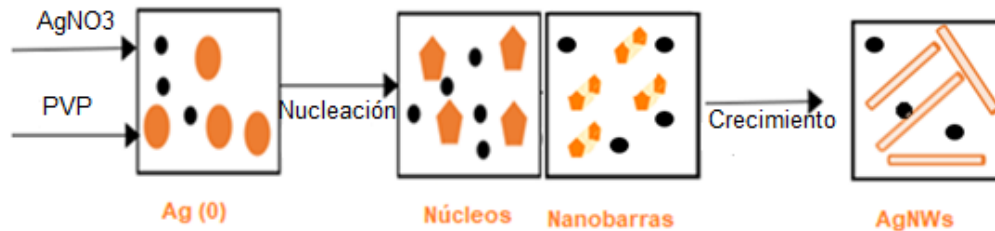


Figura 10 Proceso de crecimiento de los AgNWs.

En la **figura 10** se muestran las 4 etapas que se corresponden con el crecimiento de los cristales que forman los AgNWs. En primer lugar, la solución está formada por átomos de plata  $\text{Ag}^0$  procedentes de la reacción de reducción de los iones  $\text{Ag}^+$  en presencia de EG, posteriormente se forman cristales de geometría pentagonal (núcleos) que crecen en forma de nanobarras. Este fenómeno es debido a que las moléculas de PVP son adsorbidas y pasivan el plano del cristal [100] de las AgNPs, por lo que la fortaleza del enlace entre el PVP y el plano cristalográfico [100] prioriza el crecimiento del cristal a lo largo de la dirección [111] formando nanobarras de una sección pentagonal. Finalmente, tiene lugar el crecimiento de los AgNWs a lo largo de la dirección longitudinal [120], [134].

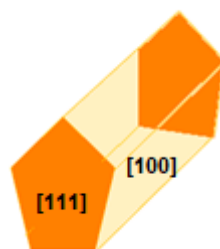


Figura 11 Representación de los planos cristalográficos [111] y [100] de una "nanobarra".

El método poliol puede presentar distintas variantes en función de las condiciones de síntesis empleadas, es decir, la utilización de distintas sales, las concentraciones que se empleen, la temperatura, la velocidad de agitación, etc. Dichas características, afectan significativamente al proceso de obtención

de los AgNWs [120], [121]; a continuación, se describen los parámetros más representativos que afectan a la formación y crecimiento de los AgNWs.

#### ➤ **Temperatura y tiempo de reacción**

El poder de reducción del etilenglicol aumenta con la temperatura, es decir, la reacción de oxidación del EG para dar lugar al GA se ve favorecida por las altas temperaturas [113], [120], [121]. Por esta razón, la temperatura del mecanismo de reacción de la síntesis de los AgNWs generalmente se lleva a cabo a 160°C durante 1h, así se consiguen obtener AgNWs de elevada longitud [120], [121]. Se ha comprobado que llevando a cabo el proceso de reacción a temperaturas inferiores (100 °C) la longitud de los AgNWs disminuye y no llegan a alcanzar el tamaño adecuado debido a que no se proporciona la energía suficiente para su crecimiento. Por consiguiente, sus propiedades se verían afectadas, como por ejemplo, se obtendría un menor área efectiva o disminuiría la capacidad conductora de los AgNWs, lo cual es indeseable [120]. Por otro lado, cuando se alcanzan temperaturas más elevadas (185°C) en la reacción de oxidación para dar lugar a GA, el producto de síntesis final del método polio serían nanobarras en lugar de los AgNWs [121].

El tiempo de obtención de los AgNWs también depende de la temperatura. Cuanto menor es la temperatura mayor es el tiempo requerido para que tenga lugar la formación de los AgNWs, ya que la reacción para dar lugar a GA no se ve favorecida a temperaturas bajas [120], [121]. Por esta razón, se ha comprobado que trabajando a una temperatura de 160 °C los AgNWs alcanzan su tamaño óptimo en 1h [121].

#### ➤ **Influencia de la Polivinilpirrolidona (PVP) y del nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>)**

La PVP es el polímero empleado por excelencia como agente de recubrimiento por sus buenos resultados [113], [120], [121]. Su efectividad se asocia a la presencia de determinados átomos en su cadena polimérica, el nitrógeno y oxígeno, que hacen que pueda ser adsorbido selectivamente sobre la superficie de las AgNPs, de esta manera ralentiza la tasa de crecimiento de las AgNPs y favorece la formación de AgNWs [120],[121]. El AgNO<sub>3</sub> es el agente que proporciona los iones Ag<sup>+</sup>, por lo que la concentración que se añada también determinará la forma de crecimiento de los AgNWs [121].



La concentración empleada de PVP es un factor vital que afecta directamente a la morfología de los AgNWs, además, no es un factor tratado de manera independiente puesto que generalmente va ligado con la concentración del  $\text{AgNO}_3$  empleada. Es decir, se busca un ratio molar  $[\text{PVP}/\text{AgNO}_3]$  que proporcione los AgNWs con las características deseadas [121]. Cuanto mayor sea la concentración de PVP (mayor ratio manteniendo la concentración de  $\text{AgNO}_3$  constante) se obtendrán AgNWs más largos y de menor diámetro [121]. Por otro lado, cuanto mayor sea la concentración del  $\text{AgNO}_3$  se formarán AgNWs más cortos y gruesos; lo cual es indeseable por la obtención de AgNWs de menor área efectiva [121].

El grado de polimerización del PVP también afecta significativamente a la formación de AgNWs. Largas cadenas del polímero proporcionan AgNWs con una relación Longitud/Diámetro mayor [120].

#### ➤ **Influencia de la Sal metálica empleada**

La adición de una sal metálica es importante ya que su presencia afecta en la morfología y al rendimiento de síntesis de los AgNWs. En este parámetro difieren la mayoría de los procesos de formación de AgNWs basados en el método poliol, puesto que las sales que se pueden emplear son varias como el  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KBr}$  y  $\text{CuCl}$ ,  $\text{CuCl}_2$  [121].

Las sales que proporcionan los iones cloruro presentan importancia en la morfología y formación de AgNWs. Su interés se debe a que son sustancias que se coordinan con los núcleos de plata, evitando que se formen agregados de Nps. Dicho suceso es importante ya que constituye el mecanismo primario para el crecimiento de las AgNPs [120].

#### ➤ **El método de adición de los reactivos**

El modo de adición de los reactivos es un factor importante ya que afecta a la formación de los AgNWs, generalmente se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes. La primera forma consiste en añadir los reactivos con una bomba peristáltica cuando se alcanza la temperatura de reacción deseada, de esta manera se controla el tamaño de los AgNWs mediante el ajuste de la velocidad de la bomba. La segunda forma consiste en mezclar todos los reactivos a temperatura ambiente sin esperar a que el sistema alcance la temperatura de reacción [120]. Este último método es el menos utilizado debido a que se

pueden formar agregados de los átomos de plata, lo cual es indeseable para la formación de los AgNWs [120].

#### ➤ **Agitación durante el proceso de reacción**

La velocidad de agitación durante el proceso de reacción es un factor importante ya que afecta a la morfología de los AgNWs. Para comprobar su efecto, se han llevado a cabo estudios donde se varía la velocidad de agitación para obtener un valor óptimo. Se ha comprobado que utilizando una velocidad de agitación demasiado alta (500-700 rpm) el producto final obtenido son nanobarras, lo cual es indeseable ya que no se obtienen AgNWs. Con velocidades de agitación inferiores, se obtienen AgNWs con una relación Longitud/Diámetro elevada [133].

### **2.5.2.2 Técnicas de caracterización de los AgNWs**

El proceso de síntesis de los AgNWs afecta significativamente a su forma y tamaño repercutiendo estos directamente en sus propiedades. Debido a la importancia que esto genera, son varias las técnicas empleadas para su caracterización, entre ellas destacan: la espectroscopía de rayos-X de energía dispersiva o “Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy” (EDX), difracción de rayos-X o “X-ray Diffraction” (DRX), microscopía electrónica de barrido o “Scanning Electron Microscopy” (SEM), microscopía electrónica de transmisión o “transmission electron microscope” (TEM), microscopía de fuerza atómica o “Atomic force spectroscopy” (AFM) y la espectroscopía de absorción ultravioleta visible o “UV-VIS absorption spectrometry” (UV-VIS) entre otras [135], [130].

En el presente trabajo de investigación, se ha llevado a cabo un estudio de las características morfológicas, dimensionales y ópticas de los AgNWs sintetizados. Con el empleo del AFM se obtuvo información de las características dimensionales de los AgNWs; por otro lado, se emplearon técnicas ópticas de espectroscopía UV-VIS para obtener información sobre el plasmón de resonancia de los AgNWs. Finalmente, se utilizó la DRX, para realizar un análisis estructural de los AgNWs.

En los apartados siguientes se lleva a cabo una descripción detallada de cada una de las técnicas empleadas.

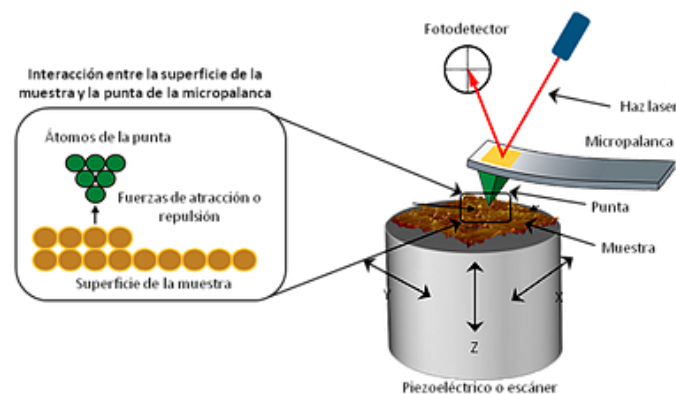
#### **2.5.2.2.1 Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

El microscopio de fuerza atómica es un instrumento donde se combina la mecánica y la óptica, está formado por una punta muy fina que guarda una estrecha distancia (nanométrica) con la superficie que va a recorrer. La punta se encuentra acoplada a un cantilever, un soporte de un material (generalmente) piezoeléctrico de una longitud del orden de micrómetros. Este instrumento funciona como un muelle que se flexiona en función de las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra [136], [137].

La imagen de la muestra se obtiene cuando la punta recorre su superficie de manera que se establecen fuerzas de interacción entre la punta y ésta [136]. Estas fuerzas provocan la flexión del cantilever que recorre la muestra realizando un escaneo en un sistema de coordenadas tridimensional (x, y, z); como se trata de un material piezoeléctrico presenta la capacidad de alargarse o acortarse en función del voltaje que reciba. El movimiento del cantilever es registrado por un haz láser rojo que incide sobre éste de manera que sus desviaciones son refractadas sobre el cantilever hacia un fotodetector y la información es interpretada por un software proporcionando una imagen de la muestra estudiada [136], [138].

La microscopía de fuerza atómica presenta la gran ventaja de ser capaz de obtener información de la muestra sin la necesidad de que intervengan métodos eléctricos esto hace que se puedan utilizar una gran variedad de muestras, tanto conductoras como no conductoras. Por ello, la naturaleza de la muestra es diversa pudiendo ser un sólido, polvo, muestras biológicas e incluso se pueden emplear líquidos [138]. Además, no requiere trabajar a vacío como otras técnicas de análisis instrumental y el tratamiento previo de la muestra es mínimo o ninguno lo que hace que el AFM sea un instrumento muy empleado en el análisis de nanomateriales [138].

A continuación, en la **figura 12** se muestra una imagen simplificada del funcionamiento del AFM [138]:



*Figura 12* Esquema de funcionamiento de un Microscopio de fuerza atómica.

El modo de operar del AFM se basa en los siguientes modos de contacto entre el cantilever y la muestra:

- **Método de contacto**

La microscopía de fuerza atómica por contacto directo es el mecanismo de funcionamiento más simple del microscopio. En este método la punta se encuentra en contacto constante (muy suave) con la superficie de la muestra, de manera que las fuerzas que se dan por la interacción entre la punta y la muestra son suficientes para alargar o comprimir el cantilever. En este punto, pueden actuar tres tipos de fuerzas, las fuerzas de Van der Waals, son las resultantes de la interacción entre la punta y la muestra. Las fuerzas de capilaridad (en el medio todos los materiales presentan una ligera película de agua) y por último, las fuerza ejercida por el propio movimiento del cantilever sobre la muestra [136] ,[139].

A pesar de que se trata de un método sencillo presenta varias desventajas, como el ruido debido al contacto, interferencias en los resultados por la aparición de fuerzas no deseadas y el desgaste o posible destrucción de la punta. [136]

- **Contacto intermitente (“tapping mode”)**

La principal diferencia con respecto al anterior modo de funcionamiento es que en este método, en lugar de arrastrar la punta se ejerce un contacto intermitente que se puede controlar con tres parámetros típicos de la oscilación de una onda: frecuencia, amplitud y fase de la onda [136]. El cantilever se hace oscilar a una frecuencia fija y la amplitud se mantiene variable siendo el orden de variación de decenas de nm. Cuando la punta se acerca a la superficie se ejercen fuerzas de interacción entre ambas cambiando los parámetros de oscilación del cantilever [136]. La amplitud (relativamente amplia) que se le da al sensor permite llevar a cabo este mecanismo de contacto intermitente, por este motivo recibe el nombre de AM-AFM (modulación de amplitud) [136].

Con este método se reducen los efectos de fricción en la punta, se obtienen medidas muy estables y además permite obtener imágenes de alta resolución con una exactitud nanométrica [136]. Por estas razones, este modo de operar constituye el método más utilizado y sobre el que se han implantado

importantes innovaciones tecnológicas. En este contexto, se ha incorporado al microscopio un segundo láser denominado “blue drive” cuya actuación se complementa con el láser rojo inicial. En este caso, el movimiento del soporte en el que se encuentra el cantilever no se debe a fenómenos piezoeléctricos, sino que se produce por un calentamiento del cantilever, a este fenómeno se le denomina excitación fototérmica. El calentamiento provoca el movimiento mecánico del cantilever, cuya frecuencia y amplitud de oscilación pueden ser regulados con la potencia del láser [140].

El blue drive, proporciona imágenes mucho más rápidas, precisas, estables y de mayor resolución de todo tipos de muestras tanto en medios sólidos como en líquidos; estas extraordinarias características le convierten en un instrumento predilecto en el campo de la nanotecnología [140].

En el presente trabajo de investigación se contó con un AFM de estas características, gracias al cual, se pudo llevar a cabo un estudio de la morfología de los AgNWs.

- **Método de no contacto**

En el método de no contacto la punta no se arrastra sobre la muestra, en cambio se hace vibrar al cantilever en su frecuencia de resonancia fijándole una amplitud entre  $1\text{\AA}$  hasta nanómetros respecto de la muestra, por ello también se denomina FM-AFM (modulación de frecuencia) [136]. La distancia nanométrica que mantiene separados la punta y la muestra es suficiente como para que se establezcan fuerzas de repulsión [136].

Otra de las ventajas que presenta la microscopía de fuerza atómica en el análisis de materiales es que, además de obtener imágenes, proporciona información acerca de las características de fuerza de la muestra. Las medidas de fuerza se obtienen cuando la punta con la que se rastrea la muestra se mantiene fija (método de contacto), de manera que se puede extraer información útil de las propiedades mecánicas del material [141].

La información se consigue mediante la representación gráfica, de la fuerza en función de la distancia a la muestra, donde se tienen en cuenta: las fuerzas de repulsión, las cuales son debidas a una distancia muy próxima ente la punta y la muestra; y las fuerzas de atracción, que tiene lugar cuando la punta se aleja de la muestra [141]. El resultado final es una gráfica en forma de curva a partir de la cual se obtiene información de la dureza de un material [141].

### 2.5.2.2.2 Técnicas espectroscópicas: UV-VIS y DRX

La espectroscopía es una técnica de análisis instrumental que mide la interacción de la materia con la radiación electromagnética [142].

La radiación electromagnética se puede explicar mediante dos teorías: la teoría ondulatoria que establece que la luz se transmite describiendo ondas en el espacio y la teoría corpuscular, la cual explica que la luz está formada por fotones. La energía de la radiación viene dada por la ecuación de Planck [143]:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c \cdot 1/\lambda \quad (5)$$

*Ecuación 5 Ley de Planck*

Donde los parámetros de la ecuación son:

- $h$  es la constante de Planck ( $\text{kg m}^2/\text{s}$ )
- $\nu$  es la frecuencia ( $\text{m}^{-1}$ )
- $\lambda$  es longitud de onda (m)
- $c$  es la velocidad de la luz ( $\text{m/s}$ )

La radiación comprende un espectro de diferentes longitudes de onda desde frecuencias altas (ondas de radio) hasta frecuencias muy bajas (rayos gamma). Cuando esta energía incide sobre la materia, la radiación sufre diferentes procesos: absorción, transmisión, reflexión, refracción y dispersión [144].

Existen diferentes técnicas en función de los procesos que sufre la luz como son: la espectroscopía de absorción (radiación absorbida por la muestra), la espectroscopía de emisión (radiación que emite una muestra al ser excitada) o los métodos de fluorescencia (radiación que emite la muestra cuando ha sido excitada por radiación electromagnética) [145].

La espectroscopía de absorción se basa en las leyes de la transmitancia y absorbancia. La transmitancia (T) es un parámetro físico que indica la parte de la energía que ha sido transmitida y que es detectada por el detector una vez

la radiación haya atravesado la disolución. La absorbancia (A) indica la cantidad de luz absorbida por la muestra [146].

La transmitancia de una sustancia se obtiene a partir de la Ley de la transmitancia expresada como [146]:

$$T = I_T / I_0 \quad (6)$$

*Ecuación 6 Ley de la Transmitancia*

Donde los parámetros de la ecuación son:

- $I_T$ : es la cantidad de energía transmitida al receptor una vez ha atravesado la muestra.
- $I_0$ : es la cantidad de energía que incide sobre la muestra.

La absorbancia (A) de una sustancia se calcula a través de la transmitancia mediante la siguiente expresión [146]:

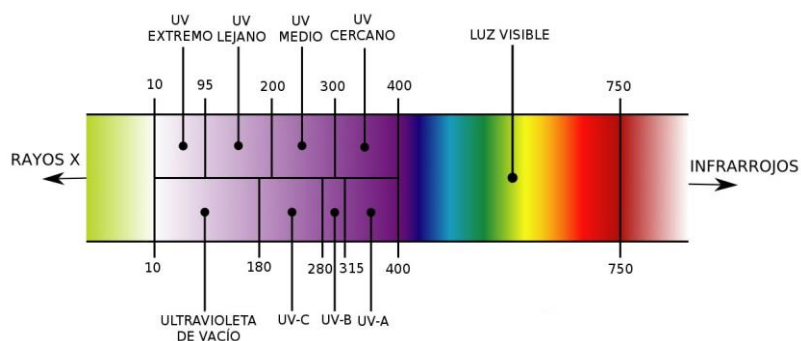
$$A = \log \left( \frac{1}{T} \right) \quad (7)$$

*Ecuación 7 Cálculo de la absorbancia*

### **-Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-VIS)**

La espectroscopía de absorción UV-VIS es una de las técnicas de análisis más empleadas debido a que sus mediciones espectroscópicas son muy sensibles y no destructivas, además requiere de pequeñas cantidades de muestra para llevar a cabo un análisis químico [142].

La espectroscopía de absorción UV-VIS se basa en la absorción de la radiación ultravioleta visible cuando un haz de luz atraviesa la solución en la que se encuentra el analito. La región espectral de la radiación ultravioleta visible comprende una pequeña región de todo el espectro electromagnético, donde la luz visible alcanza las longitudes de onda entre 400 nm y 780 nm y el ultravioleta la región entre 195 nm - 400 nm [143], [144].



*Figura 13* Espectro electromagnético correspondiente a las longitudes de onda de la región UV-VIS.

La región visible es aquella parte de la radiación electromagnética que puede ser percibida por el ojo humano y gracias a ella, se puede apreciar el color que presenta una disolución [146], [147].

La región ultravioleta es una región de energía muy alta y se corresponde con una parte del espectro muy importante en el estudio y cuantificación de compuestos orgánicos. Debido a que los compuestos químicos con enlaces dobles, triples, enlaces peptídicos, compuestos aromáticos y heteroátomos (átomos que no son ni carbono ni hidrógeno) presentan sus máximos de absorbancia en dicha región [147].

El espectro de la región ultravioleta comprende las siguientes regiones: ultravioleta cercano o UV-A (es la región más próxima a la región del espectro visible, su energía de radiación fluctúa entre 315 nm y 400 nm), UV lejano o UV-B (presenta un rango de radiación entre 280 nm y 315 nm), UV extremo o UV-C (presenta un rango de radiación entre 100 nm y 280 nm) y finalmente el UV de vacío ( es la región del espectro UV que presenta un intervalo de longitud de onda menor, comprendido entre 200 nm y 10 nm) [148].

El método de absorción UV-VIS se basa en la incidencia de la radiación electromagnética con una determinada longitud de onda sobre la muestra, parte de la energía es absorbida lo que provoca transiciones electrónicas entre diferentes niveles energéticos. Debido a ello, el átomo que absorbe la radiación pasa de su estado fundamental a un estado excitado de mayor energía y transcurrido un tiempo retorna a su estado energético basal (estado de menor energía) emitiendo radiación [144].

En la **figura 14** se muestran las transiciones electrónicas que tienen lugar en la región del espectro UV-VIS. Estas transiciones se producen desde la banda de valencia, donde se encuentran los electrones, hasta una nivel de energía superior [149].



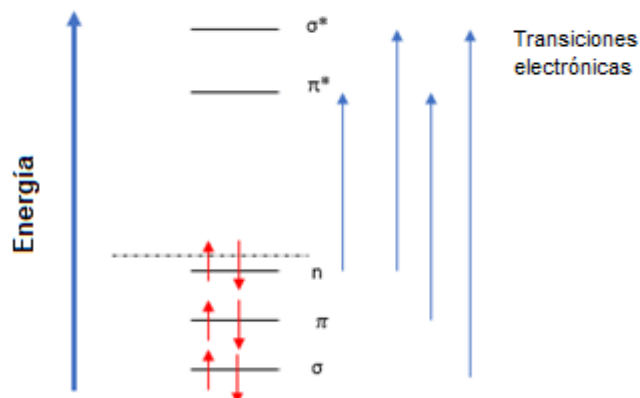


Figura 14 Orbital molecular de la banda de valencia y transiciones electrónicas.

Las transiciones electrónicas que pueden tener lugar son:

- $\sigma \rightarrow \sigma^*$ : la transición del orbital sigma al orbital sigma antienlazante la presentan la gran mayoría de compuestos orgánicos e implica una gran cantidad de energía e intensidad. Estas transiciones se producen en la región del UV de vacío y la región del UV lejano [149].
- $n \rightarrow \sigma^*$ : la transición electrónica del orbital molecular n al orbital  $\sigma^*$  se da en compuestos que tienen heteroátomos (los más comunes son O, N, S y halógenos) a una longitud de onda de 200 nm. Los compuestos con azufre y yodo dan máximos de absorción en la región UV-cercano [149].
- $\pi \rightarrow \pi^*$ : estos orbitales moleculares se encuentran en moléculas que presentan enlaces múltiples como alquenos, alquinos o compuestos aromáticos. La transición electrónica del orbital  $\pi$  al orbital  $\pi^*$  se puede apreciar en la región del UV-lejano. También, hay compuestos que pueden dar bandas de absorción en el UV-cercano si el compuesto orgánico presenta una insaturación conjugada (compuestos como el fenol o furano) [149].
- $n \rightarrow \pi^*$ : las transiciones electrónicas del orbital n al orbital  $\pi^*$  tienen lugar en compuestos insaturados con heteroátomos y se producen en sustancias que dan bandas de absorción en la región del UV cercano [149].

Cuando se lleva a cabo el análisis de la muestra por espectroscopía de absorción UV-VIS hay que tener en cuenta el tipo de celda en la que se introduce la muestra. Generalmente se utilizan cubetas de base cuadrada siendo dos de sus paredes transparentes a la radiación en el rango de longitudes de onda en el que se trabaje (ya que la luz atravesará estas paredes), por ello el material empleado en espectroscopía UV suele ser el cuarzo [150].

La espectroscopía de absorción UV-VIS generalmente se lleva a cabo con la especie química disuelta en un disolvente. Calculando la cantidad de energía absorbida o transmitida por la muestra se puede obtener la concentración de analito presente en la solución a través de la ley de Lambert-Beer (**ecuación 8**). Dicha ley relaciona la cantidad de energía que ha sido absorbida con la concentración de analito que hay en la muestra [146].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (8)$$

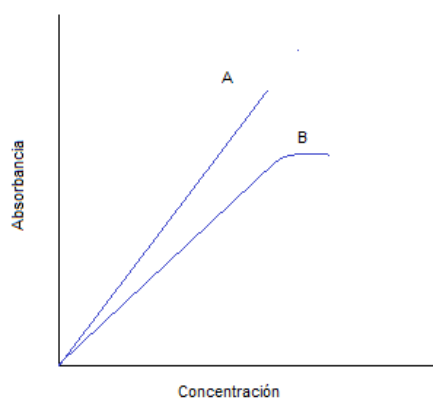
*Ecuación 8 Ecuación de la ley de Lambert-Beer.*

Donde los parámetros de la ecuación son : [145]

- A es la absorbancia y es un parámetro adimensional.
- $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar o absortividad. Es característico de cada sustancia y se corresponde con la cantidad de energía que absorbe una sustancia a una longitud de onda determinada por unidad de concentración. ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
- c es la concentración molar del analito en la muestra. (M)
- l es el camino óptico, anchura de la célula que contiene a la disolución. (cm)

A través de la ecuación de la ley de Lambert-Beer se deduce que la absorbancia depende del número de moléculas que hay en la muestra, por lo que cuanto mayor es su concentración mayor es la interacción de la luz con éstas. Del camino óptico, cuanto mayor es la distancia que recorre la luz a través de la muestra mayor es la interacción con ésta. De la naturaleza química de la muestra y finalmente, también depende de la intensidad y de la longitud de onda de la radiación electromagnética que incida sobre la muestra [143], [146].

La ley de Lambert-Beer se cumple únicamente para disoluciones diluidas; a concentraciones elevadas, la disolución deja de comportarse de manera ideal. Esto supone que el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) varíe con la concentración debido a fenómenos asociados con la dispersión de la luz, agregaciones de sustancia, etc. En consecuencia, la relación entre la absorbancia y la concentración deja de tener un comportamiento lineal, tal y como se muestra en la **figura 15** [146], [151].



*Figura 15 A Recta de la ecuación de la Ley de Lambert-Beer y B representación de las desviaciones de la ley de Lambert- Bee.*

La espectroscopía UV-VIS ha sido muy utilizada en el análisis cualitativo y cuantitativo por su sencillez y utilidad. En el análisis cualitativo, se usa para la determinación y caracterización de biomoléculas ya que la longitud de onda a la que una sustancia puede absorber es una propiedad característica de cada grupo funcional. En el análisis cuantitativo, se usa en la cuantificación de compuestos orgánicos e inorgánicos ya que proporciona una alta sensibilidad y buena precisión [152].

En el campo de la nanotecnología dicha técnica constituye una herramienta muy valiosa para identificar, caracterizar y estudiar nanomateriales, debido a que las nanopartículas o nanohilos de ciertos metales presentan propiedades ópticas sensibles a su tamaño y forma [153]. Cuando un haz de luz incide sobre ellos interactúan con la radiación emitiendo a una determinada longitud de onda dando lugar a fenómenos ópticos de interés [153]. Por ejemplo, las resonancias de plasmón superficial son fenómenos dependientes de la geometría de los nanomateriales y se producen en respuesta a una excitación electromagnética que incide sobre ellos [154].

Los AgNWs presentan un plasmón de resonancia muy intenso en la región UV-VIS y debido a la repercusión que tienen sus características morfológicas en sus propiedades, se han realizado estudios donde se ha comprobado que en

función de la morfología de los AgNWs el plasmón de resonancia varía [154]. Se ha demostrado, que en AgNWs con una sección pentagonal se obtiene un plasmón de resonancia formado por dos bandas de absorción bien diferenciadas en longitudes de onda próximas a 361 nm (más intenso) y 345 nm (menos intenso). En cambio, en AgNWs con una sección circular el espectro tiene una sola banda de absorción. Finalmente, en el análisis del espectro de los AgNWs con una sección triangular se obtienen 3 bandas de absorción [154]. Por consiguiente, el plasmón de resonancia obtenido a partir de espectroscopía UV-VIS resulta de gran interés en el estudio de ciertos nanomateriales, como los AgNWs, ya que se puede relacionar con las características morfológicas de los mismos.

### -Difracción de rayos-X (DRX)

La difracción de rayos-X es una de las técnicas de análisis instrumental más empleadas para la caracterización de materiales, pues aporta información sobre sus características estructurales (estructura, orientación de los cristales, grado de cristalinidad, defectos en la estructura cristalina, etc.) y de su composición química. Su mayor importancia en la nanotecnología radica en que permite caracterizar, de manera no destructiva, los nanomateriales a través de un estudio de la cristalinidad de su estructura [155], [156].

La técnica DRX consiste en la emisión de una radiación electromagnética filtrada, de esta manera se consigue un haz de luz monocromático, dirigido hacia la muestra. Los picos del espectro obtenidos son consecuencia de la interacción producida entre los rayos-X que inciden y la muestra, lo que da lugar a la refracción de un haz de luz que únicamente tiene lugar cuando se cumple la ley de Bragg [155], [156].

La ley de Bragg (**ecuación 9**) relaciona la longitud de onda de los rayos-X con el ángulo del haz refractado y el espacio interplanar de la muestra [155].

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen}(\theta) \quad (9)$$

*Ecuación 9 Ley de Bragg*

Donde los parámetros de la ecuación son [155]:

- $n$  es un número entero
- $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos-X que inciden sobre la muestra
- $d$  es el espacio comprendido entre las filas de átomos
- $\theta$  es el ángulo que los rayos-X forman con el plano de las filas de átomos

El espectro de difracción que se obtiene es característico de cada compuesto, lo que permite el análisis cualitativo de sustancias químicas. En este proceso se compara el patrón obtenido del espectro con patrones conocidos, de esta manera se puede lograr la determinación estructural de muestras cuya composición es desconocida [155]. Por esta razón, la técnica DRX es de gran utilidad en el campo de la nanotecnología ya que puede ser empleada para caracterizar la estructura de nanomateriales mediante su excitación por rayos-X.

Los AgNWs presentan un patrón de difracción de rayos-X muy característico que es utilizado para estudiar su estructura y cristalinidad, ya que a través de él se obtiene información de la orientación cristalográfica de los cristales que componen dichos nanomateriales. Generalmente, los AgNWs presentan espectros de difracción en los planos cristalográficos [111], [200], [220], [311] y [222], donde la intensidad de cada uno de ellos dependerá de la orientación de los cristales que los compongan [157].

## 2.6 Técnicas electroquímicas

La electroquímica es la rama de la química y la física que estudia la relación entre las características eléctricas y los cambios químicos que se producen en una solución. Esta técnica es empleada en una gran variedad de campos, dentro de los cuales destacan el diagnóstico clínico, el análisis ambiental y el control de calidad en la industria alimentaria [158]. Actualmente y por su implicación en el presente trabajo, cabe destacar la vinculación que se ha establecido entre el campo de la electroquímica y la nanotecnología, esta combinación ha contribuido al desarrollo de nuevos sensores electroquímicos como son los MIPs con propiedades conductoras [159].

Un proceso electroquímico implica un intercambio de electrones, entre el electrodo y la especie que se encuentra en la solución, consecuencia de los procesos de oxidación-reducción que tienen lugar en una celda electroquímica

(en una reacción de oxidación la especie pierde electrones, mientras que en un proceso de reducción gana electrones).

La celda electroquímica se puede clasificar en dos tipos de celda en función de cómo tengan lugar los procesos de oxidación-reducción. Si se produce una reacción química espontánea que genera un flujo de corriente eléctrica se denomina **celda galvánica**. Por el contrario, si se emplea una fuente externa (por ejemplo, un potenciostato) que proporciona electricidad para provocar la reacción de oxidación-reducción de una especie se denomina **celda electrolítica**. En ambas celdas, la oxidación tiene lugar en el ánodo y la reducción tiene lugar en el cátodo, por lo que la reacción de oxidación-reducción da lugar a una diferencia de potencial entre el sistema de electrodos que puede ser medida obteniéndose así información útil sobre los procesos electroquímicos [100], [160].

La ecuación de Nernst (**ecuación 10**) es la ecuación por excelencia para estudiar los procesos de oxidación-reducción que tienen lugar en una celda electroquímica. Relaciona el potencial (también llamado fuerza electromotriz) producido en la celda con el potencial normal tabulado y la actividad de las especies químicas en la solución [100]:

$$E = E^0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln k \quad (10)$$

*Ecuación 10 Ecuación de Nerst*

Donde los términos de la ecuación son [100]:

- E: es el potencial que tiene lugar en la celda electroquímica y es el resultado de la suma de los potenciales entre el cátodo por la reacción de reducción y el ánodo por la reacción de oxidación de las especies químicas que participan en la actividad redox.

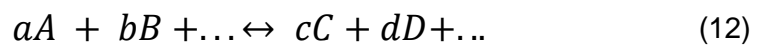
$$E = E_{\text{cátodo}} + E_{\text{ánodo}} \quad (11)$$

*Ecuación 11 Ecuación del potencial resultante de una celda electroquímica*

- $E^0$ : potencial estándar de una reacción química.
- R: constante universal de los gases ideales (8,31 J/mol ° K)

- T: temperatura (°K)
- n: moles de electrones que se transfieren en el proceso de oxidación-reducción.
- F: constante de Faraday (96500 C/mol de electrones)
- K: constante de equilibrio termodinámica. Se define como el cociente de los productos de las sustancias que participan en la actividad de oxidación-reducción, elevados a sus coeficientes estequiométricos.

Para una reacción química genérica:



*Ecuación 12* Reacción química general de un proceso de oxidación-reducción

La constante K se calcula como:

$$K = \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \quad (13)$$

*Ecuación 13* Ecuación de la constante de equilibrio termodinámica

Donde los parámetros de la reacción: [A], [B], [C] y [D] son las concentraciones molares de los reactivos y productos que intervienen en el proceso de oxidación-reducción. Los parámetros a y b son los coeficientes estequiométricos de los reactivos [A] y [B] respectivamente; c y d, son los coeficientes estequiométricos de los productos [C] y [D] respectivamente.

El potencial de la celda se puede relacionar con la energía libre de Gibbs mediante la siguiente expresión [100]:

$$\Delta G = -W = -n \cdot F \cdot E \quad (14)$$

*Ecuación 14* Ecuación de la energía libre de Gibbs

La energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) indica la espontaneidad del proceso de oxidación-reducción y se define como la máxima cantidad de trabajo (W) que puede extraerse de un sistema. Un proceso electroquímico será reversible si  $\Delta G < 0$ , por el contrario un proceso electroquímico será irreversible si  $\Delta G > 0$  [100].

Además, la constante K se relaciona con el cambio de la energía libre de Gibbs mediante la expresión de la **ecuación 15**:

$$\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln K \quad (15)$$

*Ecuación 15 Ecuación de la energía libre de Gibbs relacionada con la constante de equilibrio termodinámica*

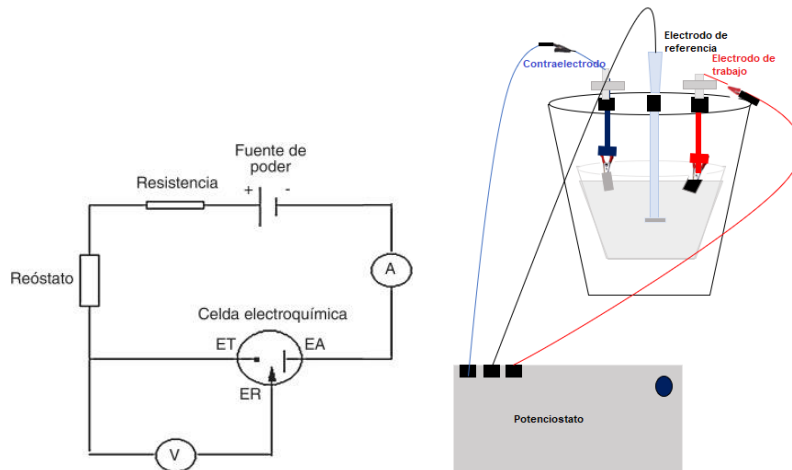
Donde  $\Delta G^0$  se corresponde con el incremento de la energía libre de Gibbs medida en condiciones normales.

Las reacciones de oxidación-reducción que se producen como consecuencia de aplicar un potencial eléctrico o una corriente, a través de un potencióstato, en una celda electrolítica tienen lugar entre un sistema de electrodos que puede presentar diferentes configuraciones.

Las celdas electrolíticas que presentan un sistema de dos electrodos (electrodo de referencia y electrodo de trabajo), pueden medir la diferencia de potencial existente entre ambos. Sin embargo, las celdas electrolíticas más empleadas utilizan una configuración de tres electrodos (electrodo de referencia, electrodo de trabajo y electrodo auxiliar) ya que por medio de esta configuración se puede controlar la pérdida de carga que sufre el sistema. El dispositivo que mide la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia presenta una elevada impedancia, por lo que la corriente que circula entre ellos es muy baja [161], [162].

Los electrodos se encuentran sumergidos en la solución de la celda electrolítica, para que tenga lugar una circulación de corriente eléctrica desde el electrodo de trabajo al electrodo auxiliar deben estar conectados por un hilo conductor (por ejemplo, un metal) a un potencióstato (**figura 16**) [162].





**Figura 16** Esquema de una celda electrolítica conectada a un potenciostato que presenta un sistema de tres electrodos: electrodo auxiliar, electrodo de referencia y electrodo de trabajo

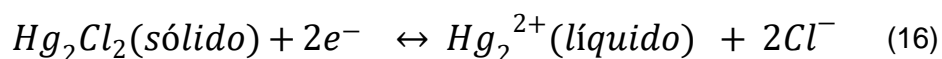
En la **figura 16** se puede distinguir el electrodo de trabajo, un contraelectrodo y el electrodo de referencia, cuyas funciones son:

- **Electro de trabajo.** Electrodo donde se impone un potencial fijo o variable que sirve para caracterizar las reacciones electroquímicas. Si se impone un potencial positivo tendrá lugar una reacción de oxidación sobre el electrodo de trabajo; si se impone un potencial negativo tendrá lugar una reacción de reducción sobre éste [163].
- **Electrodo auxiliar o contraelectrodo.** Con este electrodo se cierra el circuito ya que permite circular la corriente eléctrica a su través (de esta manera la corriente no pasa por el electrodo de referencia). Este electrodo puede ser de varios materiales (ej, oro, carbono, etc.), pero el más común es una placa de platino ya que es un material resistente a la corrosión y no afecta negativamente a los procesos que tienen lugar en el electrodo de trabajo [164].
- **Electrodo de referencia.** Este electrodo debe tener un potencial constante y conocido ya que se utiliza como potencial de referencia, para obtener los valores de los potenciales individuales. Por esta razón, el material empleado en su construcción debe tener un potencial estable ante las condiciones de análisis.

A lo largo de los años, se han empleado una gran variedad de electrodos de referencia siendo el electrodo de referencia universal el electrodo de hidrógeno. Sin embargo, éste no se utiliza por su difícil preparación y la

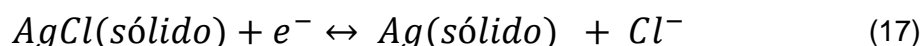
necesidad de introducir hidrógeno [164], [165]. En su lugar, actualmente se utiliza el electrodo de calomelanos saturado (SCE) y el electrodo de plata (Ag)/ cloruro de plata (AgCl).

El electrodo SCE consiste en un tubo lleno de mercurio (Hg) en cuyo interior hay un alambre de platino conectado a la salida del mismo y una solución saturada de cloruro de mercurio (I) o calomelano. Esta solución está en contacto con una solución de cloruro de potasio (KCl) que se encuentra en el tubo exterior, el final de este tubo presenta una membrana porosa que permite el paso de iones a su través cerrando el circuito eléctrico [166]. La reacción química que tiene lugar en este electrodo es [166]:



*Ecuación 16 Reacción de oxidación-reducción en un electrodo SCE*

El electrodo Ag/ AgCl es el más utilizado debido a su eficacia y facilidad de síntesis. Consta de un alambre de plata en contacto con una disolución electrolítica de KCl que está saturada con AgCl, el final del electrodo acaba con un diafragma de un material poroso que permite el paso de iones a través de él [164], [165]. La reacción química que tiene lugar se muestra a continuación [167]:



*Ecuación 17 Reacción de oxidación-reducción en un electrodo Ag/AgCl*

Fundamentadas en los procesos electroquímicos, surgen las técnicas electroanalíticas; un conjunto de técnicas utilizadas para el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de un analito a través de la medición de sus características, eléctricas y electroquímicas, como la corriente y el potencial [158]. Estas técnicas destacan por su sensibilidad, precisión y selectividad [100].

Las técnicas electroanalíticas se clasifican en función de la respuesta eléctrica que se genera al aplicar una perturbación eléctrica al sistema. La perturbación puede ser por la imposición de un potencial o una corriente eléctrica, en función de ello la información obtenida será diferente [100], [168].

Entre las técnicas electroanalíticas más empleadas se encuentran: la **potenciometría** (obtiene información del sistema mediante la medida del potencial de la celda electroquímica, relacionando la actividad electroquímica con el potencial mediante la aplicación de la ecuación de Nernst) [169], **conductimetría** (se basa en medir la conductividad de la disolución que es función de la concentración iónica, por lo que la producción de corriente eléctrica depende de la circulación de iones) [169], **electrogravimetría** (se basa en el cálculo de la cantidad de analito que se ha transformado en producto como consecuencia de una reacción química) [169], **culombimetría** (se basa en determinar la cantidad de corriente que es necesaria aplicar a la celda para que todo el analito se transforme en producto) [169], **voltametría** (se basa en relacionar el potencial aplicado en el electrodo de trabajo con la corriente eléctrica generada mediante un voltamograma) [169]:

En el siguiente apartado se describen en profundidad las técnicas empleadas en el desarrollo de este trabajo.

### 2.6.1 Métodos voltamétricos o voltamperométricos

La voltametría se basa en la obtención de información del analito por medio de la medida de la intensidad de corriente que fluye a través de la celda electrolítica al aplicar un potencial eléctrico (sobre el electrodo de trabajo) que varía con el tiempo. El potencial eléctrico aplicado debe ser el suficiente para que tengan lugar los procesos de oxidación-reducción del compuesto químico estudiado [170].

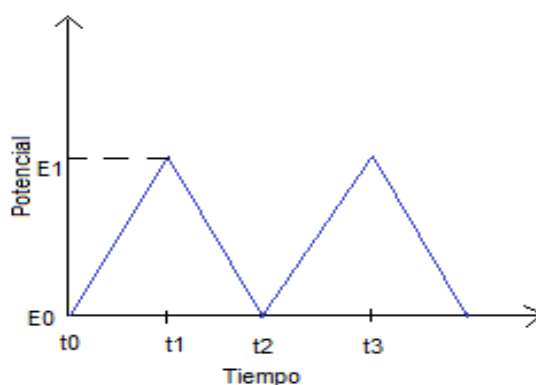
Existen una gran variedad de técnicas de voltametría en función del tipo de señal aplicada sobre el electrodo de trabajo. El **barrido lineal** consiste en llevar a cabo un barrido de potencial de corriente continua esta señal aumenta linealmente con el tiempo. Las **señales de excitación de impulsos** consisten en aplicar impulsos de manera que se mide la intensidad de corriente en los diferentes lapsos de tiempo en que dure el impulso. La **onda de forma triangular** consiste en aplicar una diferencia de potencial sobre el electrodo de trabajo. En primer lugar, el potencial aumenta linealmente con el tiempo hasta que se alcanza un punto máximo en este momento el valor del potencial disminuye con la misma pendiente hasta alcanzar un mínimo (la amplitud de la onda no se mantiene constante, sino que forma un ángulo). Finalmente, la señal de excitación **de onda cuadrada**, consiste en aplicar un impulso al comenzar un escalón y durante la mitad de tiempo de su duración, la amplitud de cada escalón se mantiene constante [170].

A continuación, se explica la voltametría cíclica ya que es el método utilizado en el presente trabajo de investigación.

### 2.6.1.1 Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más utilizadas ya que permite llevar a cabo un análisis de las muestras en un amplio rango de potenciales en el que el analito debe ser electroactivo [171]. Dicha técnica proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa sobre las reacciones electroquímicas, actividad catalítica de las especies químicas, reversibilidad del proceso, etc [172].

La voltametría cíclica se lleva a cabo en una celda electrolítica, generalmente, con una configuración de tres electrodos. Durante el análisis, se mide el potencial del electrodo de trabajo respecto del potencial del electrodo de referencia que se mantiene constante [173], [174]. El proceso de medida del potencial comienza aplicando una diferencia de potencial a un electrodo de trabajo. Primero, se aplica un potencial inicial ( $E_0$ ) que aumenta de forma lineal hasta alcanzar un valor de potencial ( $E_1$ ), en este potencial se produce una inversión del sentido de barrido completando así el ciclo [173], [174]. La señal de excitación adquiere una forma triangular tal y como se observa en la **figura 17**.

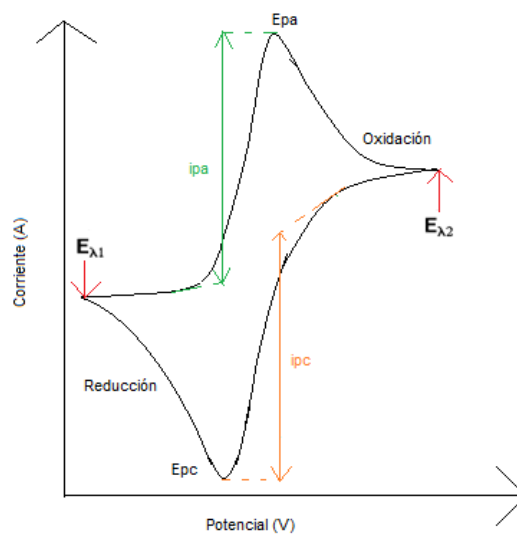


*Figura 17 Voltametría Cíclica. Señal de excitación triangular.*

Al mismo tiempo que se aplica el potencial, se produce la circulación de la corriente eléctrica del electrodo de trabajo al electrodo auxiliar. La variación de

la intensidad de corriente con el potencial se puede estudiar a través de la representación de un voltamograma [174].

El voltamograma (**figura 18**) se obtiene de aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo en dos direcciones. Generalmente se comienza en el sentido anódico, es decir, aplicando un potencial ( $E_{\lambda 1}$ ) se produce la reacción de oxidación del analito. En consecuencia, la corriente generada ( $i_{pa}$ ) aumenta hasta alcanzar un punto máximo ( $E_{pa}$ ), a partir del cual la intensidad disminuye debido al consumo del analito en la superficie del electrodo. El barrido de potencial en sentido inverso se basa en el mismo fundamento, pero en este caso se produce la reacción de reducción del analito [175].



*Figura 18 Voltamograma cíclico. Intensidad frente a potencial del analito de interés*

En la **figura 18**,  $i_{pc}$  es la intensidad de corriente catódica,  $E_{\lambda 2}$  es el valor de potencial de corte anódico donde el sentido del barrido de potencial se invierte y  $E_{pc}$  es el corte de pico catódico a partir del cual la intensidad disminuye.

Los parámetros de un voltamperograma dan información acerca del grado de reversibilidad del proceso de la reacción de oxidación-reducción. Para que tenga lugar un **proceso reversible** las concentraciones de las especies en el seno de la disolución se tienen que mantener constantes [173].

En voltametría afectan en gran medida los procesos de difusión y de transferencia electrónica de las especies electroactivas de la solución hasta la superficie del electrodo. En un proceso reversible se considera que la etapa predominante del proceso electroquímico (proceso más lento) es la difusión del analito hasta la superficie del electrodo [100].

En el caso de un proceso reversible, el potencial de pico anódico y catódico dependen de igual forma del potencial formal y se calculan con la **ecuación 19** y **18** respectivamente [176].

$$E_{pc} = E^0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \left( \frac{D_R}{D_O} \right)^{1/2} - 1,109 \cdot \left( \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \right) \quad (18)$$

*Ecuación 18* Cálculo del potencial de pico catódico para un proceso reversible.

$$E_{pa} = E^0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \left( \frac{D_R}{D_O} \right)^{1/2} - 1,109 \cdot \left( \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \right) \quad (19)$$

*Ecuación 19* Cálculo del potencial de pico anódico para un proceso reversible.

Donde los parámetros de ambas ecuaciones son:

- $E^0$  es el potencial formal (V).
- $E_{pc}$  es el potencial de pico catódico (V).
- $E_{pa}$  es el potencial de pico anódico (V).
- $R, T, n, F$  son parámetros que se han descrito en la ecuación de Nerst.
- $D_R$  y  $D_O$  son los coeficientes de difusión correspondientes a la especie reducida y a la especie oxidada respectivamente (cm<sup>2</sup>/s).

En un proceso reversible el potencial formal se calcula a partir de los potenciales de pico anódico y catódico con la **ecuación 20** [177]:

$$E^0 = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad (20)$$

*Ecuación 20* Cálculo del potencial de media onda para un proceso reversible

La corriente de pico se calcula a partir de la ecuación de *Randles-Sevcik*. Esta ecuación relaciona la corriente de pico con la concentración del analito y la velocidad de barrido. A 25°C la corriente de pico se calcula con la **ecuación 21** [173].

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C^* \cdot v^{1/2} \quad (21)$$

*Ecuación 21 Ley de Randles Sevcik para un proceso reversible*

Donde los parámetros de la ecuación son:

- $i_p$  es la corriente de pico (A)
- $n$  es el número de electrones intercambiados
- $A$  es el área del electrodo (cm<sup>2</sup>)
- $D$  es el coeficiente de difusión (cm<sup>2</sup>/s)
- $C^*$  concentración en el seno de la disolución del analito (mol/cm<sup>3</sup>)
- $v$  es la velocidad de barrido (V/s)

La corriente de pico catódico ( $i_{pc}$ ) y anódico ( $i_{pa}$ ) coinciden, por lo que su relación es igual a la unidad.

$$\left( \frac{i_{pc}}{i_{pa}} \right) = 1 \quad (22)$$

*Ecuación 22 Relación de la corriente de pico anódico y catódico para un proceso reversible.*

A través de las ecuaciones se concluye que la corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido, mientras que el potencial de pico es independiente de la velocidad de barrido con la que se realice la voltametría cíclica.

Realmente es difícil que el proceso de oxidación-reducción sea completamente reversible, por lo que a continuación se describirá un proceso irreversible.

En un **proceso totalmente irreversible** la velocidad de transporte electrónica presenta un valor muy bajo, debido a ello, la etapa limitante de la reacción es la transferencia electrónica (en lugar de la difusión). La ecuación de Randles-Sevcik para un proceso irreversible se corresponde con la **ecuación 23**, donde la intensidad de pico a 25°C se calcula con la siguiente ecuación [178]:

$$i_p = (2,99 \cdot 10^5) \cdot n \cdot \alpha^{\frac{1}{2}} \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot \nu^{\frac{1}{2}} \cdot A \cdot C^* \quad (23)$$

*Ecuación 23 Ley de Randles-Sevcik para un proceso totalmente irreversible.*

$$i_{pc} \neq i_{pa} \neq 1 \quad (24)$$

*Ecuación 24 Relación de la corriente de pico anódico y catódico para un proceso irreversible*

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

El potencial de pico se puede relacionar con el potencial formal a partir de la **ecuación 25**:

$$E_p = E^0 - \left( \frac{R \cdot T}{\alpha \cdot n \cdot F} \right) \left[ 0,780 + \ln \left( \frac{D^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left( \frac{\alpha \cdot F \cdot \nu}{R \cdot T} \right)^{1/2} \right] \quad (25)$$

*Ecuación 25 Potencial para un proceso totalmente irreversible*

Donde  $k^0$  es la conste estándar cinética de la reacción electroquímica.

Con las ecuaciones que describen un proceso irreversible, se puede concluir que la velocidad de barrido sí afecta al valor del potencial de pico. Por otro lado, al igual que en el proceso reversible, la corriente de pico también está afectada por la raíz cuadrada de la velocidad de barrido con la que se lleve a cabo la voltametría cíclica [173].

En el caso de que el proceso electroquímico sea cuasi-reversible, dependerá tanto de la transferencia electrónica como de los procesos de difusión. Para



obtener una idea de la irreversibilidad, se calcula la separación del pico anódico y catódico a partir de la **ecuación 20** [176].

### 2.6.1.2 Cronoamperometría

La cronoamperometría es un método electroquímico en el que se aplica un potencial fijo sobre el electrodo de trabajo [179]. Dicha técnica normalmente se realiza en una celda electrolítica que presenta una configuración de tres electrodos. El proceso de medida del potencial en la celda parte de un potencial en el que no se producen reacciones electroquímicas. Posteriormente, aplicando un potencial constante en el que el compuesto de interés es electroactivo tienen lugar las reacciones de oxidación-reducción del mismo [180].

Como consecuencia de los procesos de oxidación-reducción del analito que tienen lugar en la celda se produce una circulación de corriente eléctrica, representada en un cronoamperograma. El valor de la corriente alcanzada dependerá de las capas difusivas del analito en el electrodo de trabajo (una capa difusiva ( $\delta$ ) se corresponde con la región de un electrodo en la que la concentración del analito difiere con la concentración del mismo en la disolución electrolítica) [181]. El proceso electroquímico genera una diferencia de concentraciones entre la solución y la concentración de la especie en la zona cercana a la superficie del electrodo ( $\delta$ ), lo que da lugar a un transporte de especies (difusión) que tiende a compensar la diferencia de concentraciones entre ambas regiones [182].

El fenómeno de difusión viene descrito por la ley de Fick [183]:

$$J = -D \cdot \frac{\partial C}{\partial X} \quad (26)$$

*Ecuación 26 Ley de difusión de Fick*

Donde los parámetros de la ecuación son:

- J es el flujo de difusión (mol/cm · s)
- D es el coeficiente de difusión

- $\partial C/\partial X$  es el gradiente de concentración

El transporte de las especies de la solución hasta la superficie del electrodo puede tener lugar de distintas formas, por su interés con el presente trabajo caben mencionar:

**La difusión de régimen transitorio:** es el fenómeno de transporte resultante de un gradiente de concentraciones que tiene lugar al aplicar un potencial (catódico o anódico), en consecuencia, el analito se consume debido a las reacciones de oxidación-reducción. La difusión del analito desde la solución (donde la concentración es mayor) hasta la superficie del electrodo (donde la concentración es menor) se produce únicamente por la difusión natural donde el perfil de concentraciones obtenido (**figura 19**) es función del tiempo y de la distancia al electrodo [181], [182]. Inicialmente, la concentración de la especie electroactiva en la superficie del electrodo es 0, mientras que en la solución se mantiene la concentración original. Por ello, las especies más cercanas al electrodo comienzan a difundirse hasta él, con el paso del tiempo el espesor de la capa límite aumenta (la pendiente del perfil de concentraciones disminuye). Debido a ello, la difusión de las especies hasta la superficie del electrodo tendrá lugar con una mayor dificultad con el paso del tiempo [184].

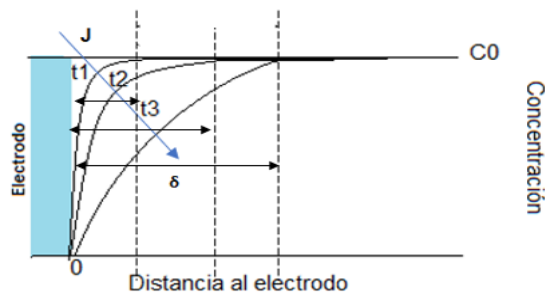


Figura 19 Difusión de régimen transitorio.

La densidad de corriente en régimen transitorio viene definida por la ecuación de Cottrel, la cual muestra la caída de corriente farádica debido a la transferencia electrónica entre la solución y el electrodo en cada pulso de potencial [180].

$$i(t) = \frac{n \cdot F \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C_{\text{Solución}}}{\pi^{1/2} \cdot t^{1/2}} \quad (27)$$

*Ecuación 27 Ecuación de Cottrell*

Donde los parámetros de la ecuación son:

- n: es el número de electrones transferidos en los procesos de oxidación-reducción.
- F: constante de Faraday (C/mol).
- A: área del electrodo (cm<sup>2</sup>).
- C<sub>Solución</sub> es la concentración del analito en la disolución (mol/cm<sup>3</sup>).
- t: tiempo transcurrido desde la aplicación del pulso de potencial (s)

**La difusión de régimen estacionario:** en el transporte de las especies desde la solución hasta la superficie del electrodo interviene el fenómeno de convección, dicho suceso es la causa de que se lleve a cabo agitación mecánica (generalmente) de la solución que contiene al analito [182]. Como resultado de la agitación, la concentración de las moléculas en la cercanía del electrodo se mantiene uniforme en todo momento, por lo que  $\delta$  presenta un espesor constante independientemente del tiempo [182]. Tal y como se muestra en la **figura 20**, lejos del electrodo el perfil de concentraciones se mantiene horizontal gracias a la convección que es capaz de mantener constante la concentración del analito en el seno de la solución.

La densidad de corriente en régimen estacionario viene dada por la ecuación de Levich [182]:

$$i = \frac{n \cdot F \cdot D}{\delta} (C_{\text{Solución}} - C_{\text{Electrodo}}) \quad (28)$$

*Ecuación 28 Ecuación de Levich*

Donde el único parámetro nuevo es la concentración del analito en el electrodo (C<sub>Electrodo</sub>)

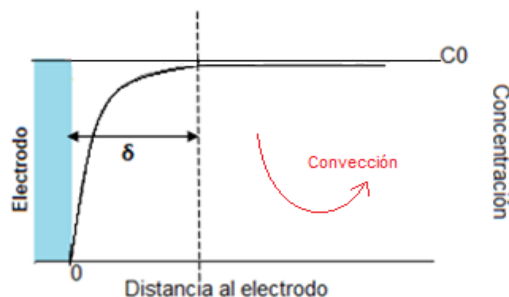


Figura 20. Difusión de régimen estacionario

La cronoamperometría se utiliza generalmente para el estudio de mecanismos de reacción, la obtención de parámetros cinéticos, coeficientes de difusión del analito, procesos de electropolimerización, etc [179], [185].

La electropolimerización llevada a cabo por cronoamperometría es uno de los métodos más empleados en la modificación de electrodos de trabajo, se trata del método más utilizado para la elaboración de sensores basados en MIPs [85]. En este proceso, la solución contiene un polímero donde al aplicar un potencial fijo (catódico o anódico) se consigue la polimerización electroquímica sobre el electrodo de trabajo [185]. Este fenómeno se puede ver afectado por los procesos de difusión de las especies electroactivas, de manera que la corriente alcanzada en el proceso de electropolimerización es menor cuanto más se dificulte el paso de difusión de las especies a través del polímero [186].

La difusión es un parámetro de gran importancia en los procesos de electropolimerización sobre el electrodo de trabajo y determina la forma del codo de curvatura que se muestre en el cronoamperograma, obtenido de la representación de la corriente frente al tiempo (**figura 21**) [183]. En las curvas cronoamperométricas que se obtienen por polimerización generalmente se distinguen tres zonas en las que se pueden observar la nucleación, la formación de la película polimérica y su crecimiento con el tiempo [187]:

- **Zona I:** la corriente aumenta rápidamente debido a los procesos electroquímicos que tienen lugar en la celda electrolítica al aplicar un potencial (se produce la oxidación-reducción de las sustancias que se encuentran en la disolución).
- **Zona II:** la intensidad de la corriente aumenta, en esta parte de la curva se puede distinguir la nucleación, proceso por el cual se depositan los primeros núcleos cristalinos sobre la superficie del electrodo de trabajo

y depende principalmente del potencial aplicado. Por tanto, durante esta etapa el polímero se adhiere sobre la superficie del electrodo de trabajo [188].

- **Zona III:** se observa la estabilización y crecimiento de la película sobre el electrodo a un valor constante de potencial.

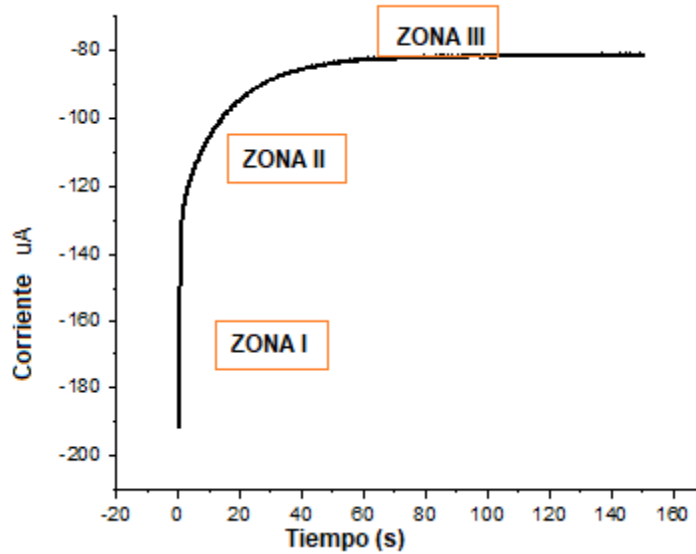


Figura 21 Cronoamperograma obtenido de la electropolimerización de un polímero.

El espesor de la película que se ha formado sobre el electrodo de trabajo se puede calcular a partir de la derivada de la primera ley de Faraday [187]:

$$d = \frac{Q \cdot M}{2 \cdot F \cdot \rho} \quad (29)$$

Ecuación 29 Cálculo del espesor de una película polimérica a partir de la 1ª Ley de Faraday

Donde:

- Q es la carga específica por unidad de área polimerizada.
- M es la masa molecular del polímero.

- $F$  es la constante de Faraday
- $\rho$  es la densidad del polímero

El espesor de la película depositada sobre el electrodo de trabajo depende del tiempo de electropolimerización durante el cual se lleve a cabo la cronoamperometría; cuanto mayor es el tiempo mayor es el grosor de la película depositada sobre el electrodo de trabajo [189].

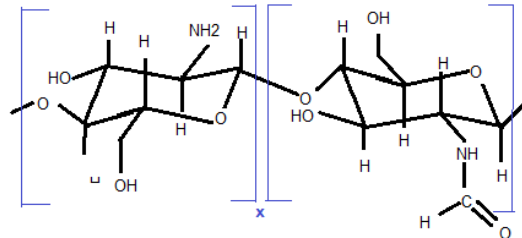
La importancia de la cronoamperometría en el presente trabajo radica en que ha sido utilizada para la obtención de sensores MIP, tal y como se ha indicado en anteriores apartados. Esta técnica puede estar afectada por factores como el tiempo de electropolimerización, el voltaje aplicado, la presencia de agitación o no de la solución que contiene al polímero, entre otros parámetros.

El tiempo de electropolimerización, es un parámetro importante en la fabricación de los sensores basados en MIP, ya que trabajando con espesores de película elevados la transferencia electrónica a través del polímero se dificulta con el aumento del espesor. Debido a la importancia que esto supone, se debe trabajar con espesores de polímeros conductores sintetizados con el tiempo óptimo, para que no afecten negativamente al rendimiento electroquímico del sensor [189]. El potencial aplicado durante la cronoamperometría también es un parámetro de gran importancia, ya que se debe aplicar el potencial suficiente para que tenga lugar la polimerización del polímero en presencia de la molécula plantilla [179]. Finalmente, el proceso de agitación durante la cronoamperometría es una característica de gran interés ya que da lugar a un transporte de las especies en el que interviene la convección, fenómeno que da lugar a un proceso de difusión en régimen estacionario [182].

## 2.7 Chitosán o quitosano

El chitosán o quitosano (**figura 22**) es un amino-polisacárido que se obtiene por desacetilación de la quitina, polímero natural muy abundante en la naturaleza. La quitina se encuentra formando parte del exoesqueleto de artrópodos y también, de la pared celular de algunos vegetales, como los hongos, en su estructura química presenta unidades repetidas de 2-acetilamina-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa [190]. El chitosán presenta una estructura lineal no ramificada, compuesta principalmente por unidades repetidas de 2-amino-2-desoxi-  $\beta$ -D-

glucopiranososa y en menor proporción por moléculas de 2-acetilamina-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa que se encuentran unidas por enlaces  $\beta$  (1,4) [191], [192].



**Figura 22** Estructura química del quitosán. "x" Unidades repetidas de 2-amino-2-desoxi-beta-D-glucopiranososa. "y" Unidades repetidas de 2-acetilamina-2-desoxi-beta-D-glucopiranososa

El quitosán se caracteriza fundamentalmente mediante la definición de los siguientes parámetros:

**-Masa molecular (MW).** Característica que depende fundamentalmente de la procedencia de la quitina (animal o vegetal) [193].

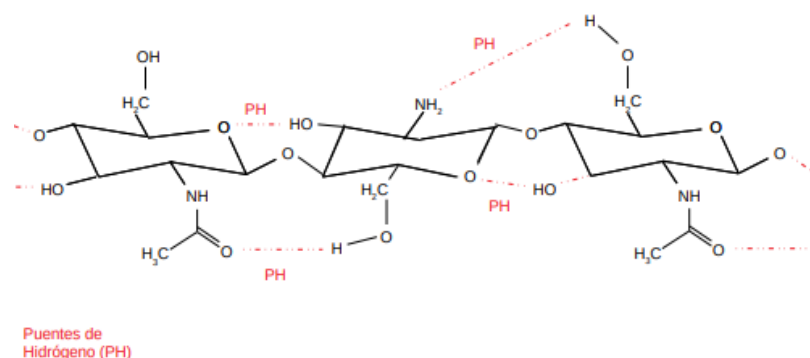
**-Grado de desacetilación (DDA).** Indica el grado en que los grupos acetilo han sido sustituidos por grupos amino. El DDA del quitosán comercial oscila entre un 70% y un 90%, este parámetro depende de las condiciones en las que se haya llevado a cabo la obtención del quitosán [191]. Cuanto mayor es el grado de DDA del quitosán, más cristalino es el biopolímero, lo cual se debe a la disminución de los grupos acetilo presentes en su estructura química [190].

El quitosán presenta propiedades que le convierten en un biopolímero interesante en la industria alimentaria, biomedicina, biotecnología y en el desarrollo de sensores, las cuales se describen a continuación:

- **Biocompatible.** El quitosán es un polímero no tóxico compatible con el organismo [191].
- **Biodegradable.** Su degradación se lleva a cabo por las reacciones químicas resultantes de la actuación de microorganismos dando lugar a productos no tóxicos [191].

- **Bioactivo.** El quitosán es considerado bioactivo por presentar: poder antimicrobiano (actúa sobre microorganismos inhibiendo su crecimiento o incluso provocando su muerte [191],[194]), propiedades antioxidantes (el quitosán actúa como eliminador de radicales libres impidiendo las reacciones de oxidación) [191], [195] y es un compuesto antitumoral (ayuda a la formación de células contra el cáncer) [194].
- **Estructura química fácilmente modificable.** Su estructura química presenta varios grupos reactivos, por lo que se obtienen fácilmente compuestos derivados [190].
- **Agente quelante.** El quitosán forma fácilmente enlaces con iones de metales pesados. Esta propiedad es fundamental ya que le permite formar enlaces estables con la plata [128], [196].

La solubilidad del quitosán depende del pH del medio, por debajo de un valor de pH 6,3 el quitosán se vuelve insoluble y precipita. En estado sólido, tal y como se muestra en la **figura 23**, se forman puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y amino de su estructura química. Cuando se introduce en un ácido este enlace se disocia convirtiéndolo en un polielectrolito catiónico soluble, para su disolución se pueden utilizar diferentes ácidos diluidos, entre los más empleados se encuentran: el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido nítrico [191]. En ciertas aplicaciones o análisis electroquímicos su baja solubilidad a pH básico puede ser un inconveniente que se puede solucionar modificando su estructura química, ya que es un polímero fácilmente alterable por la presencia de distintos grupos reactivos. En su estructura química hay grupos amino (-NH<sub>2</sub>), hidroxilo (-OH) primario y secundario, y finalmente el grupo n-acetilo (NH-CO-CH<sub>3</sub>), por lo que se pueden obtener derivados que mejoren su solubilidad [193].



**Figura 23** Estructura química del quitosán donde se muestran los enlaces de hidrógeno entre los grupos acetilo e hidroxilo y el grupo amino e hidroxilo.



En los últimos años, este polímero se ha utilizado en el desarrollo de sensores electroquímicos debido a sus buenas características, siendo de especial interés su biocompatibilidad, facilidad de formar películas (debido a sus condiciones de solubilidad) y reactividad [36]. Estas cualidades le convierten en un biopolímero muy adecuado para el desarrollo de sensores basados en la tecnología de impresión molecular [67].

El procedimiento empleado para su electrodeposición sobre un electrodo de trabajo se conoce como mecanismo de neutralización. Al circular una corriente eléctrica debido a los procesos de oxidación-reducción que tienen lugar en la celda electrolítica, se produce la liberación de los grupos OH de la solución, de manera que pueden desprotonar las aminas catiónicas ( $\text{NH}_3^+$ ) responsables de la solubilidad del chitosán [198]. Como consecuencia de la neutralización, en la interfaz de la superficie del electrodo, se produce un cambio en la constante de acidez del grupo amino ( $\text{pK}_a > 6,3$ ). Debido a ello, el chitosán se convierte en un polímero insoluble depositándose así sobre el electrodo [198], [199].

### 2.7.1 Chitosán combinado con materiales nanoestructurados

El mayor inconveniente del chitosán en el análisis electroquímico es su alto grado de cristalinidad lo que le hace ser un mal conductor de la corriente eléctrica, este hecho dificulta la transferencia electrónica a su través. Este problema se puede solucionar mediante la incorporación de nanoestructuras basadas en metales conductores [64], [120].

La combinación de polímeros con nanoestructuras de propiedades electroactivas como, nanopartículas de oro o nanohilos metálicos es una de las técnicas más interesantes para el desarrollo de sensores electroquímicos [64], [120]. Entre los nanomateriales nombrados, los AgNWs son de las sustancias de mayor interés debido a que son capaces de incrementar la conductividad del polímero, recubriéndolo y transformándolo en un polímero conductor [64], [120].

La capacidad quelante del chitosán le confiere facilidad para enlazarse covalentemente con los átomos de plata [128], [196], [200]. Sin embargo, como la adhesión de los AgNWs en el chitosán es poco resistente [122], [201] es necesario llevar a cabo diferentes procesos de unión para solventarlo. Actualmente, destacan el empleo de agentes reticulantes o las modificaciones sobre la superficie del chitosán.

- **Chitosán reticulado.** Se ha comprobado que la utilización de agentes reticulantes mejoran la estabilidad de la plata en la película polimérica del chitosán [93]. El glutaraldehído es el agente de reticulación empleado por excelencia debido a su efectividad, la reacción con el chitosán provoca cambios en su morfología y estructura, lo que modifica algunas de sus propiedades, como su capacidad de adsorber los iones metálicos [202]. Por ejemplo, se han utilizado iones metálicos (Au, Ag) que se encuentran en su forma aniónica en medios ácidos (ej. HCl ) dando lugar a una fuerte atracción electrostática entre dichos iones de carga negativa y los grupos imina con carga positiva resultantes del entrecruzamiento entre el chitosán y el glutaraldehído. Este fenómeno favorece la adsorción de los iones metálicos en el chitosan reticulado [202].
  
- **Obtención de derivados del chitosán.** Se ha demostrado que la modificación de la estructura química del chitosán con grupos reactivos da lugar a enlaces de mayor fortaleza entre los AgNWs y el chitosán. Por ejemplo, el chitosán tiolado (derivado del chitosán obtenido de incluir un grupo tiol en el grupo amino del 2º carbono del chitosán) permite que se forme un enlace covalente de gran resistencia y estabilidad entre la plata y los grupos tiol [201].
  
- **Modificaciones sobre la superficie del chitosán.** Se ha demostrado que la modificación de la de la superficie del chitosán con compuestos orgánicos proporciona una unión más resistente entre los AgNWs y este polímero. Por ejemplo, se ha empleado el ácido 11-aminodecanoico para formar un enlace covalente entre los grupos carboxilo de un extremo del ácido y el grupo amino del chitosán, y puentes de hidrógeno, entre el grupo amino del ácido y el PVP que recubre los AgNWs. De esta manera se consigue fortalecer la adhesión de los AgNWs a la película de chitosán [122], [203].

## **Capítulo III**

### **Reactivos, materiales y equipos**



## 3. Reactivos, materiales y equipos

### 3.1 Reactivos

Los reactivos empleados en el presente trabajo se describen a continuación:

- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pureza 95-97%, CAS Number 7664-93-9)
- Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pureza mínima 99,7%, Panreac, CAS Number 613-90-4).
- Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , pureza mínima 99%, Quality Chemicals, CAS Number:67-64-1).
- Agua desionizada Milli-Q de conductividad 18,2 M $\Omega$ -cm
- Alpha-D (+)-Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , pureza >99%, Sigma-Aldrich)
- Chitosán o Quitosano CHI ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_6$ , pureza>99%, Amresco)
- Cloruro de cobre (II) ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , Panreac, Código: 141264).
- D (+) Galactosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , pureza>99%, Sigma-Aldrich)
- Dihidrogenofosfato sódico ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , pureza mínima 99%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-79-4).
- Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , pureza mínima> 99,8%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 64-15-5).
- Etilenglicol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ , anhidro al 99,8%, Sigma-Aldrich, CAS Number: 107-21-1).
- Glutaraldehído ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ , solución acuosa al 50%, Alta Aesar, CAS Number: 111-30-8).
- Hidrogenofosfato sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pureza mínima 99%, Sigma-Aldrich, CAS number 7558-80-7).

- Lactosa (C<sub>12</sub> H<sub>22</sub> O<sub>11</sub>, Sigma - Aldrich)
- Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>, Sigma- Aldrich, CAS Number: 7761-88-8).
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% p/v, N° CE 231-765-0)
- Polivinipirrolidona, PVP (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub>, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9003-39-8)

## 3.2 Materiales

Todos los materiales empleados en el presente trabajo se nombran a continuación:

- Bomba peristáltica (Perimax)
- Celda electroquímica de 5 mL.
- Placa de platino (2 cm × 1 cm).
- Cubeta de cuarzo (10 mm × 10 mm).
- Electrodo de diamante dopado con boro (BDD).
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl, 3M Nesslab).
- Matraz de fondo redondo con dos bocas.
- Placa calefactora (RSLab-11C)
- Placa calefactora (Arex Digital)
- Sistema de reflujo.

## 3.3 Equipos

Todos los equipos utilizados en el presente trabajo se describen a continuación:

- Microscopio de Fuerza Atómica Molecular (Cypher, asylum Research AFM)

- Centrifuga modelo Sorvall Centrifuge ST 8 (Thermo Scientific, USA)
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japón).
- Equipo de Difracción de Rayos X (DRX, Bruker Discover D8)
- Potenciostato / Galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research).
- Ultrasonidos Vortex 3 (IKA, USA)

## **Capítulo IV**

# **Metodología y Desarrollo experimental**





## 4. Metodología y Desarrollo experimental

### 4.1 Desarrollo de sensores nanoestructurados

La elaboración de sensores basados en la tecnología de impresión molecular dedicados a la detección de azúcares actualmente representa una línea de investigación relativamente nueva por lo que el estudio experimental del presente trabajo se ha modificado conforme se han ido obteniendo resultados.

El desarrollo de trabajo de fin de grado aquí presentado se puede dividir en dos etapas, la primera etapa consiste en la preparación de las disoluciones para sintetizar los sensores basados en polímeros de impresión molecular MIP y NIP, así como la síntesis y la caracterización de los AgNWs que forman parte de la película polimérica. La segunda etapa de la fabricación del sensor consiste en depositar las disoluciones sobre la superficie de los electrodos BDD mediante la aplicación de técnicas electroquímicas.

#### 4.1.1 Preparación de las disoluciones

- Limpieza de los electrodos BDD:

- **Disolución piraña**

En un vaso de precipitados se añaden 3 mL de ácido sulfúrico de pureza mínima del 95% y 1 mL de peróxido de hidrógeno.

-Fabricación de los sensores MIP y NIP:

- **Ácido Acético 3% V/V (CH<sub>3</sub>COOH)**

Se preparó una disolución de ácido acético con una concentración de porcentaje en volumen al 3%. Para obtener la concentración deseada, en una matraz aforado de 50 mL se añadieron 1,5 mL de ácido acético puro y se enrasó con agua desionizada Milli-Q.

- **Chitosán o Quitosano**

Se preparó una disolución de chitosán con una concentración de 1,5 mg/mL en un matraz aforado de 25 mL. Para ello, se añadieron 0,0375 g de chitosán al matraz y se enrasó con la disolución de ácido acético al 3% V/V.

- **Disolución de AgNWs**

Se preparó una disolución madre de AgNWs con una concentración de 10 mg/mL en etanol. A partir de esta disolución se prepararon las disoluciones hija de una concentración de un 1 mg/mL y 5 mg/mL.

- **Glutaraldehído**

Se han empleado vapores de glutaraldehído al 25% w/w en buffer fosfato de concentración 0,01 M.

-Detección de los analitos por voltametría cíclica:

- **Disolución buffer fosfato de pH 7,4**

Se preparó una disolución de pH 7,4 y concentración 0,01 M de buffer fosfato (PBP) en un matraz aforado de 500 mL. Para ello, se pesaron 0,2697 g de fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y 0,3659 g de fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Finalmente, se llevaron a un matraz aforado de 500 mL enrasando con agua desionizada Milli-Q.

Con la ecuación de Henderson-Hasselbalch se calcula el pH conocido el pKa de la solución.

$$pH = pKa + \frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]} \quad (30)$$

*Ecuación 30 Ecuación de Henderson-Hasselbach*

- **Lactosa**

Para obtener una disolución de lactosa de concentración  $10^{-4}$  M en buffer fosfato de pH 7,4 y concentración 0,01 M, se preparó previamente una disolución madre de concentración  $10^{-3}$  M. Para ello, se pesaron 8,5575 mg de lactosa y se llevaron a un matraz aforado de 25 mL, el cual se enrasó con la solución buffer fosfato de pH 7,4 y concentración 0,01 M.

La solución de lactosa  $10^{-4}$  M se obtuvo tomando 2,5 mL de la solución madre preparada, finalmente, se enrasó con la misma disolución buffer en un matraz aforado de 25 mL.

- **Glucosa**

Se preparó previamente una disolución madre de glucosa con una concentración  $10^{-3}$  M. Para obtener la concentración deseada se pesaron 4,5 mg de glucosa y se añadieron a un matraz aforado de 25 mL, el cual se enrasó con la disolución buffer fosfato de pH 7,4 y concentración 0,01 M.

La disolución de glucosa de concentración  $10^{-4}$  M se preparó tomando 2,5 mL de la disolución madre preparada, finalmente, se enrasó con la misma disolución buffer en un matraz aforado de 25 mL.

- **Galactosa**

Se preparó una disolución madre de galactosa  $10^{-3}$  M en buffer fosfato de pH 7,4 y concentración 0,01 M, para obtener una disolución hija de concentración  $10^{-4}$  M. Para ello, se siguieron los mismos pasos que en la preparación de la disolución de glucosa.

- **Disolución de cloruro de potasio (KCl)**

Se preparó una disolución de cloruro de potasio de 25 mL con una concentración 0,1 M. Para ello, se pesaron 0,1863 g de KCl y se añadieron a un matraz de 25 mL enrasando con agua desionizada Milli-Q.

-Disoluciones empleadas para la síntesis de AgNWs:

- **Cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ )**

Se preparó una disolución de  $\text{CuCl}_2$  de una concentración  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M, para ello se pesaron 0,0001 g de  $\text{CuCl}_2$  y se añadieron a un matraz aforado de 5 mL enrasando con etilenglicol puro (EG).

- Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ )

Se preparó una disolución de  $\text{AgNO}_3$  de una concentración 0,12 M. Para ello, se pesaron 0,102 g de  $\text{AgNO}_3$  y se añadieron a un matraz aforado de 5 mL enrasando con EG.

- Polivinilpirrolidona (PVP)

Se preparó una disolución de concentración  $3,6 \cdot 10^{-4}$  M, para ello se pesaron 0,099 g de PVP y se añadieron a un matraz aforado de 5 mL enrasando con EG.

## 4.1.2 Procedimiento experimental

### 4.1.2.1 preparación de los AgNWs

La preparación de AgNWs se ha llevado a cabo según el método poliol descrito en el fundamento teórico (capítulo II).

Se comienza calentando 5 mL de EG en un matraz redondo de dos bocas situado sobre un baño de aceite a  $160^\circ\text{C}$ , tal y como se muestra en la **figura 24**. Este proceso se lleva a cabo bajo reflujo conectando una de las boquillas del matraz a la red de bombeo y cerrando la otra boquilla del matraz con un tapón. Posteriormente, se añade con una micropipeta 0,5 mL de la disolución de  $\text{CuCl}_2$  directamente al matraz y se deja calentando durante 5 min.

Pasado el tiempo, con ayuda de una bomba peristáltica de jeringas se añaden simultáneamente y gota a gota 2,5 mL de la disolución de  $\text{AgNO}_3$  y 5 mL de la disolución de PVP. Durante todo este proceso se aplica una velocidad de agitación de 400 rpm, una vez ha finalizado se tapa el matraz con el tapón y se dejan reaccionar durante 1 h bajo agitación.

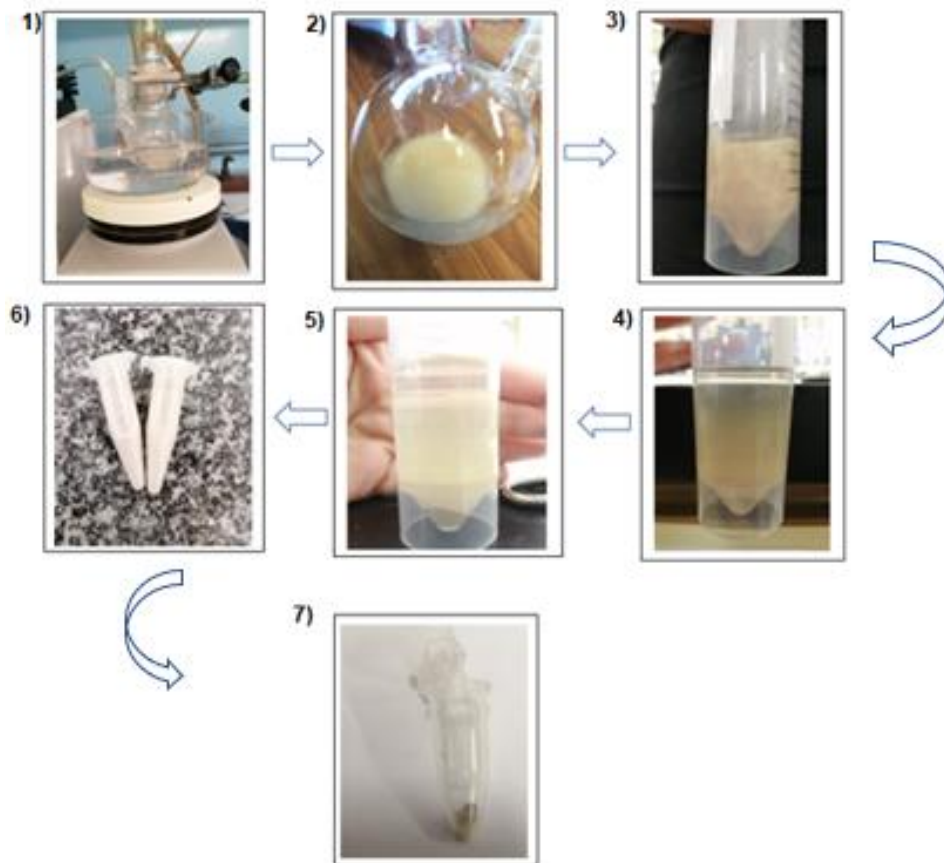
La disolución obtenida se deja enfriar a temperatura ambiente, en ella hay una mezcla de nanopartículas de plata (AgNPs) y AgNWs, por lo que para purificar los AgNWs se lavan con etanol y se centrifuga a 2000 rpm durante 20 min

utilizando la centrífuga que se muestra en la **figura 24**. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y el producto de reacción se lava una segunda vez con etanol, la mezcla se vuelve a centrifugar durante 10 min a 5000 rpm. Para el tercer lavado, el precipitado se añade a un eppendorf al que se le añade etanol y se centrifuga durante 10 min a 5000 rpm. Finalmente, se elimina el sobrenadante del eppendorf y se deja evaporar el etanol.



*Figura 24* Equipo empleado en la síntesis de AgNWs.

En la **figura 25** se muestra la obtención y las etapas de centrifugación para la síntesis de AgNWs.



**Figura 25** En la parte superior de la figura y leyendo de izquierda a derecha se muestran las etapas del proceso final de obtención de AgNWs. 1) y 2) Disolución obtenida tras un tiempo de reacción de 1h en la que hay una mezcla de AgNPs y AgNWs, 3) Disolución obtenida diluida con etanol, 4) primera centrifugación donde se aprecia la separación entre el sobrenadante y los AgNWs, 5) 2ª centrifugación de AgNWs diluidos en etanol donde se aprecia la separación entre el sobrenadante y los AgNWs, 6) AgNWs diluidos en etanol antes de llevar a cabo la última etapa de la centrifugación, 7) AgNWs obtenidos de la última etapa de centrifugación donde el sobrenadante ha sido eliminado.

#### 4.1.2.2 Limpieza de electrodos de diamante dopado con boro (BDD)

Para la elaboración de los sensores MIP y NIP, en primer lugar, se deben acondicionar los electrodos BDD (**figura 26**). Para ello, se comienza limpiando la superficie de los electrodos introduciéndolos en acetona pura y sometidos a ultrasonidos durante 10 min, finalizado este tiempo se introducen en agua desionizada Milli Q. Posteriormente, se lleva a cabo su inmersión en una solución piraña durante un tiempo de 3 min. Transcurrido el tiempo, se llevan a cabo lavados sucesivos en agua desionizada Milli Q y en etanol, dejándolos reposar en ambos disolventes durante 1 min. Una vez

finalizado el proceso de lavado de su superficie los electrodos se dejan secar al aire.

El proceso descrito se ha llevado a cabo con cada uno de los electrodos que se han empleado para la detección de los azúcares. Lo que permite su reutilización para cada experimento realizado.



*Figura 26 Electrodo de diamante dopado con boro (BDD)*

#### 4.1.2.3 Preparación de los sensores MIP

Para la denominación de las configuraciones correspondientes a los sensores se ha utilizado la simbología entre corchetes “[ ]” donde se encuentra la secuencia de materiales, divididos por un “-”, que han sido utilizados para la fabricación de los sensores MIP o NIP. Finalmente, al final de cada configuración hay una “/” tras la que se encuentra el nombre BDD, lo que indica que los sensores han sido fabricados en un electrodo BDD (ej. [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD).

Las abreviaturas empleadas para cada material son las siguientes:

- CHI para el chitosán.
- AgNWs para los nanohilos de plata.

Para desarrollar los sensores MIP y NIP frente a la detección de lactosa se emplearon diferentes configuraciones y parámetros de medida con el objetivo



de seleccionar la que presentase la mejor respuesta frente a la detección de este analito

Los sensores NIP se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo que el aplicado para la obtención del MIP de la configuración deseada, sin la presencia de la molécula plantilla durante la polimerización.

**Las configuraciones empleadas son:**

-MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD

Este sensor se ha elaborado con 3 concentraciones de AgNWs distintas: 1 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL.

-MIP [CHI-Glutaraldehído-AgNWs-Lactosa]/BDD

Este sensor se ha elaborado con una concentración de AgNWs de 10 mg/mL en presencia de vapores de glutaraldehído, para llevar a cabo un cross-linking entre el chitosán y el glutaraldehído.

Los parámetros de medida que se han modificado para la configuración del sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD son:

- Electropolimerización mediante voltametría cíclica y cronoamperometría.
- Concentración de AgNWs en la película de chitosán (1 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL).
- Electropolimerización sobre el electrodo BDD con agitación y sin agitación.
- Selección del eluyente.

- **MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/ BDD**

*Sensores con una concentración de 1 mg/mL en AgNWs.*

La película de quitosán modificada con AgNWs se obtuvo mediante la polimerización sobre el electrodo BDD de una solución con una mezcla de quitosán de concentración 1,5 mg/mL y AgNWs con una concentración de 1 mg/mL que contenía la molécula plantilla de lactosa en una concentración 0,01 M.

La polimerización de la mezcla sobre el electrodo BDD se llevó a cabo sin agitación por medio de cronoamperometría. Posteriormente, los electrodos se extrajeron de la celda electrolítica y se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche.

La molécula plantilla de lactosa fue eliminada de la matriz polimérica de quitosán empleando como eluyente una solución de KCl de concentración 0,1 M. Para llevar a cabo la elución, los electrodos se sumergieron en esta solución durante un periodo de 20 min con agitación. Finalizado el tiempo, los electrodos se lavaron con agua desionizada Milli Q. para eliminar los residuos de la solución de KCl.

#### *Sensores con una concentración de 5 mg/mL en AgNWs*

Con esta concentración (5 mg/mL), se obtuvieron dos sensores llevando a cabo polimerización con agitación y sin agitación, en la fabricación del sensor obtenido sin agitación se siguió el mismo procedimiento que el descrito para la misma configuración del sensor de lactosa con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL.

El procedimiento de síntesis seguido para la obtención del sensor a través de polimerización con agitación fue el mismo que en el anterior sensor, pero en este caso se introdujo agitación durante la cronoamperometría y el proceso de elución se realizó utilizando de manera independiente dos eluyentes distintos: el KCl de concentración 0,1 M y el agua desionizada Milli Q.

#### *Sensores con una concentración de 10 mg/mL en AgNWs*

Estos sensores se han obtenido siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en los anteriores sensores, en concentración 5 mg/mL (obtenidos por cronoamperometría con agitación) y llevando a cabo la elución con agua desionizada Milli Q en lugar de con KCl.

- **MIP [CHI-AgNWs-Glutaraldehído-Lactosa] / BDD**

La película de quitosán modificada con AgNWs se obtuvo siguiendo el protocolo anteriormente descrito, en concentración 10 mg/mL. Finalizada la polimerización, los electrodos se sometieron a vapores de glutaraldehído durante 10 min sin secar.

El proceso de elución de la molécula plantilla es exactamente el mismo que se ha seguido para la anterior configuración en ausencia de reacción con glutaraldehído a una concentración de 10 mg/mL de AgNWs.

- **MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/ BDD y MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/ BDD**

Se obtuvieron sensores MIP para la detección de glucosa y galactosa. La elaboración del sensor MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD se realizó bajo el mismo protocolo de síntesis que se siguió para el sensor de lactosa con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL en la película de quitosán, empleando en este caso glucosa como molécula plantilla (0,01 M). La elaboración del sensor MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD se realizó siguiendo el mismo procedimiento utilizando como molécula plantilla galactosa (0,1 M).

#### **4.1.1.1 Caracterización de AgNWs**

La caracterización de los AgNWs se ha realizado mediante tres técnicas: espectroscopía UV-VIS, AFM y DRX.

- **Espectroscopía ultravioleta – visible (UV-VIS)**

Las propiedades ópticas de los AgNWs se estudiaron mediante la técnica espectroscópica ultravioleta-visible (UV-VIS).

El proceso se llevó a cabo con el software UV-Probe, introduciendo la solución de estudio en un porta-muestras de cuarzo (10 mm × 10 mm).

Para llevar a cabo la caracterización, en primer lugar, se programó el rango de longitudes de onda entre 200 nm y 800 nm. Posteriormente, se realizó una línea base la cual constituye el blanco del espectro ultravioleta y después se

llevó a cabo la medida con un espectrofotómetro, como el mostrado en la **figura 27**.

El estudio se comenzó con la obtención del espectro de la solución inicial de AgNWs sin purificar, posteriormente tras el proceso de centrifugación se obtuvo el espectro de absorción correspondiente tanto de los AgNWs como del sobrenadante.



*Figura 27* Espectrofotómetro empleado para caracterizar los AgNWs.

- **Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La microscopía de fuerza atómica se llevó a cabo para estudiar la morfología y dimensión de los AgNWs, para ello se utilizó el equipo AFM mostrado en la **figura 28**.

Para obtener la muestra se depositaron 25  $\mu\text{L}$  de la solución de AgNWs en etanol sobre el electrodo BDD y se dejó secar al aire para evaporar el etanol.



*Figura 28* Equipo de Microscopía de Fuerza Atómica Molecular.

### 4.1.2 Estudio del comportamiento electroquímico

La elaboración de los sensores MIP y NIP y el estudio de su comportamiento electroquímico se ha llevado a cabo mediante técnicas electroquímicas de análisis.

La deposición de la película polimérica sobre la superficie del electrodo se ha realizado a través de dos técnicas electroquímicas: cronoamperometría y voltametría cíclica. La respuesta del sensor frente a los analitos de interés se ha estudiado mediante voltametría cíclica. Los analitos estudiados han sido: lactosa, glucosa y galactosa cuyo comportamiento electroquímico se ha determinado a través de los procesos de oxidación de los AgNWs que se encuentran depositados en la película de quitosán.

El equipo empleado para llevar a cabo ambos procesos fue un potencióstato/galvanostato como el que se muestra en la **figura 29**.



*Figura 29* Potenciostato utilizado para el estudio electroquímico de los sensores MIP y NIP.

#### 4.1.2.1 Elaboración del sensor nanoestructurado MIP y NIP.

La deposición de la película de quitosán modificada con AgNWs se realizó en una celda electrolítica que presentaba una configuración de tres electrodos, como electrodo de trabajo se empleó un electrodo BDD, como electrodo de referencia Ag/ AgCl en KCl y un contraelectrodo de platino.

El proceso de deposición se comenzó vertiendo la disolución preparada en ausencia de la molécula plantilla (NIP) o en presencia de la misma (MIP) en una celda electrolítica de 5 mL de capacidad. La polimerización se llevó a cabo en un primer momento sin agitación, pero finalmente se comprobó que se obtenían mejores resultados depositando las soluciones con agitación, estableciendo una velocidad de agitación de 190 rpm.

Los parámetros definidos para realizar la polimerización por cronoamperometría son:

- **Tiempo de electrodeposición:** 90 s
- **Potencial aplicado:** -1,1 v.

Los parámetros definidos para realizar la polimerización por voltametría cíclica son:

- **Nº de ciclos:** 15
- **Potencial máximo (V):** 0,4
- **Potencial mínimo (V):** -1,1
- **Potencial inicial (V):** 0
- **Velocidad de barrido (mV/s):** 100

A continuación, se muestra el montaje de la celda para llevar a cabo la electropolimerización.



*Figura 30* Esquema de trabajo para llevar a cabo cronoamperometría incluyendo el sistema de agitación.

#### 4.1.2.2 voltametría cíclica

El funcionamiento de los sensores MIP y NIP se estudió mediante voltametría cíclica y la medición se realizó en las mismas condiciones que la deposición.

Los parámetros de trabajo para llevar a cabo las mediciones mediante voltametría cíclica son:

- **Nº de ciclos:** 5
- **Potencial máximo (V):** 1
- **Potencial mínimo (V):** -1
- **Potencial inicial (V):** 0
- **Velocidad de barrido (mV/s):** 100

Establecidos los parámetros de operación se continuó con el montaje de la celda, cuyo esquema se muestra en las **figuras 31 y 32** según el analito empleado.

Para la detección de glucosa y lactosa la celda electroquímica empleada presenta 5 mL de capacidad y es la que se muestra en la **figura 31**. Cuyo protocolo de medición se explica a continuación.

Como se ha mencionado anteriormente, las medidas electroquímicas empleadas para el análisis electroquímico de los sensores desarrollados durante este trabajo se han determinado mediante voltametría cíclica. Para ello, los sensores MIP se sumergen en una solución de buffer fosfato de concentración 0,01 M y de pH 7,4 con objeto de conseguir una respuesta voltamétrica que sirva como señal de referencia para el resto de las mediciones. Seguidamente, el electrodo de trabajo se deja en un vaso de precipitados con el eluyente correspondiente y en presencia de agitación para disolver la molécula plantilla (azúcar correspondiente en cada caso) de la película de quitosán. Finalizado el proceso de elución de la molécula plantilla, el electrodo de trabajo se lava con agua destilada. Posteriormente, se introduce en la celda la disolución de interés (glucosa o lactosa) y en la concentración deseada. A continuación, se conecta el potenciostato y se comprueba que la celda presenta el correcto montaje. En este momento, para mantener una buena reproducibilidad es de gran importancia que la superficie sumergida del contraelectrodo y electrodo de trabajo sea la misma.

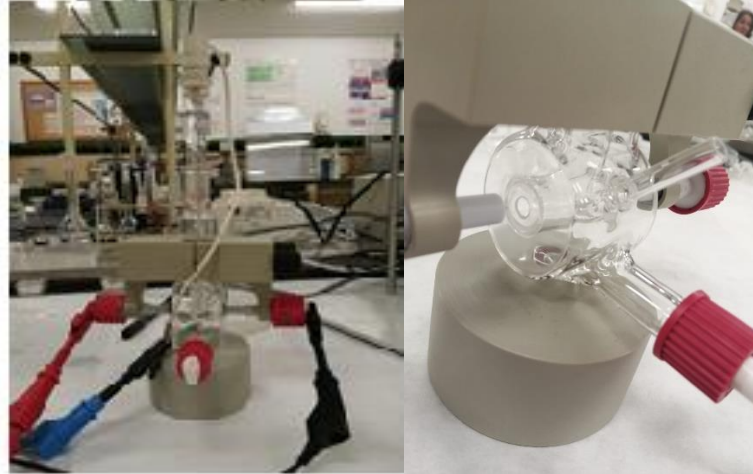


*Figura 31* Equipo de trabajo empleado para llevar a cabo la detección de lactosa y glucosa mediante voltametría cíclica.

La detección del monosacárido galactosa se ha llevado a cabo en la celda que se muestra en la **figura 32** de una capacidad de 5 mL. Los pasos que se han seguido para la detección de galactosa son los mismos que se han descrito

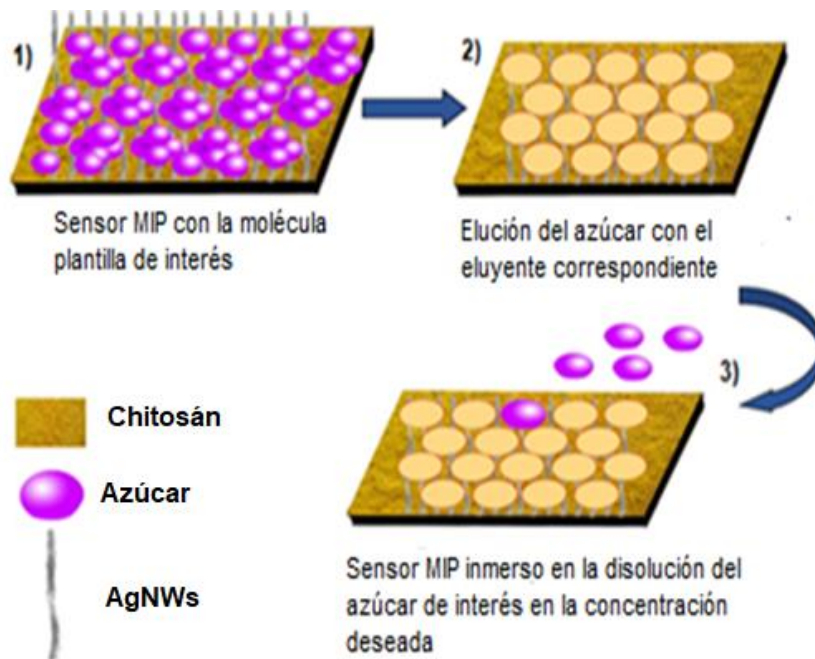


anteriormente, pero en este caso, durante el proceso de elución el electrodo de trabajo se mantiene en la celda no siendo necesaria su extracción.



**Figura 32** Equipo de trabajo empleado para llevar a cabo la detección de galactosa mediante voltametría cíclica.

A continuación, se muestra un esquema de funcionamiento de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Azúcar]/BDD en el proceso de detección del azúcar deseado.



**Figura 33** Esquema de funcionamiento de un MIP [CHI-AgNWs-Azúcar]/BDD frente a la detección del azúcar de interés.

El procedimiento de trabajo que se llevó a cabo para el sensor NIP es el mismo que el seguido para el sensor MIP, sin embargo, en este caso en el sensor no se llevó a cabo la etapa de elución ya que el chitosán no contiene a la molécula plantilla.

## **Capítulo V**

### **Resultados experimentales y discusión de resultados**



## 5. Resultados experimentales y discusión de resultados

Los resultados experimentales se dividen en dos bloques. En el primer bloque se realizó la síntesis de los sensores MIP y NIP, para ello se llevó a cabo la preparación de las disoluciones deseadas las cuales se depositaron a través de técnicas electroquímicas sobre la superficie de los electrodos BDD. En los sensores la presencia de AgNWs es de gran importancia, ya que la detección es posible al uso de los mismos; por ello, se ha comenzado el trabajo optimizando su síntesis y caracterización.

A lo largo de la investigación, se han sintetizado dos réplicas de MIP para cada azúcar de interés: lactosa, glucosa y galactosa. En primer lugar, se optimizó la configuración del sensor MIP frente a lactosa, en el que se probaron distintos parámetros de fabricación y de medida: método de electrodeposición, agitación durante la cronoamperometría, uso de glutaraldehído como agente reticulante y empleo de distintos eluyentes de la molécula plantilla. En segundo lugar, se obtuvo un sensor MIP para el azúcar de glucosa, sin agitación. En tercer lugar, se desarrolló el sensor MIP de galactosa fabricado sin agitación, en este sensor se comprobó el efecto de un aumento en la concentración de la molécula plantilla presente en el mismo.

En el segundo bloque, se estudiaron por voltametría cíclica los sensores MIP y NIP en los tres tipos de analitos: lactosa, glucosa y galactosa. Su comportamiento electroquímico fue evaluado mediante el empleo de AgNWs y chitosán en diferentes concentraciones.

### 5.1 Caracterización de AgNWs.

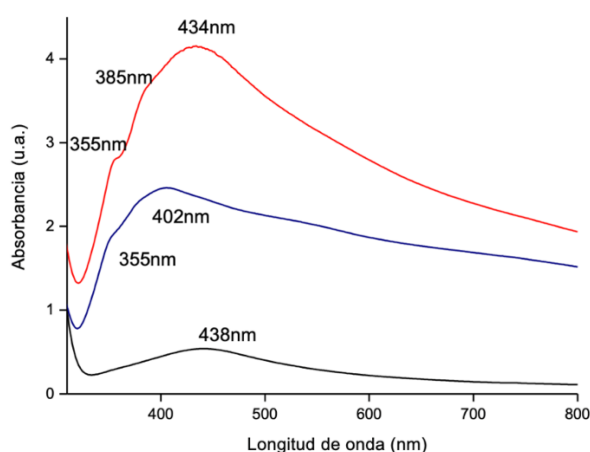
Debido a la importancia de la presencia de AgNWs en el comportamiento electroquímico del sensor, es necesario la caracterización previa de los mismos mediante el uso de distintas técnicas espectroscópicas: espectroscopía UV-VIS, AFM y DRX.

#### 5.1.1 Espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-VIS)

La espectroscopía UV-VIS se ha empleado para estudiar las propiedades ópticas de los AgNWs. Se comenzó obteniendo el espectro ultravioleta de los AgNWs sintetizados con el método poliol descrito en el apartado teórico (capítulo 2.5.2.1). Posteriormente, se lavaron con etanol y tras centrifugar y eliminar el sobrenadante (residuo que se obtiene con cada lavado) se volvió a realizar el espectro. En la **figura 34** se muestran los espectros correspondientes.

En el espectro de absorción obtenido de los AgNWs sin purificar se pueden observar las bandas correspondientes a la presencia de nanopartículas de plata (AgNPs) y AgNWs. Las dos primeras bandas se atribuyen a la presencia del plasmón de resonancia característico de los AgNWs que tienen lugar a una longitud de onda de 355 nm y 385 nm [120]. En el espectro obtenido tras la purificación, únicamente se aprecia el plasmón de resonancia de los AgNWs, por lo que la ausencia de la banda correspondiente a las AgNPs a 434 nm es un indicador de la pureza de éstos [120]. La primera banda de absorción de este espectro, representa la absorción longitudinal de los AgNWs (355 nm) y la segunda a una longitud de onda de 402 nm, se atribuye a la absorción transversal de los mismos [113], [130].

Finalmente, en el espectro correspondiente al sobrenadante se aprecia una banda de absorción a 438 nm que se atribuye a la presencia exclusiva de las AgNPs, lo que indica que el método empleado para lavar los AgNWs es adecuado [120].

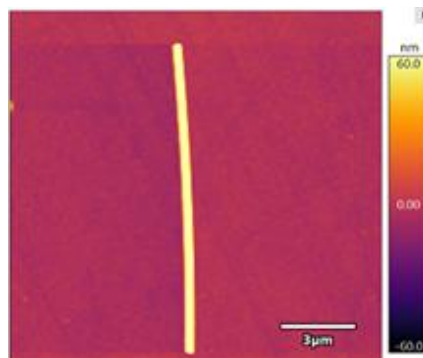


**Figura 34** Espectroscopía UV-VIS del producto obtenido de la síntesis de AgNWs sin lavar (rojo), AgNWs purificados (azul) y sobrenadante (negro).

### 5.1.2 Espectroscopía de Fuerza Atómica Molecular (AFM)

Existen una gran variedad de factores durante el proceso de fabricación de los AgNWs que pueden afectar a su morfología como son: la temperatura, el tiempo de reacción, la adición de reactivos, etc. [120], [121]. Por ello, la microscopía de fuerza atómica se ha utilizado para controlar la homogeneidad de los AgNWs obtenidos ya que proporciona imágenes de tamaño nanométrico (**figura 35**).

Las imágenes de la muestra que se obtuvieron demuestran que los AgNWs presentaban un tamaño homogéneo con un diámetro cercano a 350 nm y longitudes entorno a los 10  $\mu\text{m}$ .



*Figura 35 Fotografía obtenida mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) de una muestra de AgNWs depositada sobre un electrodo BDD.*

### 5.1.3 Difracción de rayos-X

La difracción de rayos-X se ha utilizado para caracterizar la estructura de los AgNWs, el patrón de difracción obtenido muestra que los AgNWs son nanomateriales compuestos por nanocristales orientados en diferentes planos cristalográficos [204].

De acuerdo con el patrón de difracción de los AgNWs, se muestran 5 picos de difracción (**figura 36**) correspondientes a los planos [111], [200], [220], [311] y [222] respectivamente [205]. Donde se puede apreciar una gran diferencia en la intensidad alcanzada entre ellos. El pico correspondiente al plano cristalográfico [111] que tiene lugar a  $2\theta = 38,2^\circ$  es el pico de mayor intensidad, lo que indica que los cristales que forman los AgNWs están orientados preferentemente en esta dirección cristalográfica [205], [206]. El pico de difracción que tiene lugar a  $2\theta = 44,3^\circ$  se corresponde con el plano [200] [206]. En cuanto al pico que se encuentra en  $2\theta = 64,5^\circ$  se corresponde con el plano [220] [207]. Finalmente, los picos de difracción que tienen lugar a  $2\theta = 76,8^\circ$  y  $2\theta = 81,5^\circ$  representan los planos [311] y [222], respectivamente [207].

El patrón de difracción de los AgNWs que se ha descrito se corresponde con una estructura cúbica centrada en las caras (FCC) [207]. La ausencia de picos adicionales es debida a la pureza de los AgNWs obtenidos [206].

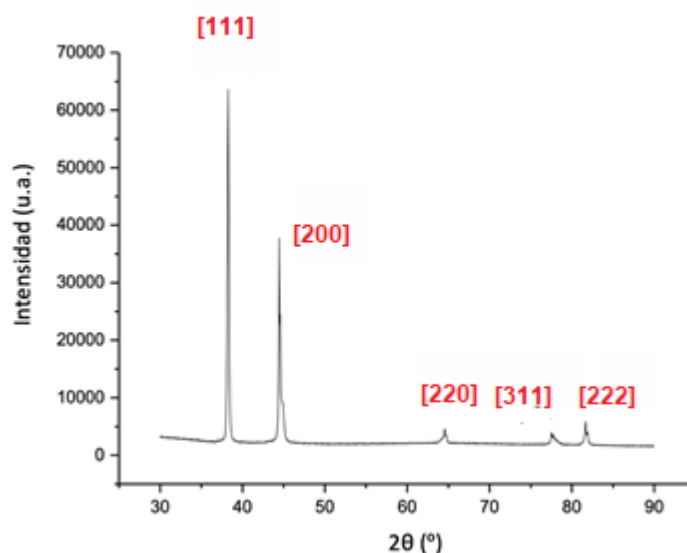


Figura 36 Patrón de difracción de rayos-X de los AgNWs.

## 5.2 Optimización de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD

Se ha llevado a cabo la fabricación de sensores electroquímicos basados en la tecnología de impresión molecular (MIP) para la detección de lactosa. Dicho sensor se ha preparado mediante la electropolimerización de chitosán modificado con AgNWs en presencia de una molécula plantilla de lactosa. Las funciones de cada uno de los constituyente que forman el sensor MIP son:

- **Chitosán:** biopolímero que se deposita sobre el electrodo BDD, su función es contener a los huecos de la molécula que se quiera detectar, además sirve de soporte de unión para los AgNWs.
- **AgNWs:** son nanoestructuras metálicas que actúan recubriendo la matriz de chitosán, sus reacciones de oxidación sirven para determinar el comportamiento electroquímico del sensor frente a la detección del azúcar de interés.



- **Lactosa:** es la molécula plantilla, su función es imprimir en la matriz de quitosán las cavidades de reconocimiento con el propósito de proporcionar al sensor MIP una mayor especificidad hacia la detección de la misma.

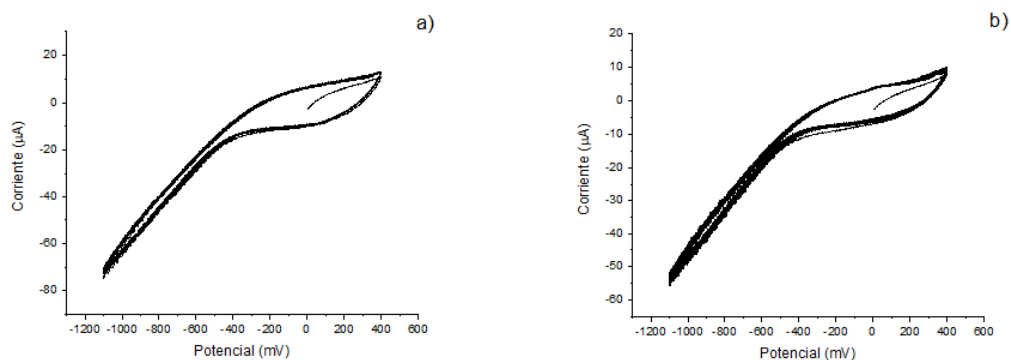
En todos los sensores (MIP) se ha trabajado con una concentración de lactosa en la solución [CHI-AgNWs] de 0,01 M y una concentración de la solución de quitosán de 1,5 mg/mL. Fijados estos parámetros, con el propósito de obtener el sensor MIP que proporcione las mejores prestaciones frente a la detección de lactosa se emplearon distintas variables de trabajo y de medida: el método de electrodeposición, la presencia de agitación o no durante la cronoamperometría, la concentración de los AgNWs en la película de quitosán, empleo de un agente reticulante y el uso de distintos eluyentes.

A lo largo del desarrollo de la investigación es de gran importancia comprobar el funcionamiento del MIP, por ello, este sensor se ha comparado con un sensor obtenido bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de la molécula de lactosa, NIP.

- **Método de electrodeposición de las disoluciones para elaborar los sensores MIP o NIP.**

El primer experimento se llevó a cabo depositando la solución que contiene la mezcla para la obtención del sensor MIP y NIP sobre la superficie del electrodo BDD a través de voltametría cíclica, parámetros de trabajo citados en el capítulo 4.

En los voltamogramas obtenidos de los sensores MIP (**figura 37 a**) y NIP (**figura 37 b**), no se aprecia ningún indicio que indique la electrodeposición de la solución sobre la superficie del electrodo BDD. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Zhang Q et al. se llevó a cabo la electrodeposición de un MIP por medio de voltametría cíclica, en cada ciclo se obtuvo una disminución en la intensidad de corriente de los picos de oxidación de los AgNWs a medida que el polímero de impresión molecular se depositaba sobre el electrodo BDD [208]. Este fenómeno no se puede apreciar en ninguna de los voltamogramas, ante este resultado en el resto del trabajo se optó por llevar a cabo la electrodeposición mediante cronoamperometría en lugar de por voltametría cíclica para los sucesivos experimentos.



**Figura 37** Electrodeposición por voltametría cíclica: a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD.

- **Cronoamperometría sin agitación**

El estudio se ha continuado con la síntesis de sensores MIP y NIP, cuyas configuraciones son: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos tienen una concentración de AgNWs de 1mg/mL en la película de quitosán, los parámetros de fabricación de ambos sensores se han indicado en el capítulo 4.

Con el propósito de llevar a cabo un estudio de la reproducibilidad se sintetizaron dos sensores de cada tipo. Para obtener la reproducibilidad de los cronoamperogramas del MIP y NIP, se calculó el coeficiente de variación (CV) tomando el valor máximo de la corriente alcanzada por cada sensor.

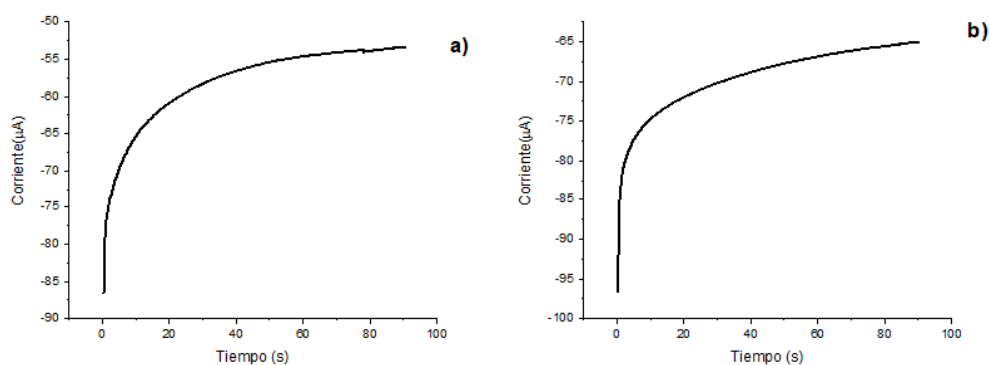
El CV o también llamado desviación estándar relativa (RSD) proporciona información sobre la dispersión de las series de datos obtenidas y se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \cdot 100$$

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}}{N} \quad (31)$$

**Ecuación 31** Cálculo del coeficiente de variación (CV) o (RSD)

Donde:  $\sigma$  es desviación estándar,  $x$  es la variable,  $N$  es el número de resultados,  $x_i$  es el valor número  $i$  de la variable  $x$ ,  $\bar{x}$  es la media de los datos obtenidos.



**Figura 38** Cronoamperograma obtenido sin agitación: a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos sensores con una concentración de AgNWs de 1mg/mL.

El CV obtenido para los cronoamperogramas del sensor MIP y NIP es del 25,77% y del 16,87% respectivamente. Ambos coeficientes indican falta de homogeneidad durante la fabricación de los sensores, lo que supone que las condiciones de trabajo durante la fabricación de los mismos no fueron buenas. Entre los motivos principales se encuentran: inmersión de los electrodos de trabajo y contraelectrodo de manera inadecuada, así como, la ausencia de agitación durante el desarrollo de los sensores.

En el cronoamperograma del MIP (**figura 38 a**) y NIP (**figura 38 b**), se pueden distinguir cada una de las fases correspondientes a la formación de la película de chitosán con el tiempo sobre el electrodo BDD. En un primer momento, tiene lugar un aumento de la intensidad de corriente debido a los procesos electroquímicos que se producen en la celda (fase I). El codo de curvatura representa la fase II, cuando se produce la polimerización del chitosán sobre la superficie del electrodo BDD, para ello se aplica un potencial de -1,1 V. A este potencial, el chitosán se vuelve insoluble debido a los cambios de pH que tienen lugar en la proximidad de la superficie del electrodo, estos cambios son provocados por la desprotonación de los grupos  $\text{NH}_3^+$  de la estructura química del chitosán por los grupos  $\text{OH}^-$  que hay en la solución [198], [209]. En la cronoamperometría de ambos sensores, se puede apreciar un proceso de nucleación costoso, debido posiblemente a la falta de agitación durante la electrodeposición, que da lugar a un proceso de difusión en estado transitorio. Debido a la ausencia de agitación, la concentración de las especies no se mantiene constante en la solución por lo que la capa difusiva ( $\delta$ ) va adquiriendo un mayor grosor. Este hecho dificulta la difusión de las especies hasta la superficie del electrodo con el transcurso del tiempo [182]. En la fase III, se muestra el crecimiento de la película polimérica sobre el electrodo BDD, al finalizar este proceso se distingue una caída en la intensidad de corriente

desde un valor de 65  $\mu\text{A}$  en el NIP hasta un valor de 54  $\mu\text{A}$  en el MIP. La disminución de la intensidad se debe a la presencia del azúcar durante la polimerización del chitosán, el cual dificulta la difusión de las especies a su través [186].

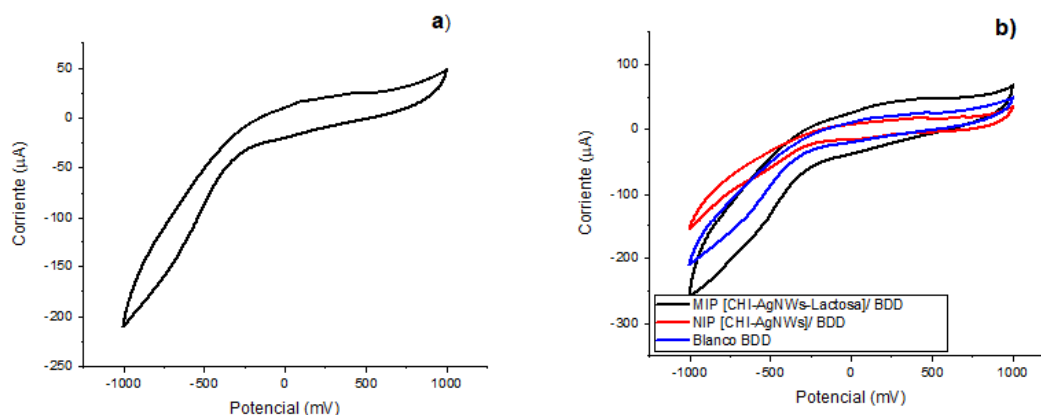
Para estudiar el efecto selectivo de la plantilla polimérica en el MIP y el comportamiento de los AgNWs en la película de chitosán, se obtuvieron las respuestas voltamétricas correspondientes a un electrodo BDD en blanco y a los sensores, MIP y NIP. El blanco se elaboró mediante voltametría cíclica a través de su inmersión en una solución de lactosa  $10^{-4}$  M en buffer fosfato (PBP) de concentración 0,01 M y pH 7,4, aplicando un potencial de -1 V a 1 V con una velocidad de barrido de 100 mV/s. El resultado obtenido se muestra en la **figura 39 a**, donde no se observa ningún pico de oxidación-reducción debido a que la lactosa no presenta actividad electroquímica. La respuesta electroquímica de los sensores MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD se obtuvo mediante su inmersión en una solución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de concentración 0,01 M y pH 7,4 estableciendo los parámetros de medida y siguiendo el proceso de detección explicados en el capítulo 4.

En el resultado obtenido de la voltametría cíclica, **figura 39 b**, se puede apreciar como el MIP proporciona una mayor intensidad de señal respecto del NIP y el electrodo BDD blanco. Este hecho se atribuye a la creación de cavidades específicas en la matriz de chitosán con una forma y tamaño que son complementarios a las moléculas de lactosa; gracias a esta plantilla se consigue una gran especificidad durante la detección ya que las moléculas se enlazan fácilmente a los huecos creados [64]. Como resultado de la síntesis de la plantilla polimérica, se consigue un sensor que ofrece un mejor comportamiento electroquímico frente a la detección de lactosa y, por ende, es capaz de proporcionar una mayor intensidad de señal en comparación al sensor NIP.

Por otro lado, en este experimento no se pudieron distinguir los picos anódicos de las reacciones de oxidación de los AgNWs; el resultado desfavorable puede deberse a las siguientes razones:

- La ausencia de agitación durante la electropolimerización sobre el electrodo BDD podría suponer que la cantidad de AgNWs depositados en el sensor es inferior a la deseada.

- La concentración de AgNWs (1 mg/mL) en la película de chitosán es insuficiente.



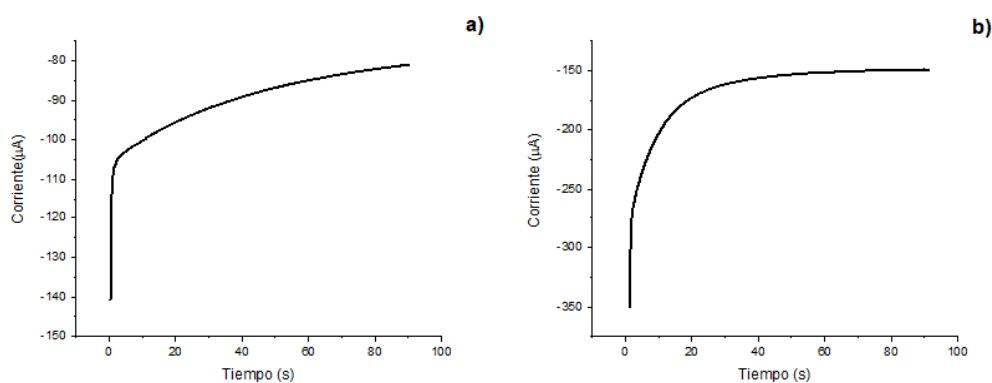
**Figura 39** a) Voltamograma de un electrodo BDD en blanco en una disolución de lactosa  $10^{-4}$ M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01M. b) Respuesta voltamétrica en una disolución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD (negro) con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL, NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo ) con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL y un electrodo BDD blanco (azul).

El estudio de la reproducibilidad se llevó a cabo mediante la fabricación de dos sensores MIP y NIP de cada tipo a través de voltametría cíclica aplicando un potencial de -1 V a 1 V con una velocidad de barrido de 100 mV/s, mediante la inmersión de los sensores en una disolución de lactosa de concentración  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M. El criterio empleado para su obtención fue el cálculo del CV.

La reproducibilidad obtenida, tanto para el MIP como para el NIP, es muy baja siendo ésta de un 18,73% y de un 37,82% respectivamente. La razón de la mala reproducibilidad en el MIP podría atribuirse a la falta de homogeneidad durante la formación de la plantilla polimérica sobre el electrodo BDD, puesto que es un fenómeno que puede afectar a los sensores basados en la tecnología de impresión molecular [210]. Sin embargo, la baja reproducibilidad del NIP indica que las condiciones en las que se llevaron a cabo la fabricación o la medición de los sensores no fueron las adecuadas, siendo una posible razón la falta de agitación durante el proceso de fabricación de ambos.

A pesar del buen funcionamiento del MIP, no se pudieron apreciar los picos correspondientes a las reacciones de oxidación de los AgNWs presentes en la película de chitosán, por lo que la investigación se continuó incrementando la concentración de éstos en un valor de 5 mg/mL.

La fabricación de sensores, MIP y NIP, con una concentración de AgNWs en la película de quitosán de 5 mg/mL se realizó por cronoamperometría estableciendo los parámetros de trabajo indicados en el capítulo 4. Tal y como se muestra en la **figura 40 a y b**, donde se representan los cronoamperogramas de los sensores MIP y NIP respectivamente. En ellos se pueden distinguir las 3 fases correspondientes al proceso de electrodeposición del quitosán sobre el electrodo. De nuevo, en el MIP se observa un proceso de nucleación más costoso en comparación al NIP, así como una caída de la corriente desde un valor de 150  $\mu\text{A}$  alcanzado por el NIP hasta una intensidad de 80  $\mu\text{A}$  en el MIP. La razón de ambos fenómenos se atribuye a una mayor dificultad en el proceso de difusión, tal y como se explicaba para la misma configuración del sensor, pero con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL en la película de quitosán.



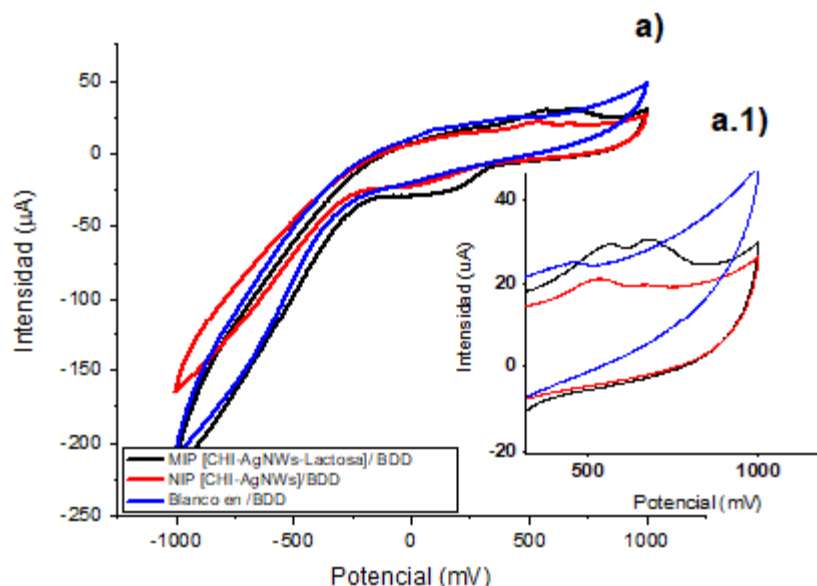
**Figura 40** Cronoamperograma obtenido sin agitación: a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos sensores con una concentración de AgNWs de 5mg/ml.

Como en el anterior sensor, para estudiar la reproducibilidad del MIP y NIP, se han sintetizado dos sensores de cada tipo, el CV obtenido para ambos cronoamperogramas es del 26% y del 9,56% respectivamente. Los CV obtenidos son bajos, las razones por las que esto podía ocurrir se indicaron en la anterior configuración del sensor de una concentración de AgNWs de 1 mg/mL.

El funcionamiento electroquímico del sensor MIP se ha estudiado a través de voltametría cíclica en una solución de lactosa  $10^{-4} M$  en PBP de concentración 0,01 M y pH 7,4. Su respuesta voltamétrica se ha comparado con la obtenida por un sensor NIP y un electrodo BDD blanco, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para la anterior configuración del sensor, en concentración de AgNWs de 1 mg/mL. En el voltamograma, **figura 41 a**, se puede comprobar que el MIP presenta una mayor intensidad que el NIP en la detección frente a lactosa, lo cual indica la formación de las cavidades de

reconocimiento en la matriz de quitosán que aportan especificidad al sensor MIP frente a la detección de este azúcar [211], tal y como se ha explicado anteriormente.

Por otro lado, los resultados obtenidos demuestran que a una concentración de AgNWs de 5 mg/mL es posible distinguir los procesos correspondientes a las reacciones de oxidación de los mismos. El primer pico anódico (515,28 mV) se corresponde con el proceso de oxidación de la plata (Ag) al estado de oxidación +1 ( $Ag^{+1}$ ) y el segundo pico anódico (678,86 mV) se corresponde con la oxidación de la plata de su estado elemental ( $Ag^0$ ), al estado de oxidación +2 ( $Ag^{2+}$ ). El estado de oxidación de la plata  $Ag^{2+}$  es menos común, sin embargo cuando se alcanzan potenciales superiores a 0,40 V se puede apreciar [212].



**Figura 41 a)** Respuesta voltamétrica en una disolución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD (negro) con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL, NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo) con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL y de un electrodo BDD blanco (azul). a.1) detalle de los picos anódicos de los sensores MIP, NIP correspondientes.

Para calcular la reproducibilidad, se siguieron los mismos pasos que se han empleado para el sensor que presenta la misma configuración a una concentración de AgNWs de 1 mg/mL. De la misma forma, el criterio empleado fue el cálculo del CV tomando como referencia el pico anódico de mayor intensidad ( $Ag^{2+}$ ), en estas condiciones se obtuvieron valores de reproducibilidad del 28,61% y del 16,65% para el MIP y NIP respectivamente.

A pesar del buen funcionamiento del MIP en las configuraciones descritas, se aprecia una falta de reproducibilidad importante cuyo valor se encuentra por encima del 5%. Con el propósito de mejorar la reproducibilidad de ambos sensores se modificó un nuevo parámetro durante el proceso de fabricación del sensor. Por lo que en los experimentos siguientes se sintetizaron sensores MIP y NIP en presencia de agitación durante la cronoamperometría.

- ***Cronoamperometría con agitación***

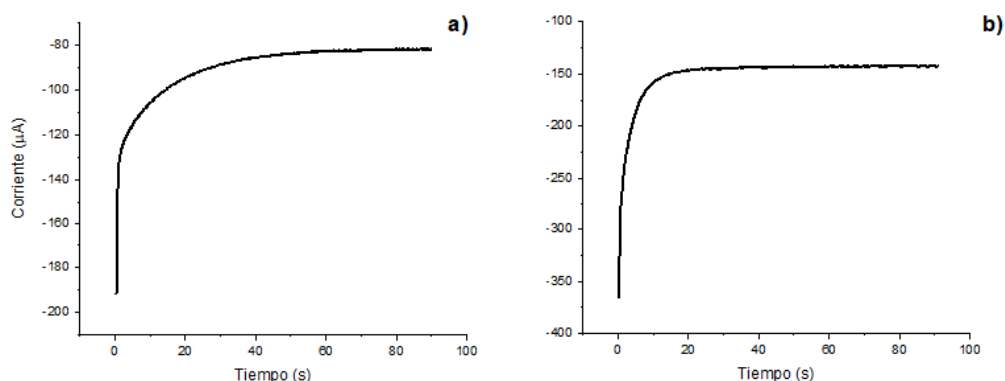
Los experimentos relativos al desarrollo de sensores frente a la detección óptima de lactosa se continuaron mediante la elaboración de sensores MIP y NIP con la siguiente configuración: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD, ambos con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL en la película de chitosán. Su síntesis se llevó a cabo por cronoamperometría en presencia de agitación fijando los parámetros de trabajo indicados en el capítulo 4.

Tal y como sucedía en los anteriores sensores, en el MIP (**figura 42 a**) se aprecia un proceso de nucleación más costoso en comparación al NIP (**figura 42 b**); así como una caída en la intensidad de corriente hasta a un valor de 80  $\mu$ A respecto a la intensidad de 150  $\mu$ A alcanzada por el NIP.

A pesar de ello, se encuentran importantes diferencias entre los cronoamperogramas de los sensores MIP (**figura 40 a**) y NIP (**figura 40 b**) obtenidos por cronoamperometría sin agitación, a la misma concentración de AgNWs que se han descrito en el anterior punto.

En la cronoamperometría sin agitación, la nucleación del chitosán se producía con una mayor dificultad siendo el proceso más lento en este caso, lo cual es un indicador de que el factor de agitación facilita la electrodeposición del chitosán modificado con AgNWs sobre la superficie del electrodo BDD. Como se ha indicado anteriormente (capítulo 2.6.1.2), la cronoamperometría en presencia de agitación da lugar a un fenómeno de convección de las moléculas que se encuentran en la solución, lo que hace que el espesor de la capa difusiva se mantenga constante en todo el tiempo en que dura el pulso de potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. Al contrario de lo que sucede en la cronoamperometría sin agitación, donde el espesor de la capa difusiva aumenta con el paso del tiempo [182].

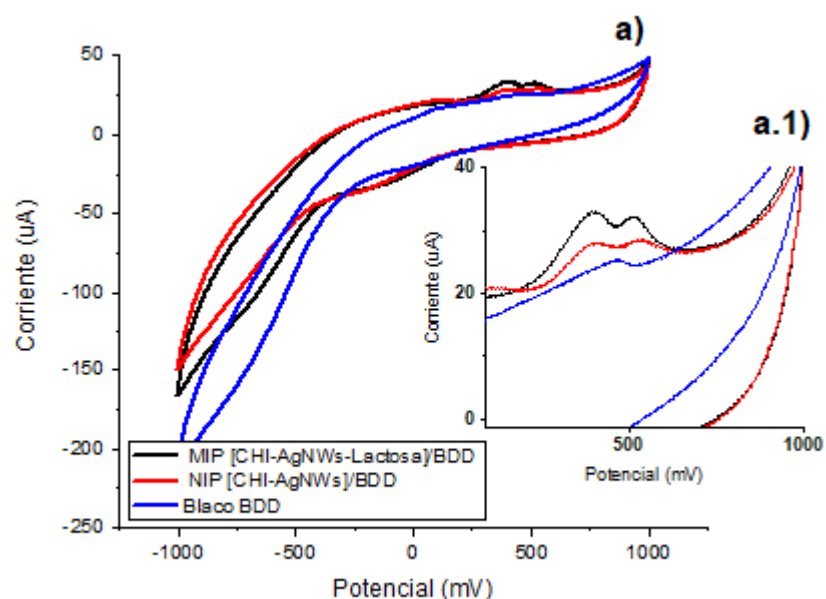




**Figura 42** Cronoamperograma obtenido en presencia de agitación de un: a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y un b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos sensores con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL.

Con el propósito de llevar a cabo un estudio de la reproducibilidad se obtuvieron dos sensores MIP y NIP de cada tipo, cuyos cronoamperogramas presentaron un CV (calculado con el mismo criterio que en los anteriores sensores descritos) del 11,1% y del 6,87%, respectivamente. En este caso, los valores del CV indican que las condiciones de trabajo con las que se fabricaron ambos sensores contribuyeron a mejorar la reproducibilidad de los cronoamperogramas.

El estudio del comportamiento electroquímico del sensor MIP frente a la detección de lactosa se ha realizado mediante voltametría cíclica estableciendo los parámetros de trabajo y el mecanismo de detección indicados en el capítulo 4. Para ello, se ha comparado la respuesta voltamétrica del MIP con la del NIP y un electrodo BDD blanco, cuya voltametría se ha realizado siguiendo el mismo procedimiento que se ha explicado para las anteriores configuraciones del sensor de lactosa. En el voltamograma obtenido, **figura 43 a**, se puede observar que el sensor MIP proporciona una intensidad de corriente superior al NIP lo que es un indicador de la correcta formación de la plantilla polimérica de lactosa en la matriz de quitosán, siendo ésta la responsable de que el MIP tenga una mayor especificidad frente a la detección de dicho analito. Por otro lado, se pueden distinguir los picos de las reacciones de oxidación de los AgNWs, el primer pico se corresponde con el estado de oxidación de la plata  $\text{Ag}^{+1}$  producido a un potencial de 398,99 mV y el segundo pico que tiene lugar a un potencial de 510,15 mV se corresponde con el estado de oxidación de la plata  $\text{Ag}^{2+}$  [212].



**Figura 43** a) Respuesta voltamétrica en una disolución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD (negro) con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL, NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo) con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL y de un electrodo BDD blanco (azul). a.1) detalle de los picos anódicos de los sensores MIP, NIP correspondientes obtenidos en presencia de agitación.

Para comprobar el efecto de la agitación en la respuesta voltamétrica, se ha comparado el sensor MIP descrito en este apartado con el sensor MIP que presenta la misma concentración de AgNWs (5 mg/mL), fabricado sin agitación, cuyo funcionamiento se explicó en el apartado cronamperometría sin agitación. En la **tabla 1**, donde se comparan los valores de los potenciales obtenidos entre ambos sensores, se puede observar que el potencial necesario para que tengan lugar las reacciones de oxidación de los AgNWs son inferiores en el sensor sintetizado bajo cronamperometría en presencia de agitación. Esta disminución en el potencial indica una mejora en el comportamiento electroquímico del sensor MIP, ya que es necesario un menor potencial para que tengan lugar las reacciones de oxidación de los AgNWs. En la **tabla 2**, se muestran los valores de la intensidad de corriente alcanzados por ambos sensores, donde se distingue un aumento en la intensidad de corriente en el sensor MIP obtenido por cronamperometría en presencia de agitación lo que indica una mejora en la actividad electroquímica del mismo. Con estos resultados se puede concluir, que la introducción de agitación afecta positivamente al funcionamiento electroquímico del sensor MIP.

**Tabla 1** Potencial (mV) correspondiente a las reacciones de oxidación de los AgNWs de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD con 5 mg/mL de AgNWs. Obtenido con agitación y sin agitación durante la cronoamperometría.

	MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD	
Pico anódico\ Parámetros fabricación	Potencial con agitación	Potencial sin agitación
(Ag <sup>+</sup> )	398,99	515,28
(Ag <sup>2+</sup> )	510,15	678,86

**Tabla 2** Intensidad de corriente (μA) correspondiente a las reacciones de oxidación de los AgNWs de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD con 5 mg/mL de AgNWs. Obtenido con agitación y sin agitación durante la cronoamperometría.

	MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD	
Pico anódico\ Parámetros de obtención	Intensidad de corriente con agitación	Intensidad de corriente sin agitación
(Ag <sup>+</sup> )	34	21,10
(Ag <sup>2+</sup> )	33,27	30,7

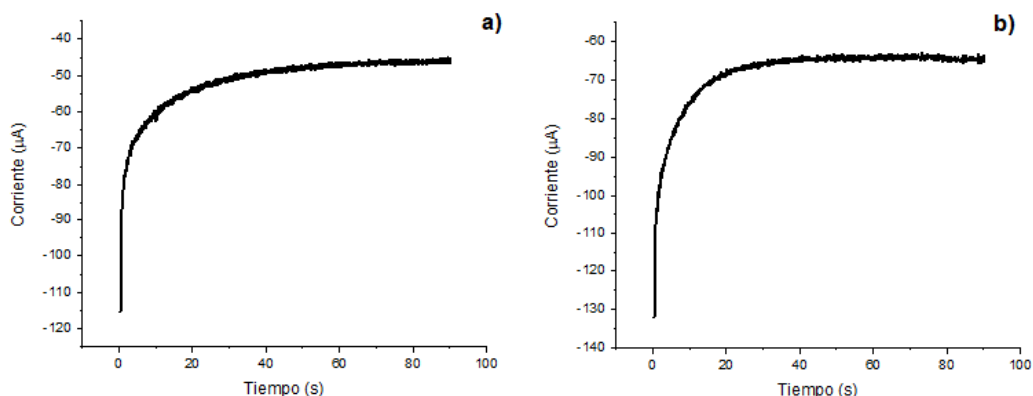
Finalmente, se realizó un estudio de la reproducibilidad sintetizando dos sensores MIP y NIP de cada tipo a través de voltametría cíclica en una solución de lactosa  $10^{-4}M$  siguiendo el mismo procedimiento que se ha indicado en las anteriores configuraciones. Para ello, se utilizó el cálculo del CV tomando como referencia la intensidad de corriente alcanzada por el pico anódico  $Ag^{2+}$ . Se obtuvo una reproducibilidad de un 1,41% para el NIP y un 12,75% para el MIP, como se aprecia, el NIP presentó una reproducibilidad significativamente superior. El motivo de esta diferencia puede estar asociado a la falta de homogeneidad durante la formación de la plantilla polimérica sobre el electrodo BDD, como se ha indicado anteriormente, dicho fenómeno es posible que afecte a los sensores basados en la tecnología de impresión molecular [210].

En la **tabla 3** se han comparado los valores de reproducibilidad de los sensores obtenidos con y sin agitación, donde se aprecia una reproducibilidad notablemente superior en los sensores MIP y NIP sintetizados por cronoamperometría en presencia de agitación. En vista a estos resultados se puede concluir que la presencia de agitación durante la obtención de los sensores contribuye a obtener una respuesta más reproducible.

**Tabla 3** CV (%) de los sensores MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs] con 5 mg/mL de AgNWs. Obtenidos con agitación y sin agitación durante la cronoamperometría.

Electrodeposición\ Sensores	CV con agitación	CV sin agitación
MIP	12,75	28,61
NIP	1,41	16,65

Con el propósito de conseguir un aumento en el valor de la intensidad de corriente alcanzado por el sensor MIP frente a la detección de lactosa, la investigación se continuó incrementando la concentración de AgNWs en la película de chitosán a una concentración de 10 mg/mL. La fabricación de este sensor se llevó a cabo mediante cronoamperometría fijando los parámetros de trabajo indicados en el capítulo 4.



**Figura 44** Cronoamperograma obtenido en presencia de agitación de un: a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos sensores con una concentración de AgNWs de 10 mg/mL.

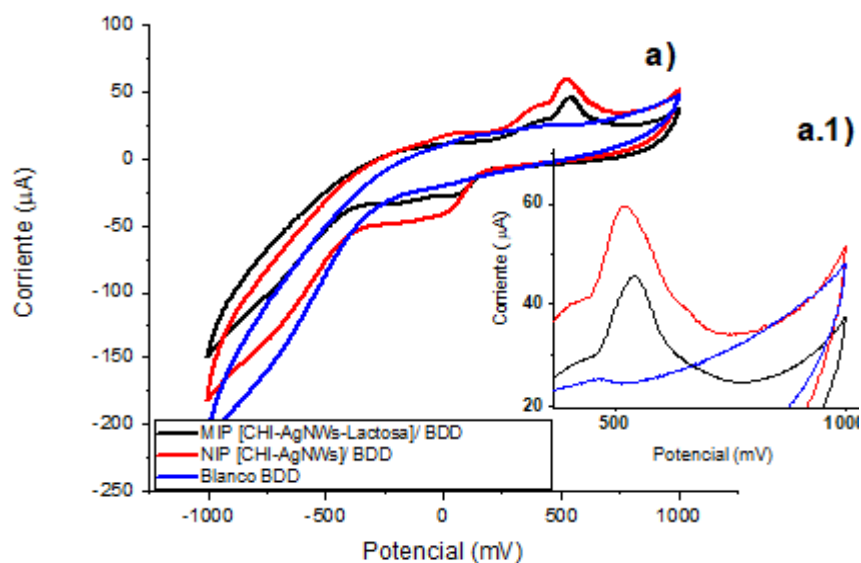
Como en el resto de las configuraciones, se han sintetizado dos sensores de cada tipo, cuyos cronoamperogramas mostraron un CV del 11,78% y del 4,55% para el MIP (**figura 44 a**) y NIP (**figura 44 b**), respectivamente. Estos valores indican una menor homogeneidad en la fabricación del sensor MIP atribuible a una mayor dificultad durante el proceso de fabricación del mismo.

Tal y como se observa, la polimerización del chitosán en presencia de los AgNWs y de la molécula plantilla de lactosa (**figura 44 a**) tiene lugar con una mayor dificultad en comparación al NIP (**figura 44 b**). Además, en el MIP se alcanza una intensidad de corriente de 50 µA y en el NIP, un valor igual a 75 µA. Ambos fenómenos se han producido y explicado en el resto de las configuraciones desarrolladas en el presente trabajo.

El comportamiento electroquímico del sensor MIP se ha evaluado comparando su respuesta voltamétrica con la obtenida por el NIP y un electrodo BDD blanco (**figura 45 a**). El protocolo seguido para la obtención de los voltamogramas del MIP, NIP y el blanco es el mismo que el que se ha descrito para el resto de las configuraciones.

La respuesta voltamétrica proporcionada por el MIP no fue la adecuada e indicó un mal funcionamiento por parte de este sensor frente a la detección de lactosa (**figura 45 b**). Es decir, la intensidad de corriente de este sensor es inferior a la proporcionada por el NIP, lo cual no debería suceder ya que el MIP debe ofrecer una mayor intensidad de señal. Este resultado indicó que la plantilla de lactosa no se sintetizó correctamente en la matriz de chitosán. La razón del mal funcionamiento del sensor MIP puede estar asociada a la elevada concentración de AgNWs que se utilizó durante la electrodeposición, lo que provocó que el chitosán no polimerizase bien sobre la superficie del electrodo, en consecuencia, la plantilla de lactosa no se formó adecuadamente en la matriz polimérica.

Por otro lado, además de apreciar los picos anódicos correspondientes a los estados de oxidación de los AgNWs a esta concentración, también, es posible apreciar los picos catódicos que se corresponden con las reacciones de reducción reversibles de la plata (del estado de oxidación  $\text{Ag}^{2+}$  al estado elemental  $\text{Ag}^0$ ) producidas a un potencial de 40,47 mV y 181,3 mV [212] (**figura 45 a**).



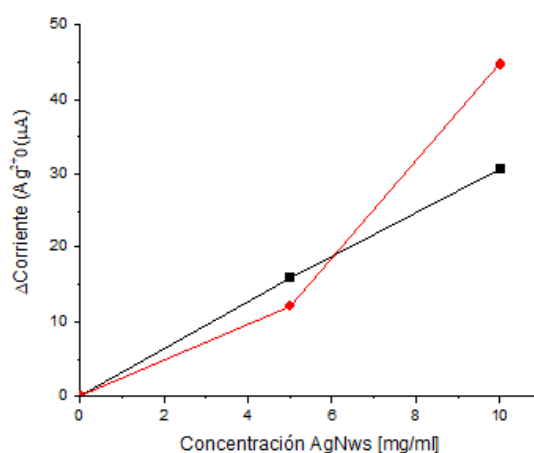
**Figura 45 a)** Respuesta voltamétrica en una disolución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD (negro) con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL, NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo) con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL y de un electrodo BDD blanco (azul). a.1) detalle de los picos anódicos de los sensores MIP, NIP correspondientes.

Para estudiar el efecto en el aumento de concentración de los AgNWs en la matriz de quitosán, en la **tabla 4**, se muestra una comparativa con el sensor que tiene la misma configuración, en una concentración de AgNWs de 5 mg/mL y que se ha descrito en este mismo punto. Los valores indican un aumento en la intensidad de corriente del pico anódico  $\text{Ag}^{2+}$  en el MIP y NIP, de un valor del 1,31 y del 2,11, respectivamente. Estos resultados demuestran que la intensidad proporcionada por los AgNWs aumenta con su concentración en la película de quitosán, tal y como se observa en la **figura 46**.

Cabe mencionar que la comparación entre concentraciones (1mg/mL y 5 mg/mL) en el anterior punto no se realizó puesto que carecía de interés al no poderse apreciar los picos anódicos de los AgNWs en el sensor que presentaba una concentración de éstos en 1mg/mL en la película de quitosán.

**Tabla 4** Intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) correspondiente a las reacciones de oxidación de los AgNWs de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos con una concentración de AgNWs 5 y 10 mg/mL.

Pico anódico\ Concentración de AgNWs	MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD		NIP [CHI-AgNWs]/BDD	
	Intensidad de corriente (5 mg/mL)	Intensidad de corriente (10 mg/mL)	Intensidad de corriente (5 mg/mL)	Intensidad de corriente (10 mg/mL)
( $\text{Ag}^{2+}$ )	33,27	43,61	28,98	61,28



**Figura 46** Intensidad del pico anódico  $\text{Ag}^{2+}$  de los sensores MIP (negro), NIP (rojo) inmersos en una solución de lactosa en PBP de concentración 0,01 M y pH 7,4. Se representa un aumento de la concentración de AgNWs en la película de quitosán (0, 5, 10 mg/mL).

En cuanto al estudio de la reproducibilidad, se sintetizaron dos sensores de cada tipo MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD, NIP [CHI-AgNWs]/BDD, el criterio empleado para su cálculo se realizó bajo las mismas condiciones que se han descrito para el resto de los sensores. El CV obtenido para el MIP y NIP fue del 23% y del 18,4% respectivamente. El empeoramiento de la reproducibilidad (respecto de la anterior configuración que presentaba una concentración de AgNWs de 5 mg/mL) indica que las condiciones en las que se fabricaron los sensores no fueron las adecuadas, siendo una posible causa la elevada concentración de AgNWs (10 mg/mL) en la película de quitosán que se empleó para la construcción del sensor.

- **Agente reticulante: glutaraldehído**

La utilización de agentes reticulantes en la síntesis de polímeros de impresión molecular es muy frecuente ya que estos influyen directamente en la morfología de los MIP, en su estabilidad y en la fijación de las cavidades de reconocimiento específico [69]. Por estas razones, en el presente trabajo se ha comprobado su efecto en los sensores MIP y NIP sometidos a vapores de glutaraldehído a través del análisis de su respuesta voltamétrica y de un estudio de la reproducibilidad de los mismos.

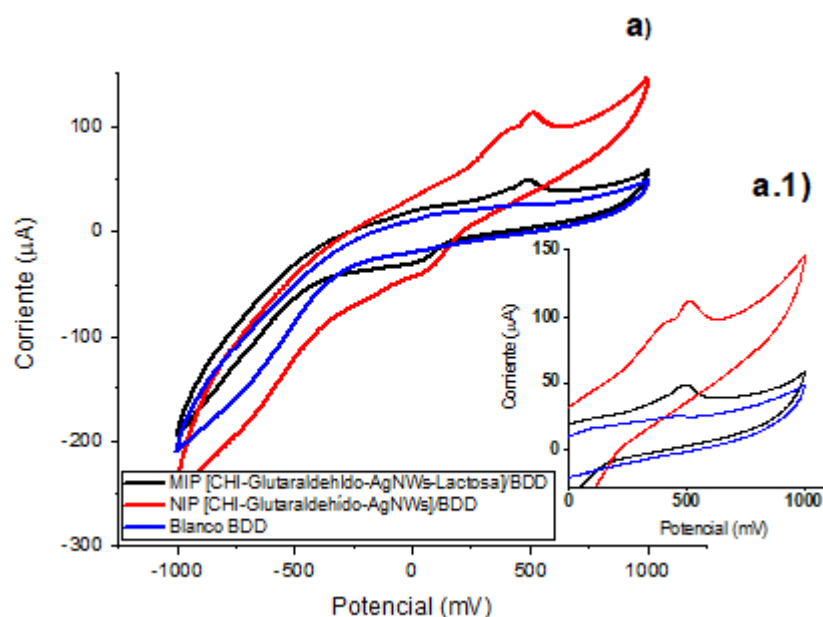
Se ha utilizado la siguiente denotación para los sensores desarrollados: MIP [CHI-Glutaraldehído-AgNWs-lactosa]/BDD y NIP [CHI-Glutaraldehído-AgNWs]/BDD

Los sensores fueron fabricados con una concentración de AgNWs de 10 mg/mL mediante cronoamperometría según los parámetros de medida que se establecieron en el capítulo 4, los cronoamperogramas obtenidos no se muestran en el presente trabajo dado que coinciden con los cronoamperogramas del sensor que presenta la misma concentración de AgNWs en ausencia de vapores de glutaraldehído (**figura 44 a y b**). Tras la cronoamperometría, los sensores MIP y NIP se introdujeron en vapores de glutaraldehído según el procedimiento indicado en el mismo capítulo.

El efecto del glutaraldehído en la respuesta voltamétrica del sensor MIP frente a la detección de lactosa se ha estudiado mediante voltametría cíclica, mediante la inmersión del sensor en una solución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de concentración 0,01 M y pH 7,4 estableciendo los parámetros de trabajo y el protocolo de medida indicados en el capítulo 4. En el voltamograma obtenido, **figura 47 a**, se compara la respuesta voltamétrica del sensor MIP con el NIP y un electrodo BDD blanco.

Tal y como se observa, la intensidad de corriente alcanzada por el pico anódico de mayor intensidad ( $\text{Ag}^{2+}$ ) es de 113,27  $\mu\text{A}$  para el NIP, mientras que para el MIP es inferior e igual a 50,31  $\mu\text{A}$ . Los valores de corriente indican un mal funcionamiento del MIP al proporcionar el otro sensor una mayor intensidad de señal (este fenómeno se ha repetido para el sensor que presentaba la misma concentración de AgNWs sin agente reticulante glutaraldehído). Como se ha explicado anteriormente, el mal funcionamiento del MIP se asocia a una posible saturación del sensor debido a la elevada concentración de AgNWs en la película de quitosán, que impide la correcta formación de la plantilla polimérica. No obstante, a pesar del mal funcionamiento del sensor frente a la detección de lactosa se consiguió incrementar notablemente la intensidad de la señal.





**Figura 47 a)** Respuesta voltamétrica en una disolución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD (negro) con una concentración de AgNWs de 10 mg/mL, NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo) con una concentración de AgNWs de 10 mg/mL y de un electrodo BDD blanco (azul). a.1) detalle de los picos anódicos de los sensores MIP, NIP correspondientes.

En la **tabla 5**, se muestran los valores de corriente alcanzados por los sensores, MIP y NIP, en presencia y ausencia de vapores de glutaraldehído, en los que se puede apreciar un incremento de la intensidad de corriente en un coeficiente del 1,15 y del 1,85, respectivamente. Estos resultados indican que la fabricación del sensor en presencia de vapores de glutaraldehído mejora la respuesta catalítica del mismo, lo cual puede estar asociado a diversas razones:

- El chitosán reticulado ayuda a mantener la rigidez de las cavidades de reconocimiento específico, contribuyendo a mantener su forma y tamaño [69].
- Aumento de la estabilidad mecánica, el número de entrecruzamientos entre el chitosán y el glutaraldehído evitan la pérdida de las cavidades de reconocimiento específico [69].

Por estas razones, el chitosán se convierte en un soporte más estable para los AgNWs lo cual se produce gracias a la unión entre los grupos -COOH de los extremos de la molécula del glutaraldehído con los grupos -NH<sub>2</sub> del chitosán dando lugar a un enlace imina muy resistente (-C=NH-) [93].

**Tabla 5** Intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) correspondiente a las reacciones de oxidación de los AgNWs de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD, MIP [CHI-Glutaraldehído-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD, NIP [CHI-Glutaraldehído-AgNWs]/BDD con una concentración de AgNWs de 10 mg/mL.

Configuración \ Pico anódico	MIP	MIP	NIP	NIP
	[CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD	[CHI-Glutaraldehído-AgNWs-Lactosa]/BDD	[CHI-AgNWs]/BDD	[CHI-Glutaraldehído-AgNWs]/BDD
	Intensidad de corriente	Intensidad de corriente	Intensidad de corriente	Intensidad de corriente
(Ag <sup>2+</sup> )	43,61	50,31	61,28	113,27

Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio del sometimiento de los sensores a vapores de glutaraldehído. Para ello se sintetizaron dos sensores MIP [CHI-Glutaraldehído-AgNws-lactosa]/BDD, NIP [CHI-Glutaraldehído-AgNWs]/BDD de cada tipo siguiendo el mismo procedimiento que en los anteriores sensores descritos. El CV se ha calculado bajo el mismo criterio, obteniendo un valor para el MIP del 8,37% y del NIP de 13,64% respectivamente. Mientras que las mismas configuraciones del sensor, pero sin sometimiento a vapores de glutaraldehído, muestran una reproducibilidad muy mala con un CV del 23% y del 18,4% respectivamente.

Los resultados indican que bajo los parámetros en los que fueron fabricados ambos sensores los vapores de glutaraldehído mejoran significativamente su reproducibilidad, lo cual está asociado a una mayor estabilidad mecánica de la plantilla polimérica de chitosán así como de los AgNWs que lo recubren [69].

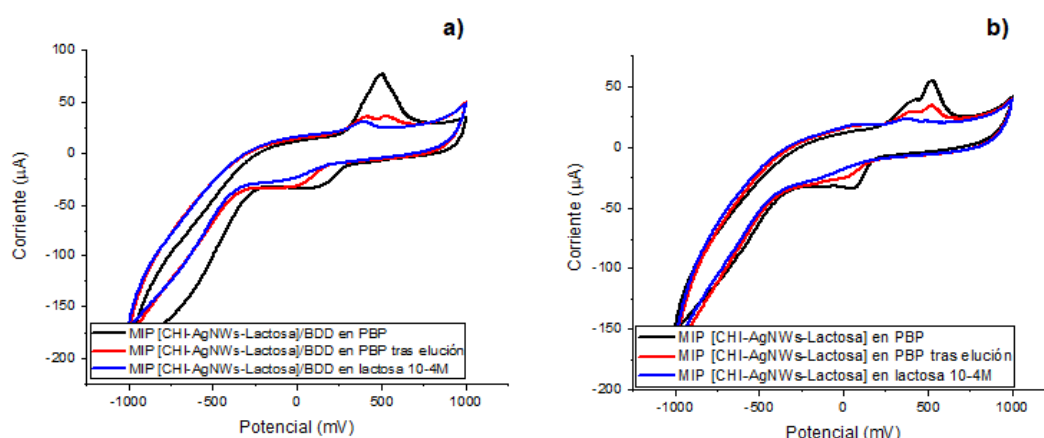
- **Selección del agente eluyente.**

El eluyente empleado para eliminar la molécula plantilla de la matriz de chitosán no debe afectar a su rigidez y estabilidad [69]. Por ello, con objeto de seleccionar el disolvente que proporcionase los mejores resultados, se ha estudiado la respuesta voltamétrica del MIP frente a dos eluyentes distintos: KCl 0,1 M y agua desionizada Milli Q. Para la selección de ambos, se ha tenido en cuenta la solubilidad del chitosán y de la lactosa en ambos eluyentes.

El chitosán es un polímero catiónico soluble en ácidos diluidos (ácido acético, ácido nítrico, ácido clorhídrico, entre otros), sin embargo es insoluble en medios con pH superiores a 6,5 (agua, disoluciones básicas o en disolventes

orgánicos), por lo que el empleo de agua desionizada Milli Q. o KCl no debería de afectar a la solubilidad de la película de chitosán en ambos eluyentes [191]. La lactosa es un azúcar soluble en disolución acuosa, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del azúcar y el hidrógeno del agua, por lo que es soluble en ambos tipos de disolventes [213].

El protocolo de medición empleado para la detección de lactosa es el descrito en el capítulo 4. Tras el proceso de elución llevado a cabo con KCl (**figura 48 a**) y agua desionizada Milli Q. (**figura 48 b**) se observa que ambos sensores MIP proporcionan una disminución en la intensidad de corriente en el mismo grado. Tras estos resultados, se concluye que no hay cambios al utilizar un eluyente u otro puesto que ambos afectan de la misma manera a la respuesta voltamétrica del sensor.



**Figura 48** a) Respuesta voltamétrica MIP {CHI-AgNWs-Lactosa}/BDD en: PBP (0,01 M y pH 7,4) (negro), en PBP después de eliminar la molécula plantilla con KCl (rojo) y en una disolución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP (0,01M, pH 7,4). b) Respuesta voltamétrica MIP {CHI-AgNWs-Lactosa}/BDD en: PBP (0,01 M y pH 7,4) (negro), en PBP después de eliminar la molécula plantilla con agua desionizada Milli Q (rojo) y en una disolución de lactosa  $10^{-4}$ M en PBP (0,01M, pH 7,4).

### 5.2.1 Selección del sensor frente a la detección de lactosa

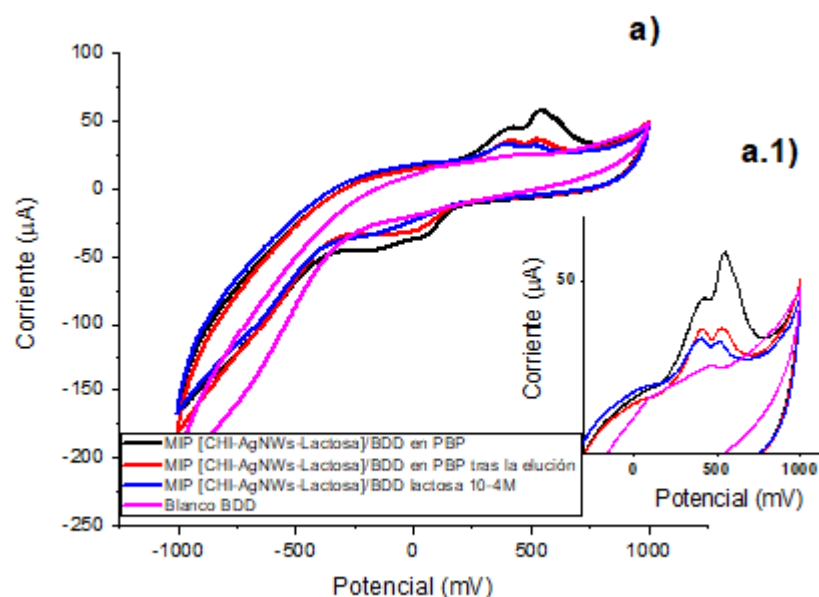
El sensor seleccionado para estudiar su comportamiento electroquímico frente a la detección de lactosa fue el MIP [CHI-AgNWs-lactosa]/BDD con una concentración de AgNWs de 5 mg/mL. Las siguientes razones fueron determinantes para elegir este sensor desarrollado por cronoamperometría en presencia de agitación.

- En el estudio llevado a cabo por voltametría cíclica el MIP demostró un mejor comportamiento con respecto al NIP (**figura 43 a**). Este resultado fue de gran importancia, ya que indicó la formación de una plantilla polimérica en la matriz de chitosán que aportaba una mayor especificidad al sensor MIP frente a la detección lactosa.
- Con esta configuración se apreciaron los picos anódicos de los AgNWs, lo que permitirá determinar el comportamiento electroquímico del sensor frente a la detección de lactosa.
- Representa el sensor MIP, que cumpliendo con las dos condiciones descritas, tiene una mayor reproducibilidad.

La fabricación del sensor se llevó a cabo por cronoamperometría tal y como se explicó en el capítulo 4, el cronoamperograma de ambos sensores MIP (**figura 42 a**) y NIP (**figura 42 b**) ya se indicó dentro de este mismo capítulo en la fabricación de sensores por cronoamperometría con agitación.

El proceso de detección llevado a cabo frente a lactosa ha sido descrito en el capítulo 4, **figura 49 a**. Tras eliminar la molécula plantilla de la matriz de chitosán con KCl (0,1 M) se forman las cavidades de reconocimiento específico, cuya estructura es complementaria a las moléculas de lactosa. Una vez obtenido el sensor, se lleva a cabo la detección en la disolución de lactosa ( $10^{-4} M$ ), durante este proceso tiene lugar la especificidad entre la plantilla polimérica y las moléculas de lactosa presentes en la solución. Con la disminución de la intensidad de los picos anódicos de los AgNWs es posible estudiar el comportamiento electroquímico del sensor frente a lactosa dado que es un fenómeno que se puede utilizar como un indicador de la presencia del azúcar en la solución.

La disminución en la intensidad de los picos anódicos de los AgNWs puede estar asociado a dos razones, en primer lugar, la lactosa presente en la solución dificulta la transferencia de electrones hasta la superficie del electrodo [84]. En segundo lugar, la disminución de la corriente puede ser provocada por el efecto denominado “gate effect”. Este fenómeno es típico en los sensores MIP y contribuye a un decremento en la intensidad de la señal causado por un cambio en la morfología de la película de chitosán al enlazarse la molécula plantilla a los sitios de unión de éste. A causa de este suceso, la capacidad de difusión de los electrones a través de la película polimérica se produce con una mayor dificultad [91].

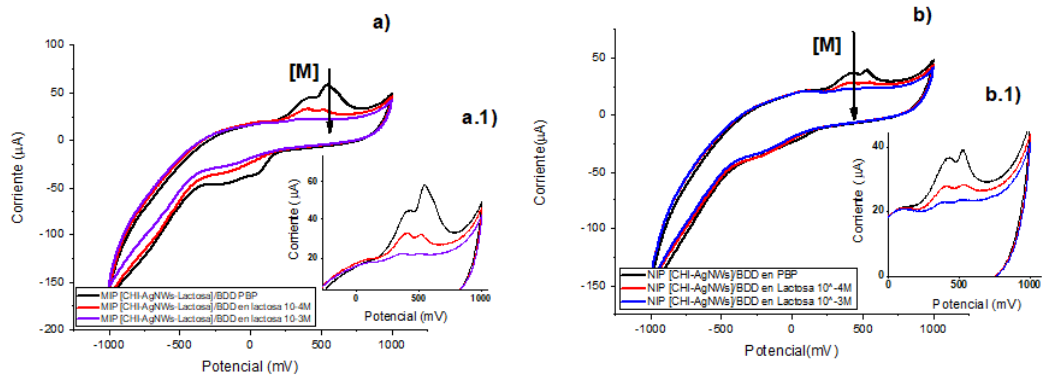


**Figura 49 a)** respuesta voltamétrica de un sensor MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD en: PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M (negro), en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M después de la elución (rojo), en una solución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01M (azul). Respuesta voltamétrica de un electrodo BDD blanco en lactosa  $10^{-4}$ M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M (rosa). a.1) Detalle de los picos anódicos

### 5.2.1.1 Estudio de la sensibilidad del sensor frente a lactosa

Para estudiar la sensibilidad del sensor frente a las moléculas de lactosa se llevaron a cabo detecciones en una solución de lactosa con una concentración  $10^{-4}$  M y  $10^{-3}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M. Aplicando un potencial de -1 V a 1 V con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

En la **figura 50 a y b**, se muestran los voltamogramas obtenidos con los sensores MIP y NIP respectivamente, donde se puede observar que la intensidad de los picos anódicos de los AgNWs disminuye al aumentar la concentración de lactosa en la solución. Como ya se ha indicado, dicho fenómeno tiene lugar en los sensores MIP que utilizan sustancias electroactivas para el reconocimiento de azúcares. La presencia del azúcar en la solución provoca el empeoramiento de la transferencia electrónica a través de la matriz de quitosán, por lo que la intensidad de la señal proporcionada por el sensor disminuye [41], [84], [212].

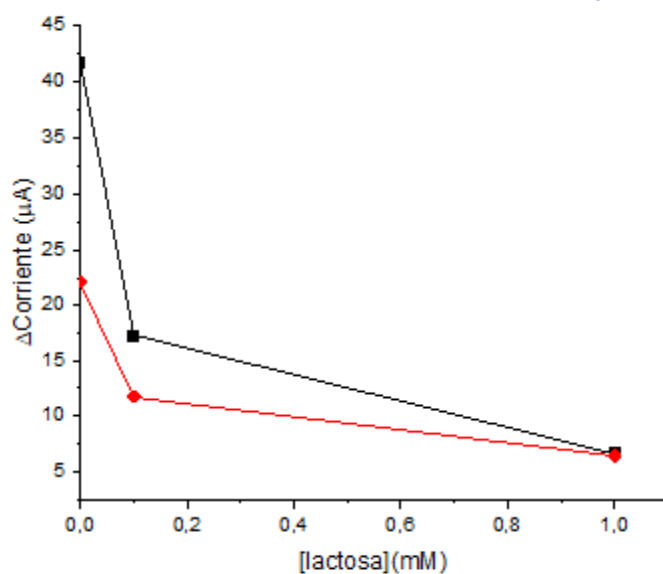


**Figura 50** Estudio de la sensibilidad de un sensor a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD en: PBp de pH 7,4 y concentración 0,01 M (negro), posteriormente en un disolución de lactosa de concentración  $10^{-4}$  M (rojo) en PBp de pH 7,4 y concentración 0,01 M y finalmente, en una disolución de lactosa de concentración  $10^{-3}$  M (azul) en PBp de pH 7,4 y concentración 0,01 M. a.1) y b.1) detalles de los picos anódicos de los sensores MIP, NIP, respectivamente.

De la representación de la intensidad del pico anódico (**figura 51**) correspondiente al estado de oxidación de la plata  $\text{Ag}^{2+}$  se obtienen dos rectas para cada uno de los sensores MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD. La ecuación correspondiente al sensor MIP para el tramo de (0 mM - 0,1 mM) es  $y = 245,6x + 41,75$ , y para el 2º tramo (0,1 mM - 1mM)  $y = -11,6x + 18,35$ . Donde “x” es la concentración de lactosa (mM) e “y” es la intensidad de señal del pico anódico ( $\mu\text{A}$ ).

De la misma forma, para el sensor NIP la ecuación para el tramo de (0 mM-0,1mM) es  $y = -104,3x + 22,18$  y para el segundo tramo (0,1 - 1mM) es la siguiente:  $y = -5,8556x + 12,336$ .

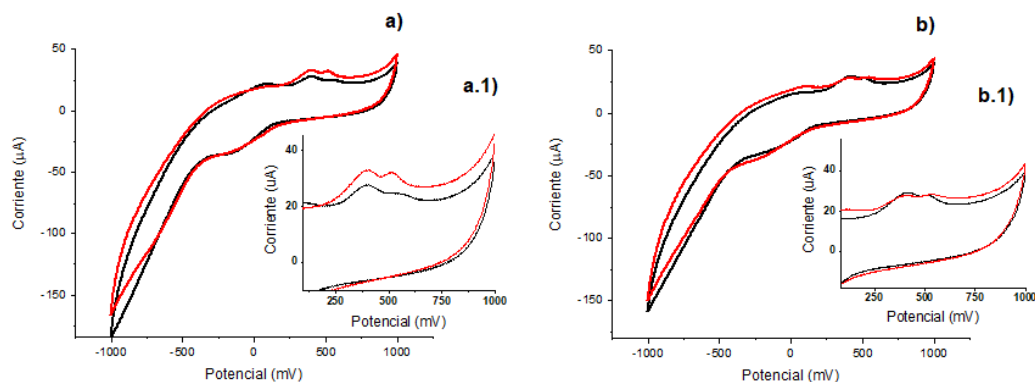
En esta representación se demuestra que a mayor concentración del azúcar menor es la intensidad de la señal proporcionada por ambos sensores (MIP y NIP). Además, la intensidad de corriente alcanzada por el sensor MIP y NIP ante la detección de lactosa entre las concentraciones 0 mM - 0,1 mM presenta un gran salto de detección. Por otro lado, cuando la detección se lleva a cabo con una concentración de lactosa entre los valores de 0,1 mM - 1 mM el salto de detección es menos brusco, es decir la caída de corriente tanto del MIP, como del NIP es más baja. Por otro lado, se aprecia que a una concentración de  $10^{-3}$  M de lactosa en la solución, el sensor MIP parece que se llega a saturar puesto que la diferencia en la intensidad de corriente alcanzada entre los sensores MIP y NIP es prácticamente despreciable. Por estas razones, se debería comprobar el funcionamiento de los sensores llevando a cabo detecciones frente a concentraciones inferiores de lactosa en la solución ( $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M, etc.).



**Figura 51** Rectas de la intensidad del pico anódico ( $Ag^{2+}$ ) de los sensores MIP [CHI-AgNWs-lactosa]/BDD (negro) y NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo) en PBP (0,01 M y pH 7,4); para un incremento de la concentración de lactosa en la solución (0; 0,1 y 1 mM)

### 5.2.1.2 Estudio de la reproducibilidad del sensor de lactosa

La reproducibilidad del MIP (12,75%), **figura 52 a**, es inferior a la del NIP (1,41%), **figura 52 b**, la diferencia de reproducibilidad entre el MIP y el NIP se debe a que los sensores basados en la tecnología de impresión molecular pueden estar afectados por una mala reproducibilidad asociada al proceso de fabricación del MIP durante la electrodeposición electroquímica [210]. Aunque como ya se ha indicado en el anterior apartado, el empleo de agentes reticulantes, como el glutaraldehído, contribuyen a la mejora de la reproducibilidad.

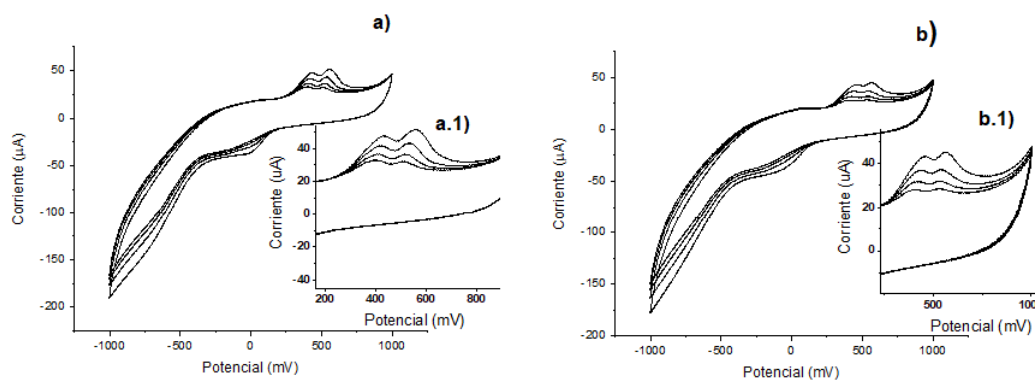


**Figura 52** Reproducibilidad mediante voltametría cíclica en lactosa  $10^{-4}$  M en PBP 7,4 y concentración 0,01 M. a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD, b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. a.1) y b.1) detalles de los picos anódicos de los sensores MIP, NIP, respectivamente.

### 5.2.1.3 Estudio de la repetitividad del sensor de lactosa

El estudio de la repetitividad del sensor (**tabla 6**) se ha llevado a cabo utilizando voltametría cíclica en una disolución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M mediante 5 ciclos consecutivos, potencial de -1 V a 1 V y una velocidad de barrido de 100 mV/s. El criterio empleado para calcular la repetitividad del sensor es el CV obtenido del valor de intensidad del pico anódico  $\text{Ag}^{2+}$  de los 4 últimos ciclos.

La repetitividad del MIP (**figura 53 a**) calculada es del 12,51% y la del NIP (**figura 53 b**) es del 18,78% estos resultados demuestran una mala repetitividad, que puede estar asociada a dos factores: la pérdida de AgNWs en la superficie del chitosán con cada ciclo y al deterioramiento de la película de chitosán lo que implicaría la pérdida en la intensidad de la señal.



**Figura 53** Repetitividad mediante voltametría cíclica en una solución de lactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M. a) MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD, b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. a.1) y b.1) detalles de los picos anódicos de los sensores MIP, NIP, respectivamente.



**Tabla 6** Estudio de la repetitividad a través de la intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) de un sensor: MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD con una concentración de AgNWs de 5mg/mL.

Ciclo\ Configuración	MIP	NIP
	[CHI-AgNWs- Lactosa]/BDD	[CHI-AgNWs]/BDD
	Intensidad de corriente	Intensidad de corriente
2	50,38	44,57
3	42,57	37,33
4	37	33
5	33,27	28,98
CV (%)	12,51	18,78

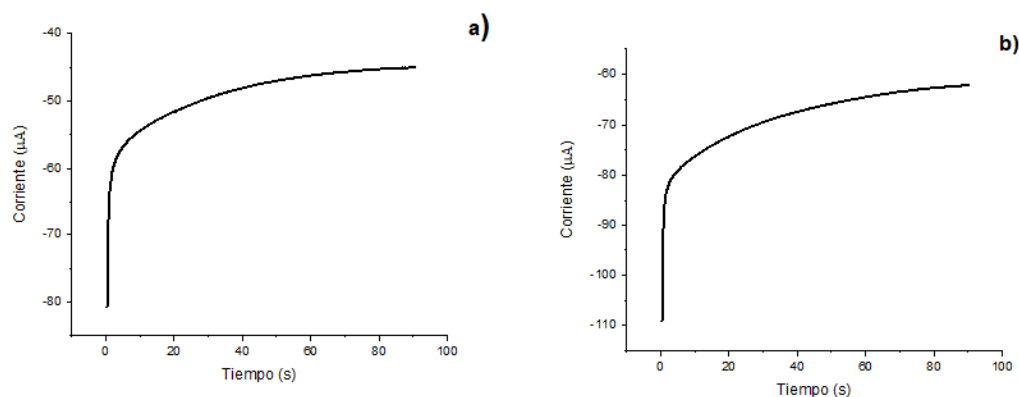
### 5.3 Sensor de glucosa: MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD

Se ha sintetizado un sensor MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD utilizando la glucosa como molécula plantilla en una concentración 0,01 M. El funcionamiento de dicho sensor se ha comparado con un NIP [CHI-AgNWs]/BDD.

El sensor se ha sintetizado con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL llevando a cabo la polimerización del chitosán por cronoamperometría sin agitación cuyos parámetros de medida fueron establecidos en el capítulo 4.

A continuación, se muestra el cronoamperograma de la electrodeposición llevada a cabo para la fabricación de los sensores MIP (**figura 54 a**) y NIP (**figura 54 b**). Tal y como se ha explicado en el sensor de lactosa, en ambos cronoamperogramas se distinguen cada una de las fases que se corresponden con la deposición de la película de chitosán sobre el electrodo BDD con el tiempo. Primero, se produce un aumento en la intensidad de corriente debido a los procesos electroquímicos que ocurren en la celda. En la segunda fase, tiene lugar la nucleación del chitosán, en ambos sensores el codo de curvatura es muy pronunciado, lo cual indica que la polimerización del chitosán sobre el electrodo se produce con dificultad. Este resultado se podría asociar a la falta de agitación de la solución que contiene la mezcla para la síntesis de los sensores, tal y como se ha indicado en los sensores de lactosa fabricados en las mismas condiciones. Finalmente, la película de chitosán crece sobre el electrodo BDD.

Como en los sensores de lactosa, la presencia de glucosa en la disolución dificulta la difusión de las especies a través de la película de quitosán. Este resultado se refleja en la intensidad de la corriente final alcanzada en los cronoamperogramas respectivos, donde el MIP alcanza una intensidad 45  $\mu\text{A}$  y el NIP de 60  $\mu\text{A}$ .

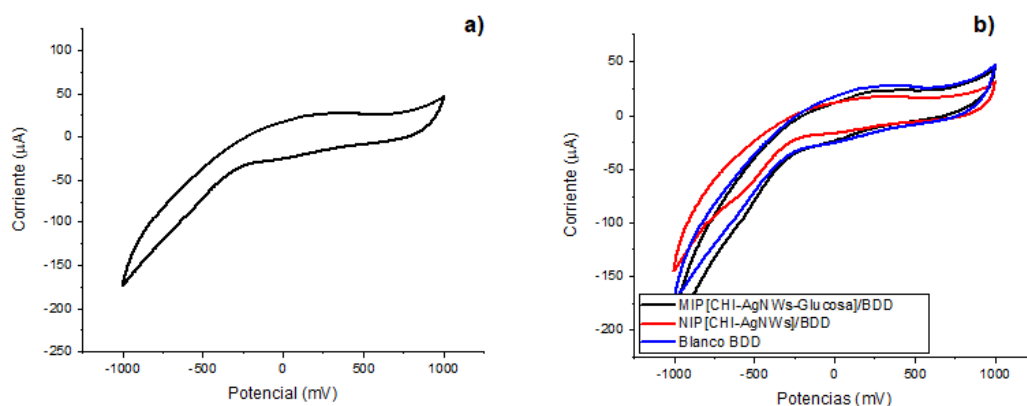


**Figura 54** Cronoamperograma de: a) MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD y b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos sensores con una concentración de AgNWs de 1mg/mL.

Se fabricaron dos sensores de cada tipo, cuyos cronoamperogramas presentaron un CV (calculado siguiendo el mismo criterio que para el sensor de lactosa) para el MIP del 20% y para el NIP del 17,95%. La razón de la baja reproducibilidad se asocia a que las condiciones en las que se realizó la fabricación o medición de ambos sensores no fueron las adecuadas, siendo un posible motivo la ausencia de agitación o una inmersión inadecuada del electrodo de trabajo y contraelectrodo.

El funcionamiento electroquímico del sensor MIP se ha estudiado comparando la respuesta obtenida por voltametría cíclica de un electrodo BDD blanco con la respuesta electroquímica proporcionada por el sensor MIP y NIP (**figura 55 b**), en una disolución de glucosa de concentración  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01M. La voltametría cíclica se ha realizado siguiendo el mismo procedimiento y estableciendo los mismos parámetros de trabajo que se han explicado para el sensor de lactosa.

En la **figura 55 a** se muestra la respuesta voltamétrica del blanco, donde no es posible apreciar ningún pico de oxidación-reducción dado que la glucosa no es un compuesto con actividad electrolítica.



**Figura 55** a) Voltamograma de un electrodo BDD en blanco en una disolución de glucosa  $10^{-4}M$  en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01M. b) Respuesta voltamétrica en una disolución de glucosa  $10^{-4} M$  en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M. de un: sensor MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD (negro) con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL, sensor NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo) con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL y un electrodo BDD blanco (azul).

La respuesta voltamétrica obtenida de los sensores (MIP y NIP), así como la del blanco, indica que los resultados no son buenos por varias razones. En el MIP, no hay nada que sugiera que se haya formado una plantilla polimérica puesto que la intensidad de corriente alcanzada es muy baja e inferior a la lograda por el blanco. En segundo lugar, en el sensor no se aprecia un buen funcionamiento de los AgNWs, puesto que la intensidad de corriente proporcionada por éstos es inferior a la respuesta voltamétrica del blanco. En adicción, tampoco es posible apreciar los picos de oxidación de los AgNWs lo que impide realizar el estudio del comportamiento electroquímico del sensor frente a glucosa. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que los parámetros de fabricación utilizados para la elaboración del sensor MIP no fueron los adecuados; las posibles razones son:

- En la electrodeposición del MIP no se llevó a cabo agitación, lo que implica que la cantidad de AgNWs depositados en el electrodo es insuficiente para apreciar los picos de oxidación de los mismos.
- La concentración de AgNWs en el sensor (1mg/mL) es demasiado pequeña lo que afectó directamente a la respuesta electroquímica del mismo.

Con objeto de estudiar la reproducibilidad se sintetizaron dos sensores de cada tipo MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD. El estudio se llevó

a cabo por medio de voltametría cíclica siguiendo el mismo procedimiento que en los sensores de lactosa.

Para ello, se calculó el CV del MIP y NIP obteniendo valores de reproducibilidad del 30% (MIP) y del 12% (NIP). La mala reproducibilidad de los sensores se puede deber a que las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos no fueron las adecuadas siendo una posible causa la falta de agitación durante la electrodeposición de la solución que contiene la mezcla para la síntesis del MIP o NIP.

Finalmente, es necesario aclarar que el procedimiento seguido para la optimización del sensor de lactosa con los distintos parámetros de fabricación y de medida indicados a lo largo de este trabajo (fabricación del sensor con agitación, concentración de AgNWs, uso de agente reticulante glutaraldehído, etc.) se deberían de repetir para el sensor de glucosa descrito en este mismo punto.

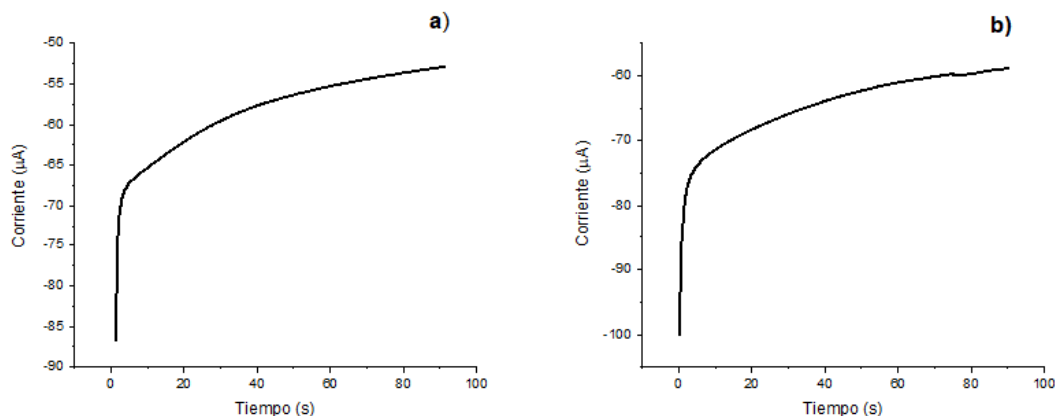
## 5.4 Sensor de galactosa: MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD

Se ha elaborado un sensor MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD para la detección de galactosa, para ello se utiliza dicho analito como molécula plantilla. El funcionamiento del MIP se ha comparado con un sensor NIP, fabricado de la misma forma, pero en ausencia de la molécula de galactosa.

A diferencia del resto de las configuraciones explicadas en el presente trabajo, en este caso el sensor se obtuvo por cronoamperometría en presencia de una molécula plantilla que se encontraba en la solución en una concentración 0,1 M (el resto de los sensores MIP de glucosa y galactosa se sintetizaron con una concentración 0,01 M de las moléculas plantilla respectivas). Este cambio se realizó con objeto de comprobar cómo afectaría al sensor un aumento de la concentración del azúcar en la formación de la plantilla de quitosán. La polimerización se llevó a cabo sin agitación bajo las condiciones indicadas en el capítulo 4.

En la **figura 56 a y b**, se muestra el cronoamperograma obtenido para el MIP y NIP respectivamente, donde se pueden observar las tres fases correspondientes a la electrodeposición del quitosán sobre el electrodo BDD, y que ya se han explicado en apartados anteriores. En ambos sensores se puede apreciar un proceso de nucleación muy costoso, así como una caída en la intensidad de corriente del NIP (60  $\mu$ A) en comparación al MIP (50  $\mu$ A). Tal y

como ocurría en el resto de las configuraciones obtenidas mediante cronoamperometría sin agitación.



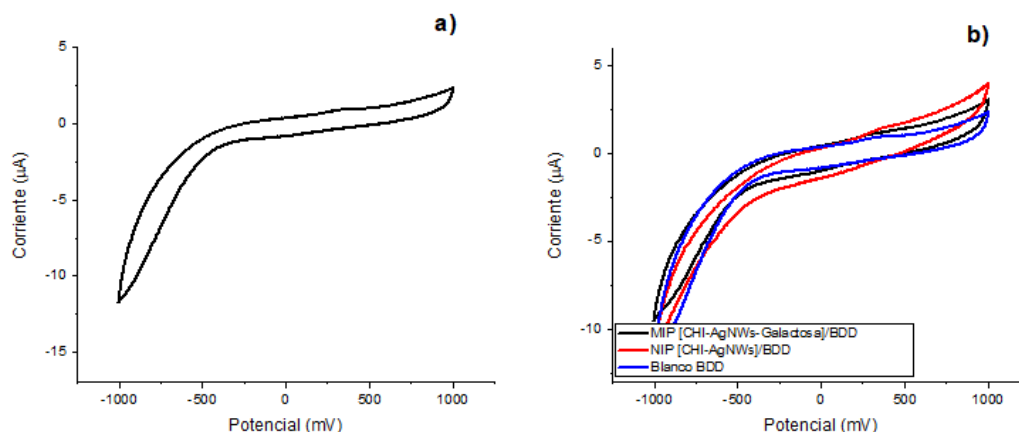
**Figura 56** a) Cronoamperograma de: a) MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD y b) NIP [CHI-AgNWs]/BDD. Ambos sensores con una concentración de AgNWs de 1mg/mL.

Con el propósito de llevar a cabo un estudio de la reproducibilidad se fabricaron dos sensores de cada tipo, cuyos cronoamperogramas mostraron un CV (calculado siguiendo los mismos pasos que para el sensor de lactosa) para el MIP del 18% y para el NIP del 17,25%. De nuevo la reproducibilidad es baja, las posibles causas de ello se han indicado para los sensores de lactosa y glucosa obtenidos bajo las mismas condiciones de fabricación.

Para llevar a cabo un estudio del funcionamiento del MIP, se ha comparado la respuesta de un electrodo BDD blanco con la respuesta electroquímica proporcionada por el sensor MIP y NIP (**figura 57 b**) en una solución de galactosa  $10^{-4}$  en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M. La respuesta voltamétrica de los sensores MIP y NIP frente a galactosa se obtuvo según los parámetros de medida y el protocolo de detección establecidos en el capítulo 4. En este caso, para llevar a cabo la medición frente a galactosa, se empleó una celda electroquímica distinta con el fin de comprobar el funcionamiento electroquímico de los sensores en la misma. Esta celda presentaba la ventaja de mantener siempre el mismo área de contacto de los sensores MIP en el proceso de detección frente al azúcar de interés.

La respuesta voltamétrica del electrodo BDD blanco, **figura 57 a**, se obtuvo estableciendo los mismos parámetros de trabajo que fueron indicados en los sensores de lactosa y glucosa. En el voltamograma obtenido no es posible

apreciar ningún pico de oxidación-reducción ya que la galactosa no presenta actividad electrofónica.



**Figura 57** a) Voltamograma de un electrodo BDD en blanco en una disolución de galactosa  $10^{-4}$ M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01M. b) Respuesta voltamétrica en una disolución de galactosa  $10^{-4}$  M en PBP de pH 7,4 y concentración 0,01 M de un sensor: MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD (negro) con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL, NIP [CHI-AgNWs]/BDD (rojo) con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL y un electrodo BDD blanco (azul).

El resultado de la voltametría cíclica, **figura 57 b**, demuestra un mal funcionamiento del sensor MIP, ya que la intensidad obtenida por el NIP es mayor a la intensidad proporcionada por el sensor MIP frente a galactosa. Además, no es posible apreciar los picos correspondientes a las reacciones de oxidación de los AgNWs lo que impide realizar el estudio del comportamiento electroquímico del sensor frente a galactosa.

El mal funcionamiento del MIP se puede asociar a las mismas razones que se indicaban para el sensor de glucosa. Además, en este caso se debe tener en cuenta que con una concentración de galactosa 0,1 M en la solución que contiene la mezcla para sintetizar el sensor, seguramente se produzca la saturación de la misma lo cual impide la formación de la plantilla polimérica en la matriz de quitosán.

Finalmente, en la **figura 57 b**, se puede observar que la intensidad de corriente alcanzada por los sensores es muy inferior ( $< 5 \mu\text{A}$ ) a la que se obtuvo con el resto de las configuraciones descritas que presentaban la misma concentración de AgNWs (1 mg/mL) en la película de quitosán. La razón de la baja intensidad de la señal se podría atribuir a un menor área de contacto entre el electrodo de trabajo y la solución en la celda empleada en este experimento; en comparación al área de contacto que se conseguía con la celda electrolítica utilizada en el resto de los experimentos descritos en este trabajo.

Para obtener la reproducibilidad se fabricaron dos sensores de cada tipo MIP[CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD y NIP[CHI-AgNWs]/BDD. El estudio se llevó a cabo con voltametría cíclica en una solución de galactosa  $10^{-4}$  M siguiendo el mismo procedimiento que para el sensor de glucosa y lactosa. De la misma forma, el criterio empleado para su obtención fue el cálculo del CV, obteniendo un valor para el sensor MIP del 10,95% y para el NIP del 7,56%. Ambos sensores tienen falta de reproducibilidad, lo que sugiere que las condiciones en las que se obtuvieron los sensores no fueron las adecuadas. A pesar de ello, el MIP presenta una mayor reproducibilidad que el resto de los sensores obtenidos a la misma concentración de AgNWs por cronoamperometría sin agitación. Lo cual se puede deber al empleo de la celda descrita en el capítulo 4, que mantuvo el mismo área de contacto del electrodo de trabajo en todo el proceso de detección frente a galactosa.

Como se ha indicado en el sensor de glucosa, el protocolo de optimización mediante el empleo de diferentes concentraciones de AgNWs, fabricación por cronoamperometría bajo agitación, concentración de la molécula plantilla, etc. Se debería realizar para llevar a cabo la optimización de un sensor MIP frente a galactosa que proporcione las mejores prestaciones frente a dicho analito.

## Capítulo VI

### Conclusiones y trabajo futuro.





## 6. Conclusiones y trabajo futuro

### 6.1 Conclusiones

En el presente trabajo de fin de grado se han elaborado sensores nanoestructurados con AgNWs basados en la tecnología de impresión molecular.

#### *Sensor nanoestructurado de lactosa*

De los experimentos realizados para la configuración de este sensor se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La voltametría cíclica para llevar a cabo la polimerización de chitosán no es un método adecuado, puesto que no se consigue la polimerización del MIP sobre el electrodo BDD.
- Se ha demostrado que fabricando los sensores sin agitación MIP [CHI-AgNWs-Lactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD y con una concentración de AgNWs de 1 mg/mL no es posible apreciar los picos de oxidación de los AgNWs.
- Se ha comprobado que en la electrodeposición llevada a cabo con el MIP frente al NIP se alcanzan valores en la intensidad de corriente inferiores lo que supone que la presencia del azúcar dificulta la polimerización de la película polimérica.
- Se ha demostrado que el parámetro de agitación durante el proceso de electrodeposición facilita el mecanismo de nucleación del chitosán por medio de un proceso de difusión de las especies en estado estacionario. Por otro lado, la agitación tiene una gran influencia en el comportamiento electroquímico del sensor, ya que con él se consigue una mejora del rendimiento y de la reproducibilidad.
- Se ha demostrado la importancia de los AgNWs en el sensor ya que a través de ellos se puede llevar a cabo la detección de azúcares, lo que resulta de gran interés para la detección de una gran cantidad de analitos.
- Se han desarrollado sensores con concentraciones crecientes de AgNWs, comprobándose que la intensidad de corriente es directamente proporcional a la concentración de éstos. Con ello, también se ha

comprobado que a una concentración de AgNWs en el sensor de 10 mg/mL el MIP no funciona bien lo que podría suponer que a concentraciones tan elevadas se produce la saturación del sensor.

- Se obtuvieron sensores que se sometieron a vapores de glutaraldehído MIP [CHI-Glutaraldehído-AgNWs-Lactosa]/BDD en los que se demostró que su uso favorecía la respuesta voltamétrica del sensor. En los sensores con ausencia de glutaraldehído se obtuvo una reproducibilidad del 23% y 18,4%, para el MIP y NIP respectivamente. Mientras que para el sensor sometido a glutaraldehído se obtuvo para el MIP y NIP una reproducibilidad del 8,37% y 13,64% respectivamente. Estos resultados demuestran que la obtención de sensores en presencia de un agente reticulante contribuye a obtener una respuesta más reproducible.
- Para el sensor seleccionado que presenta la configuración óptima frente a lactosa, se ha llevado a cabo un estudio de la reproducibilidad, repetitividad y sensibilidad. Se ha comprobado que la reproducibilidad de los MIP (12,75%) es inferior a la de los NIP (1,41%), este resultado negativo se atribuye a la falta de homogeneidad durante la fabricación del sensor. Por otro lado, tampoco se obtuvieron buenos resultados en la repetitividad pudiendo ser debido a la pérdida de AgNWs o al deterioramiento de la película polimérica de quitosán. Finalmente, en el estudio de sensibilidad se comprobó que el aumento del azúcar a una concentración de  $10^{-3}M$  en la solución puede causar la saturación del sensor MIP.

### ***Sensores de glucosa y galactosa***

- En el sensor de glucosa MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD se obtuvieron malos resultados, dado que la intensidad de la señal obtenida entre ambos sensores era inferior a la intensidad proporcionada por el blanco. Lo que demostró que las condiciones en las que se fabricaron los dos tipos de sensores no fueron las adecuadas. El mal funcionamiento se atribuye a la polimerización del quitosán en presencia de AgNWs en ausencia de agitación y a una concentración de AgNWs de 1 mg/mL insuficiente.
- En el sensor de galactosa MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD y NIP [CHI-AgNWs]/BDD también se obtuvieron malos resultados, obteniendo una peor intensidad en el sensor MIP en comparación al NIP. El mal funcionamiento del sensor se asocia a las mismas razones que se indicaban para el sensor de glucosa. Adicionalmente, se comprobó que el azúcar en una concentración 0,1 M en la solución causó la saturación del mismo.

A pesar de que los experimentos realizados son insuficientes como para predecir su comportamiento electroquímico frente a la detección de glucosa y galactosa, a priori y en comparación con los resultados obtenidos en el sensor frente a lactosa, ambos sensores funcionan peor. Debido a ello, todavía es necesario llevar a cabo la optimización de los mismos para poder predecir su comportamiento electroquímico frente a los azúcares de interés.

### ***Trabajo pendiente.***

Finalmente, es necesario aclarar que el trabajo concerniente al desarrollo experimental no pudo ser concluido debido a la covid-19, los resultados presentados en esta investigación se corresponden con un trabajo de permanencia en el laboratorio de 1 mes y medio.

En lo referente al sensor MIP de lactosa se debería de continuar con la siguiente investigación en el laboratorio:

- Terminar de optimizar el sensor con una concentración de 5 mg/mL de AgNWs dado que es con esta concentración donde el MIP demostró un mejor comportamiento frente a la detección de lactosa. Para ello, se propone: comprobar el efecto del glutaraldehído en la respuesta voltamétrica de este sensor y llevar a cabo un estudio de la sensibilidad a través de la voltametría cíclica con concentraciones inferiores de lactosa.
- Una vez optimizado por completo, se debería de estudiar mediante voltametría cíclica el comportamiento del sensor frente la detección de lactosa variando la proporción de AgNWs en la película de quitosán (50%, 60%, 70%, etc.).
- Se debe calcular el límite de detección del sensor, definido este como “la concentración más baja a la que se puede detectar el analito”. El límite de detección generalmente se calcula mediante cronoamperometría a través de la siguiente expresión:

$$LD = \frac{3 \cdot \sigma}{m} \quad (32)$$

*Ecuación 32 Cálculo del límite de detección.*

Donde los parámetros de la ecuación son:  $\sigma$  es la desviación estándar de las medidas del blanco entendido este como una muestra sin el analito y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración obtenida de representar la concentración de analito con la intensidad de corriente alcanzada con cada concentración de analito añadida [214], [215]

- Caracterizar la estructura del sensor MIP y NIP a través de técnicas como la espectroscopía UV-VIS, difracción de rayos-X y AFM.

En lo referente a los sensores MIP [CHI-AgNWs-Galactosa]/BDD y MIP [CHI-AgNWs-Glucosa]/BDD se debería de completar la investigación llevando a cabo el mismo estudio que el que se ha efectuado para el sensor de lactosa.

## 6.2 Trabajo futuro

En relación con el trabajo futuro relativo al desarrollo de sensores basados en la tecnología de impresión molecular, se podrían llevar a cabo las siguientes investigaciones:

- En lo referente al estudio de la morfología de los sensores se propone llevar a cabo un estudio basado en AFM con el fin de caracterizar la plantilla polimérica formada.
- Mejorar el proceso de elaboración de la molécula plantilla depositada sobre la superficie del electrodo con el fin de mejorar la reproducibilidad del sensor MIP.
- Llevar a cabo nuevas técnicas de inmovilización de los nanohilos de plata en la película de quitosán para conseguir una mejor reproducibilidad y repetitividad de los sensores nanoestructurados.
- Realizar un estudio del comportamiento electroquímico de los sensores frente a otras moléculas interferentes para comprobar la selectividad de los sensores basados en la impresión molecular.
- Llevar a cabo la construcción de una lengua electrónica que consista en un sistema multisensor basado en la tecnología de impresión molecular para la identificación simultánea de diferentes tipos de azúcares. Con

la lengua electrónica se pueden llevar a cabo análisis en medios complejos como en la leche, zumos, yogures, batidos, etc. Lo que resulta de especial interés en la industria láctea.

## **Capítulo VII**

### **Bibliografía.**





## 7. Bibliografía

- [1] “La industria alimentaria, la revolución de la comida,” *ESPASA*. [Online]. Available: <http://espasa.planetasaber.com/theworld/gats/article/default.asp?pk=841&art=59>.
- [2] Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas, “Marco Estratégico Para La Industria De Alimentación Y Bebidas,” p. 24, 2018.
- [3] P. Gordo Gómez, “La industria agroalimentaria en Castilla y León,” pp. 391–393, 1988.
- [4] S. Zavala, “Agricultura y ganadería,” pp. 85–202, 2018.
- [5] “Mesa de la leche de oveja de castilla y león,” *Agricultura y ganadería de Castilla y león*. .
- [6] A. F. Matteo Baire, Andrea Melis, Matteo B. Lodi, Pierluigi Tuveri, Chiara Dachena, Marco Simone, “A wireless sensors network for monitoring the Carasau bread manufacturing process,” *Electron.*, vol. 8, no. 12, pp. 1–19, 2019.
- [7] A. R. El Boushy, A. F. B. van der Poel, J. I. A. Koene, and S. H. Dieleman, “Tanning waste by-product from cattle hides, its suitability as a feedstuff,” *Bioresour. Technol.*, vol. 35, no. 3, pp. 321–323, 1991.
- [8] “*Investigación en la EII*.” Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid.
- [9] “El grupo de sensores UvaSens.” [Online]. Available: [www.eis.uva.es/inorganica/index.php/component/content/article/73-grupo-uvasesens](http://www.eis.uva.es/inorganica/index.php/component/content/article/73-grupo-uvasesens).
- [10] A. Urquilla, “Impacto de la nanotecnología como revolución industrial a nivel mundial,” *Real. y Reflexión*, vol. 49, no. 49, pp. 66–78, 2019.
- [11] X. Tian, J. Wang, Z. Ma, M. Li, Z. Wei, and J. M. Díaz-Cruz, “Combination of an E-Nose and an E-Tongue for Adulteration Detection of Minced Mutton Mixed with Pork,” *J. Food Qual.*, vol. 2019, 2019.
- [12] C. Salvo-Comino, I. Rassas, S. Minot, F. Bessueille, M. L. Rodríguez-Méndez, and A. Errachid, “Voltammetric sensor based on electrodeposited molecularly imprinted chitosan film on BDD electrodes for catechol detection in buffer and in wine samples,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, no. December 2019, pp. 1–6, 2020.
- [13] M. Ghasemi-Varnamkhasti, M. L. Rodríguez-Méndez, S. S. Mohtasebi, and C. Apetrei, “Monitoring the aging of beers using a bioelectronic tongue,” *Food Control*, vol. 25, no. 1, pp. 216–224, 2012.
- [14] C. Salvo-Comino, C. García-Hernández, C. García-Cabezón, and M. L. Rodríguez-Méndez, “Discrimination of milks with a multisensor system based on layer-by-layer films,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 8, pp. 1–

- 12, 2018.
- [15] “Historia de la Nanotecnología,” 2019. [Online].  
Available:  
<http://www.nanotec.es/historia-de-la-nanotecnologia/>.
- [16] Y. T. Lai and N. H. Tai, “One-Step Process for High-Performance, Adhesive, Flexible Transparent Conductive Films Based on p-Type Reduced Graphene Oxides and Silver Nanowires,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 33, pp. 18553–18559, 2015.
- [17] S. L. Elizondo and J. W. Mintmire, “Ab initio study of helical silver single-wall nanotubes and nanowires,” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 73, no. 4, pp. 1–6, 2006.
- [18] I. R. De Larramendi, “TEMA 3 Aplicación de la nanotecnología en el sector de la alimentación,” 2016.
- [19] M. Jaiswal, R. Dudhe, and P. K. Sharma, “Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system,” *3 Biotech*, vol. 5, no. 2, pp. 123–127, 2015.
- [20] “PRODUCCIÓN DEL SECTOR LÁCTEO,” *Federación Nacional De Industrias Lácteas*. [Online].  
Available: <http://fenil.org/produccion-sector-lacteo/>.
- [21] M. S. Ing. Jorge A. Elizondo Salazar, “Importancia y Manejo del Calostro en el Ganado de Leche,” *DAIRY CASTTLE*, 2019. [Online].  
Available:  
<https://dairy-cattle.extension.org/importancia-y-manejo-del-calostro-en-el-ganado-de-leche/>.
- [22] “Definición, Composición, Estructura y Propiedades De La Leche,” *Universidad nacional abierta y a distancia (UNAD)*, 2013. .
- [23] “Características organolépticas Físico - Químicas y Bromatológicas del grupo de los lácteos,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, 2019.
- [24] H. J. Park, J. H. Yoon, K. G. Lee, and B. G. Choi, “Potentiometric performance of flexible pH sensor based on polyaniline nanofiber arrays,” *Nano Converg.*, vol. 6, no. 1, 2019.
- [25] A. J. Nathan and A. Scobell, “How China sees America,” *Foreign Aff.*, vol. 91, no. 5, 2012.
- [26] M. Andrés and H. Ramos, “Universidad nacional abierta y a distancia: facultad de ciencias básicas, tecnología e ingeniería,” 2011.
- [27] La Universidad del Zulia, “Introducción al control de calidad de la leche cruda,” p. 24, 2003.
- [28] Eduardo, “Universidad Austral De Chile Facultad De Ciencias Agrarias Escuela De Ingeniería En Alimentos,” 2004.
- [29] L. Negri, “El pH y la acidez de la leche,” *Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad*, vol. 2. pp. 155–161, 2005.

- [30] S. Morandi, T. Silvetti, A. Tamburini, and M. Brasca, "Changes in oxidation-reduction potential during milk fermentation by wild lactic acid bacteria," *J. Dairy Res.*, vol. 83, no. 3, pp. 387–394, 2016.
- [31] S. Armas, "Determinación de parámetros fisicoquímicos en leche," pp. 5–7, 2017.
- [32] A. Blanco and G. Blanco, "Chapter 4 - Carbohydrates," *Med. Biochem.*, pp. 73–97, 2017.
- [33] R. F. Tester and J. Karkalas, "CARBOHYDRATES | Classification and Properties," *Encycl. Food Sci. Nutr.*, pp. 862–875, 2003.
- [34] DFE Pharma, "Lactose: Some basic properties and characteristics," pp. 1–12, 2015.
- [35] J. H. Cummings and A. M. Stephen, "Carbohydrate terminology and classification," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 61, pp. S5–S18, 2007.
- [36] S. J. Enna and D. B. Bylund, "Galactose," *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.*, pp. 1–1, 2011.
- [37] J. A. O. P. F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney, *Dairy Chemistry and biochemistry*. 2015.
- [38] S. Vazquez, "Puesta a Punto De Metodologías Analíticas De Lactosa En Bases Lácteas," p. 22, 2017.
- [39] J. C. Calderón, F. G. Narváez, O. V. Castro, J. Osorio-Arias, and C. A. Cuartas, "Reacción de Maillard en productos lácteos," *Estudios Interdisciplinarios De Investigación En Ingeniería*, no. January 2020. p. 25, 2018.
- [40] D. M. Kim, J. M. Moon, W. C. Lee, J. H. Yoon, C. S. Choi, and Y. B. Shim, "A potentiometric non-enzymatic glucose sensor using a molecularly imprinted layer bonded on a conducting polymer," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 91, pp. 276–283, 2017.
- [41] A. Diouf, B. Bouchikhi, and N. El Bari, "A nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on molecularly imprinted polymer and its application in measuring saliva glucose," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 98, no. December 2018, pp. 1196–1209, 2019.
- [42] "Glucosa anhidra - Ficha de Seguridad," pp. 5–7, 2003.
- [43] "D-Glucose," *National library of medicine*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/GLUCOSE>.
- [44] M. Navarro, "Biomoléculas, glúcidos y proteínas," 2013. .
- [45] H. D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, *Food Chemistry*. 2009.
- [46] "D-Galactose." [Online]. Available: [https://www.chemicalbook.com/chemicalproductproperty\\_en\\_cb1327034.htm%0D](https://www.chemicalbook.com/chemicalproductproperty_en_cb1327034.htm%0D).
- [47] P. Keung Chi and M. Bhavbhuti, *Handbook of food chemistry*. 2015.

- [48] M. A. Wattiaux, "Composición de la leche y valor nutricional," *Esenciales Leche.*, vol. 040, no. 19, pp. 73–76, 2012.
- [49] "Electroforesis de proteínas de suero en acetato de celulosa," vol. 1, pp. 1–3.
- [50] R. W. Bell, "Retention of Ascorbic Acid, Changes in Oxidation–Reduction Potential, and the Prevention of an Oxidized Flavor During Freezing Preservation of Milk," *J. Dairy Sci.*, vol. 31, no. 11, pp. 951–960, 1948.
- [51] G. Ramírez López, "Estudio de la Leche." p. 11, 2008.
- [52] M. García-Garibay, "Effect of heat treatment of milk on the activity and technological applications some enzymes," *Inf. Tecnológica*, vol. 14, 2003.
- [53] A. Bello, "Produccion de enzimas en la industria lactea (lactasa y renina)," p. 150, 2009.
- [54] E. Tongues, "Electronic Tongues for food and security applications," 2016.
- [55] J. Amador, E. Colunga, and M. Velazquez-manzanares, *La química analítica en los albores del siglo xxi*, no. March. 2014.
- [56] L. E. Z. Garc and C. Garc, "Los biosensores electroquímicos : herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico," *Inmunolectroanalisis*, pp. 197–222, 2010.
- [57] I. Union, O. F. Pure, and A. Chemistry, "Commission on General Aspects of Analytical Chemistry "? Chemical Sensors," vol. 63, no. 9, pp. 1247–1250, 1991.
- [58] L. Escalona, L. Manganiello, M. López, and C. Vega, "The chemical sensors and their utility in the monitoring of polluting gases," *Red Rev. Científicas América Lat. el Caribe, España y Port.*, vol. 19, pp. 74–88, 2012.
- [59] E. Cortón, "Development and Applications of Enzymatic and Microbial Biosensors," 2000.
- [60] "Sensores Químicos," *Instituto Tecnológico Metropolitano*, 2020. .
- [61] M. Cano Luna, *Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras*. 2008.
- [62] C. B. Silva Cárdenas, "Tesis Doctoral Desarrollo y validación de un sistema basado en ENFET para aplicación en Diálisis," p. 107, 2008.
- [63] Copa Airlines, "Panorama de las Américas," *Energías verdes*, p. 234, 2015.
- [64] C. Salvo-Comino, I. Rassas, S. Minot, and F. Bessueille, "Voltammetric sensor based on molecularly imprinted chitosan-carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles nanocomposite deposited on boron-doped diamond electrodes for catechol detection," *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 3, pp. 1–11, 2020.
- [65] M. Pohanka, "Sensors based on molecularly imprinted polymers," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 12, no. 9, pp. 8082–8094, 2017.

- [66] M. Hussain, K. Kotova, and P. A. Lieberzeit, "Molecularly imprinted polymer nanoparticles for formaldehyde sensing with QCM," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 7, 2016.
- [67] H. Shekarchizadeh, A. A. Ensafi, and M. Kadivar, "Selective determination of sucrose based on electropolymerized molecularly imprinted polymer modified multiwall carbon nanotubes/glassy carbon electrode," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 6, pp. 3553–3561, 2013.
- [68] R. D. Crapnell *et al.*, "Recent advances in electrosynthesized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 5, 2019.
- [69] J. Li, G. Wei, and Y. Zhang, *Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements in Sensors*. Elsevier B.V., 2012.
- [70] C. Ryan, E. Alcock, F. Buttner, and M. Schmidt, "Synthesis and characterisation of cross-linked chitosan composites functionalised with silver and gold nanoparticles for antimicrobial applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 18, no. 1, pp. 528–540, 2017.
- [71] M. U. Islam, N. Shah, M. Ul-Islam, W. A. Khattak, and J. Kon Park, "A Brief Overview of Molecularly Imprinted Polymers: From Basics to Applications Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material," *Elsevier*, no. January 2012, 2013.
- [72] L. U. Ashutosh Tiwari, Ed., "Advanced Molecularly Imprinting Materials," in *Advanced Molecularly Imprinting Materials*, 2016, pp. 486–488.
- [73] S. Mallakpour and M. Madani, "Effects of glucose-functionalized multiwalled carbon nanotubes on the structural, mechanical, and thermal properties of chitosan nanocomposite films," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 23, pp. 1–9, 2015.
- [74] P. Deng, Z. Xu, and Y. Kuang, "Electrochemical determination of bisphenol A in plastic bottled drinking water and canned beverages using a molecularly imprinted chitosan-graphene composite film modified electrode," *Food Chem.*, vol. 157, pp. 490–497, 2014.
- [75] Y. Fuchs, O. Soppera, and K. Haupt, "Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications-A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 717, pp. 7–20, 2012.
- [76] S. Piletsky, *Molecular Imprinting of Polymers*. 2019.
- [77] S. F. Abdul Raof, S. Mohamad, and M. R. Abas, "Synthesis and evaluation of molecularly imprinted silica gel for 2-hydroxybenzoic acid in aqueous solution," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 3, pp. 5952–5965, 2013.
- [78] I. Orellana Ruíz, "Reconocimiento molecular en macromoléculas sintéticas," p. 38, 2016.
- [79] W. Xu, X. Li, W. Zhang, and X. Ying, "Electrochemical sensors for L-Tryptophan based on molecularly imprinted polymers," *Adv. Mater. Res.*, vol. 499, pp. 434–438, 2012.
- [80] S. Piletsky, S. Piletsky, and I. Chianella, "MIP-based Sensors," *Mol. Imprinted Sensors*, pp. 339–354, 2012.

- [81] X. Yang, J. Sun, F. Cui, and J. Ji, "An eco-friendly sensor based on CQD@MIPs for detection of N-acylated homoserine lactones and its 3D printing applications," *Talanta*, vol. 219, no. March, p. 121343, 2020.
- [82] D. Antuña-Jiménez, G. Díaz-Díaz, M. C. Blanco-López, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, and P. Tuñón-Blanco, "Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Past, Present, and Future." 2012.
- [83] A. Mujahid and F. L. Dickert, "Molecularly Imprinted Polymers for Sensors," *Mol. Imprinted Sensors*, no. 12, pp. 125–159, 2012.
- [84] W. Zheng, H. Wu, Y. Jiang, J. Xu, X. Li, and W. Zhang, "A molecularly-imprinted-electrochemical-sensor modified with nano-carbon-dots with high sensitivity and selectivity for rapid determination of glucose," *Anal. Biochem.*, vol. 555, no. June, pp. 42–49, 2018.
- [85] Y. Cao, T. Feng, J. Xu, and C. Xue, "Recent advances of molecularly imprinted polymer-based sensors in the detection of food safety hazard factors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 141, no. 5, p. 111447, 2019.
- [86] Z. Mazouz, M. Mokni, N. Fourati, C. Zerrouki, F. Barbault, and M. Seydou, "Computational approach and electrochemical measurements for protein detection with MIP-based sensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 151, no. September 2019, p. 111978, 2020.
- [87] Y. Ma, X. L. Shen, Q. Zeng, H. S. Wang, and L. S. Wang, "A multi-walled carbon nanotubes based molecularly imprinted polymers electrochemical sensor for the sensitive determination of HIV-p24," *Talanta*, vol. 164, no. November 2016, pp. 121–127, 2017.
- [88] S. A. Zaidi, *Development of molecular imprinted polymers based strategies for the determination of Dopamine*, vol. 265. Elsevier B.V., 2018.
- [89] Y. Uludağ, S. A. Piletsky, A. P. F. Turner, and M. A. Cooper, "Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes," *FEBS J.*, vol. 274, no. 21, pp. 5471–5480, 2007.
- [90] O. S. Ahmad, T. S. Bedwell, C. Esen, A. Garcia-Cruz, and S. A. Piletsky, "Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors," *Trends Biotechnol.*, vol. 37, no. 3, pp. 294–309, 2019.
- [91] Y. Yoshimi, A. Narimatsu, K. Nakayama, S. Sekine, K. Hattori, and K. Sakai, "Development of an enzyme-free glucose sensor using the gate effect of a molecularly imprinted polymer," *J. Artif. Organs*, vol. 12, no. 4, pp. 264–270, 2009.
- [92] "Glutaraldehydo."
- [93] I. Sargin, "Efficiency of Ag(0)@chitosan gel beads in catalytic reduction of nitroaromatic compounds by sodium borohydride," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 137, pp. 576–582, 2019.
- [94] M. Sillanpaa, "Cross-linked chitosan," in *Advanced water Treatment adsorption*, Elsevier, Ed. 2020, p. 696.
- [95] N. A. Ibrahim, A. A. Nada, and B. M. Eid, *Polysaccharide-Based Polymer Gels and Their Potential Applications*, no. August. Springer Singapore,

2018.

- [96] C. M. Da Silva, D. L. Da Silva, L. V. Modolo, R. B. Alves, M. A. De Resende, and C. V. B. Martins, "Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities," *J. Adv. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–8, 2011.
- [97] X. Qin, H. Wang, Z. Miao, J. Li, and Q. Chen, "A novel non-enzyme hydrogen peroxide sensor based on catalytic reduction property of silver nanowires," *Talanta*, vol. 139, pp. 56–61, 2015.
- [98] M. J. Song, S. W. Hwang, and D. Whang, "Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on a modified gold electrode with silver nanowires," *J. Appl. Electrochem.*, vol. 40, no. 12, pp. 2099–2105, 2010.
- [99] M. Blanco, *Métodos electroanalíticos I*. 2001.
- [100] M. V. s. Gomez-Biedma, E. Soria, "ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO," *Rev. diagnóstico Biológico*, vol. 51, 2002.
- [101] C. J. H. Wort and R. S. Balmer, "Diamond as an electronic material," *Mater. Today*, vol. 11, no. 1–2, pp. 22–28, 2008.
- [102] S. Lips and S. R. Waldvogel, "Use of boron-doped diamond electrodes in electro-organic synthesis," *ChemElectroChem*, vol. 6, no. 6, pp. 1649–1660, 2019.
- [103] "Semiconductores tipo N y P," 18 JULIO, 2014. [Online].  
Available: <https://ingelibreblog.wordpress.com/2014/07/18/semiconductor-extrinseco-n-y-p/%0D>.
- [104] Y. Yi, G. Weinberg, M. Prenzel, M. Greiner, S. Heumann, and S. Becker, "Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode," *Catal. Today*, vol. 295, no. February, pp. 32–40, 2017.
- [105] A. Dekanski, J. Stevanović, R. Stevanović, B. Ž. Nikolić, and V. M. Jovanović, "Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation," *Carbon N. Y.*, vol. 39, no. 8, pp. 1195–1205, 2001.
- [106] J. M. Freitas, T. da C. Oliveira, R. A. A. Munoz, and E. M. Richter, "Boron doped diamond electrodes in flow-based systems," *Front. Chem.*, vol. 7, no. APR, 2019.
- [107] C. Zhang, X. Lu, Y. Lu, M. Ding, and W. Tang, "Titanium-boron doped diamond composite: A new anode material," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 98, no. April, p. 107490, 2019.
- [108] M. R. Galindo Gonzalez, "Celdas solares orgánicas."
- [109] J. Tafur, P. Espinoza-Montero, C. Manciatì, C. Fierro-Naranjo, G. Swain, and L. Fernandez, "Evaluation of BDD electrode in the determination of Cd(II), Pb(II) and Hg(II) in wastewater mining (Portovelo)," *Rev. Tec. Univ. Zulia*, vol. 41, no. 2, 2018.
- [110] F. Montilla, D. Gamero Quijano, and E. Morallon, "Synthetic Boron-Doped Diamond Electrodes for Electrochemical Water Treatment," pp. 8–12, 2014.

- [111] P. T. Kissinger and A. W. Bott, "Electrochemistry for the Non-Electrochemist," *Curr. Sep.*, vol. 20, no. 2, pp. 51–53, 2002.
- [112] E. Electroqu, M. D. E. Pol, and M. Conductores, "Estudio electroquímico de polímeros conductores," pp. 199–240.
- [113] Y. Sun, Y. Yin, B. T. Mayers, T. Herricks, and Y. Xia, "Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO<sub>3</sub> with ethylene glycol in the presence of seeds and poly(vinyl pyrrolidone)," *Chem. Mater.*, vol. 14, no. 11, pp. 4736–4745, 2002.
- [114] X. Gao, L. Jin, Q. Wu, Z. Chen, and X. Lin, "A Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor Based on Silver Nanowires and Chitosan Film," *Electroanalysis*, vol. 24, no. 8, pp. 1771–1777, 2012.
- [115] J. Turan, M. Kesik, S. Soylemez, S. Goker, S. Coskun, and H. E. Unalan, "An effective surface design based on a conjugated polymer and silver nanowires for the detection of paraoxon in tap water and milk," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 228, pp. 278–286, 2016.
- [116] V. H. Luan, J. H. Han, H. W. Kang, and W. Lee, "Ultra-sensitive non-enzymatic amperometric glucose sensors based on silver nanowire/graphene hybrid three-dimensional nanostructures," *Results Phys.*, vol. 15, no. October, p. 102761, 2019.
- [117] X. Yang, J. Bai, Y. Wang, X. Jiang, and X. He, "Hydrogen peroxide and glucose biosensor based on silver nanowires synthesized by polyol process," *Analyst*, vol. 137, no. 18, pp. 4362–4367, 2012.
- [118] E. Garnett, L. Mai, and P. Yang, "Introduction: 1D Nanomaterials/Nanowires," *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 15, pp. 8955–8957, 2019.
- [119] P. Banerjee and A. Bose, "Evaluation of GPS PDOP from elevation and azimuth of satellites," *Indian J. Radio Sp. Phys.*, vol. 25, no. 2, pp. 110–113, 1996.
- [120] P. Zhang, I. Wyman, J. Hu, S. Lin, Z. Zhong, and Y. Tu, "Silver nanowires: Synthesis technologies, growth mechanism and multifunctional applications," *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 223, pp. 1–23, 2017.
- [121] Y. Shi, L. He, Q. Deng, Q. Liu, L. Li, and W. Wang, "Synthesis and applications of silver nanowires for transparent conductive films," *Micromachines*, vol. 10, no. 5, 2019.
- [122] Z. R. Ramadhan, J. W. Han, D. J. Lee, S. A. N. Entifar, J. Hong, and C. Yun, "Surface-functionalized silver nanowires on chitosan biopolymers for highly robust and stretchable transparent conducting films," *Mater. Res. Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 124–130, 2019.
- [123] Y. Ge, J. Liu, X. Liu, J. Hu, X. Duan, and X. Duan, "Rapid Electrochemical Cleaning Silver Nanowire Thin Films for High-Performance Transparent Conductors," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 141, no. 31, pp. 12251–12257, 2019.
- [124] A. Kobler, T. Beuth, T. Klöffel, R. Prang, M. Moosmann, and T. Scherer, "Nanotwinned silver nanowires: Structure and mechanical properties," *Acta*



*Mater.*, vol. 92, pp. 299–308, 2015.

- [125] “Los nanohilos semiconductores serán claves en electrónica,” *Amazings. Noticias de la Ciencia y la tecnología*, 2018.
- [126] S. M. Bergin, Y. H. Chen, A. R. Rathmell, P. Charbonneau, Z. Y. Li, and B. J. Wiley, “The effect of nanowire length and diameter on the properties of transparent, conducting nanowire films,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 6, pp. 1996–2004, 2012.
- [127] N. S. Mohammad, “Understanding quantum confinement in nanowires: Basics, applications and possible laws,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 26, no. 42, 2014.
- [128] C. Zhao, G. P. Jin, L. L. Chen, Y. Li, and B. Yu, “Preparation of molecular imprinted film based on chitosan/nafion/nano- silver/poly quercetin for clenbuterol sensing,” *Food Chem.*, vol. 129, no. 2, pp. 595–600, 2011.
- [129] X. Zhu and T. Gao, *Spectrometry*. Elsevier Inc., 2018.
- [130] P. Ramasamy, D. M. Seo, S. H. Kim, and J. Kim, “Effects of TiO<sub>2</sub> shells on optical and thermal properties of silver nanowires,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 23, pp. 11651–11657, 2012.
- [131] X. Qin, H. Wang, Z. Miao, X. Wang, Y. Fang, and Q. Chen, “Synthesis of silver nanowires and their applications in the electrochemical detection of halide,” *Talanta*, vol. 84, no. 3, pp. 673–678, 2011.
- [132] B. Wiley, Y. Sun, and Y. Xia, “ChemInform Abstract: Synthesis of Silver Nanostructures with Controlled Shapes and Properties,” *ChemInform*, vol. 39, no. 4, pp. 1067–1076, 2008.
- [133] Junaidi, M. Yunus, Harsojo, E. Suharyadi, and K. Triyana, “Effect of stirring rate on the synthesis silver nanowires using polyvinyl alcohol as a capping agent by polyol process,” *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, vol. 6, no. 3, pp. 365–369, 2016.
- [134] K. Sheng Lau, S. X. Chin, S. T. Tan, F. S. Lim, W. Sea Chang, and C. Chin Yap, “Silver nanowires as flexible transparent electrode: Role of PVP chain length,” *J. Alloys Compd.*, vol. 803, pp. 165–171, 2019.
- [135] S. Subbaiyan, S. Rangarajalu, and L. Sriram, “Synthesis and characterization of silver nanowires,” *Adv. Mater. Res.*, vol. 678, pp. 212–216, 2013.
- [136] M. Z. Baykara and U. D. Schwarz, *Atomic force microscopy: Methods and applications*, 3rd ed. Elsevier Inc., 2016.
- [137] O. Sahin, S. Magonov, C. Su, C. F. Quate, and O. Solgaard, “An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 8, pp. 507–514, 2007.
- [138] M. Renisawh, “Microscopio de Fuerza Atómica ( AFM ) • AFM JEOL JSPM-5200 Técnicos responsables Principio básico de la técnica Beneficios Detalles más importantes,” pp. 3–4.
- [139] “Microscopia de Efecto Túnel y Fuerza Atómica,” *Microscopy*.

- [140] A. Labuda, S. Hohlbauch, M. Kocun, F. T. Limpoco, N. Kirchhofer, and B. Ohler, "Tapping Mode AFM Imaging in Liquids with blueDrive Photothermal Excitation," *Micros. Today*, vol. 26, no. 6, pp. 12–17, 2018.
- [141] G. R. Crespo, "Microscopía de Fuerza Atómica ( AFM ), ( AFM ) modos de operación y aplicaciones," 2013.
- [142] F. Schmid and L. Beer, "Biological Macromolecules : Spectrophotometry Concentrations," *Methods*, pp. 1–4, 2001.
- [143] Q. Gonz, "La espectroscopia estudia la absorción y emisión de la radiación electromagnética por la materia. La radiación electromagnética tiene carácter ondulatorio y esta formada por fotones, cuya energía viene dada por:," *Univ. Val.*, 2011.
- [144] D. de I. Química, "Espectroscopia Ultravioleta - Visible," *Univ. Carlos III Madrid*, pp. 1–9, 2010.
- [145] E. Villalva, "Práctica 4 Colorimetría. Ley De Lambert-Beer," 2009.
- [146] N. A. Díaz *et al.*, "8 . Espectrofotometría : Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas," pp. 1–8.
- [147] A. D. Nieves, "Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas," *SAE Tech. Pap.*, pp. 1–8, 1984.
- [148] "Valores límite de exposición a rayos ultravioleta y trampas de luz para insectos," *Empresa Brandenburg*, 2012. .
- [149] Encyclopedia, "Transiciones electrónicas en moléculas orgánicas," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2019.
- [150] F. Mill and S. Mari, "Extensión Mérida," *Metod. Espectroscópicos Uv Visible Para Análisis Mol. Y Elem.*, vol. 1, no. August, p. 213, 2016.
- [151] "Desviaciones de la Ley de Lambert Beer," *facultad de farmacia*. .
- [152] "Espectroscopia UV-VIS." p. 67, 2013.
- [153] Ronson, "Uv/Vis/Ir Spectroscopy Analysis of Nanoparticles," *nanoComposix*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2012.
- [154] J. Kottmann, O. J. Martin, D. R. Smith, and S. Schultz, "Plasmon resonances of silver nanowires with a nonregular cross section," *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 64, no. 23, pp. 2354021–23540210, 2001.
- [155] M. Nasrollahzadeh, M. Atarod, M. Sajjadi, S. M. Sajadi, and Z. Issaabadi, *Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications*, 1st ed., vol. 28. Elsevier Ltd., 2019.
- [156] J. P. Patel and P. H. Parsania, *Characterization, testing, and reinforcing materials of biodegradable composites*. Elsevier Ltd, 2017.
- [157] L. Cao, Q. Huang, J. Cui, H. Lin, W. Li, and Z. Lin, "Rapid and facile synthesis of high-performance silver nanowires by a halide-mediated, modified polyol method for transparent conductive films," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 6, 2020.

- [158] X. Zhu and L. Shi, *Electrochemistry*, vol. 1. Elsevier Inc., 2018.
- [159] A. Ramanaviciene, A. Finkelsteinas, and A. Ramanavicius, "Basic electrochemistry meets nanotechnology: Electrochemical preparation of artificial receptors based on a nanostructured conducting polymer, polypyrrole," *J. Chem. Educ.*, vol. 83, no. 8, pp. 1212–1214, 2006.
- [160] D. M. Revelo and N. H. Hurtado, "Celdas de Combustible Microbianas ( CCMs ): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica Microbial," *Inf. Tecnológica*, vol. 24, no. 6, pp. 17–28, 2013.
- [161] A. G. Reyes, Alejandro Baeza, "Principios de electroquímica analítica," *Principios Electroquim. Anal.*, pp. 1–77, 2011.
- [162] S. J. E. ARIZA, L. A. G. MONROY, and I. M. S. FONTALVO, "Capítulo 2. Técnicas Instrumentales," pp. 37–56, 2018.
- [163] O. J. Guy and K. A. D. Walker, *Graphene Functionalization for Biosensor Applications*, Second Edi. Elsevier Inc., 2016.
- [164] "Reference and Auxiliary Electrodes," *LibreTexts libraries*, 2019. .
- [165] M. Gaviera Vallejo, "Potenciometría ( II ): los electrodos," 2012.
- [166] V. L. D. S. N. Button, *Electrodes for Biopotential Recording and Tissue Stimulation*. 2015.
- [167] J. X. J. Zhang and K. Hoshino, *Electrical transducers: Electrochemical sensors and semiconductor molecular sensors*. 2019.
- [168] M. C. Luna, *Tesis Doctoral Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras*. 2008.
- [169] "Ingeniería ambiental Universidad de Guanajuato," no. 3. 2012.
- [170] M. del P. Ambel Carracedo, "Desarrollo de técnicas electroanalíticas aplicables a metales en fluidos biológicos de interés biosanitario," 1999.
- [171] L. Sobrino-Gregorio, R. Bataller, J. Soto, and I. Escriche, "Monitoring honey adulteration with sugar syrups using an automatic pulse voltammetric electronic tongue," *Food Control*, vol. 91, pp. 254–260, 2018.
- [172] S. Li and A. Thomas, *Emerged carbon nanomaterials from metal-organic precursors for electrochemical catalysis in energy conversion*. Elsevier Inc., 2020.
- [173] "Estudio Potenciométrico y Voltamperométrico del Par  $Fe(CN)_6 / Fe(CN)_4$  en Disolución Acuosa de Cloruro de Potasio," no. 2. pp. 2–6, 2013.
- [174] J. Zhang, H. Zhang, J. Wu, and J. Zhang, *Techniques for PEM Fuel Cell Testing and Diagnosis*. 2013.
- [175] J. Prieto, "Voltametría Cíclica."
- [176] F. Scholz, "Cyclic Voltametry," in *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, 2009.
- [177] R. Bosque Pueyo, "Estudios ElectroQuímicos," 1994.

- [178] "Voltametría Cíclica." p. 42.
- [179] "Electroquímica experimental," *Facultad de Ingeniería (UROU)*. .
- [180] L. G. Camacho, *Estudio electroquímico y espectroelectroquímico de componentes de sales orgánicas conductoras . Formación de películas delgadas organizadas de TCNQ , TTF y Viologenos .* 2011.
- [181] B. Rezaei and N. Irannejad, *Electrochemical detection techniques in biosensor applications*. Elsevier Inc., 2019.
- [182] J. C. Ballesteros Pacheco, "" DESARROLLO DE UN BAÑO ALCALINO LIBRE DE CIANUROS PARA EL ELECTRODEPOSITO DE Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica," 2011.
- [183] L. Borlan and A. C. Michael, *Electrochemical Methods for Neuroscience*. 2007.
- [184] R. K. Franklin, S. M. Martin, T. D. Strong, and R. B. Brown, *Chemical and Biological Systems: Chemical Sensing Systems for Liquids*, no. May 2015. Elsevier Ltd., 2016.
- [185] A. Sanchez-Sanchez, I. del Agua, G. G. Malliaras, and D. Mecerreyes, *Conductive Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) (PEDOT)-Based Polymers and Their Applications in Bioelectronics*, Second Edi. Elsevier Ltd., 2019.
- [186] A. B. Engel, Y. Holade, D. Cornu, K. Servat, T. W. Napporn, and K. B. Kokoh, "Optimization of Chitosan Film-Templated Biocathode for Enzymatic Oxygen Reduction in Glucose Hybrid Biofuel Cell," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 164, no. 2, pp. G29–G35, 2017.
- [187] M. Palencia, "Revista de la Sociedad Química del Perú ( Cassava ) como material para un acumulador electroquímico de carga ( batería )," no. 1c, 2017.
- [188] "Polimeros conductores de polifiltrano. sintesis y caracterizacion electroquímica, estructura y morfología isabel carrillo ramiro," *Polimeros/Departamento de Física*. 1996.
- [189] I. Sadriu, S. Bouden, J. Nicolle, F. I. Podvorica, V. Bertagna, and C. Berho, "Molecularly imprinted polymer modified glassy carbon electrodes for the electrochemical analysis of isoproturon in water," *Talanta*, vol. 207, no. August 2019, p. 120222, 2020.
- [190] J. D. Bumgardner, V. P. Murali, H. Su, O. D. Jenkins, D. Velasquez-Pulgarin, and J. A. Jennings, *Characterization of chitosan matters*, vol. 1. 2017.
- [191] J. Giraldo, "Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano," *Univ. Concepc.*, no. MAY, 2015.
- [192] N. Paz, D. Pérez, M. Fernández, O. López, A. Nogueira, and M. Rapado Paneque, "Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta," *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 14, no. 2, pp. 84–91, 2013.
- [193] M. S. Riaz Rajoka, H. M. Mehwish, Y. Wu, L. Zhao, Y. Arfat, and K. Majeed, "Chitin/chitosan derivatives and their interactions with microorganisms: a comprehensive review and future perspectives," *Crit.*

*Rev. Biotechnol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–15, 2020.

- [194] H. Li, C. Hu, H. Yu, and C. Chen, “Chitosan composite scaffolds for articular cartilage defect repair: A review,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 7, pp. 3736–3749, 2018.
- [195] M. Valeriano, A. Gabriela, D. Narváez, G. Cristina, R. Carrillo, and R. Elena, “Estudio comparativo de obtención , caracterización y actividad antioxidante de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón estero y camarón de altamar .,” vol. 4, no. 1, pp. 1002–1013, 2019.
- [196] S. Akmaz, E. Dilaver Adgüzel, M. Yasar, and O. Erguven, “The effect of ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity,” *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2013, pp. 12–18, 2013.
- [197] L. Xu, Z. X. Zhao, Y. A. Huang, and Q. J. Zhu, “Preparation of chitosan molecularly imprinted polymers and the recognition mechanism for adsorption of alpha-lipoic acid,” *Molecules*, vol. 25, no. 2, 2020.
- [198] S. Wu, K. Yan, J. Li, R. N. Huynh, C. B. Raub, and J. Shen, “Electrical cuing of chitosan’s mesoscale organization,” *React. Funct. Polym.*, vol. 148, 2020.
- [199] L. Q. Wu, A. P. Gadre, H. Yi, M. J. Kastantin, G. W. Rubloff, and W. E. Bentley, “Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface,” *Langmuir*, vol. 18, no. 22, pp. 8620–8625, 2002.
- [200] K. Shahzadi, L. Wu, X. Ge, F. Zhao, H. Li, and S. Pang, “Preparation and characterization of bio-based hybrid film containing chitosan and silver nanowires,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 137, pp. 732–738, 2016.
- [201] X. F. Pan, H. L. Gao, Y. Su, Y. D. Wu, X. Y. Wang, and J. Z. Xue, “Strong and stiff Ag nanowire-chitosan composite films reinforced by Ag–S covalent bonds,” *Nano Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 410–419, 2018.
- [202] T. H. Bui, W. Lee, S. B. Jeon, K. W. Kim, and Y. Lee, “Enhanced Gold(III) adsorption using glutaraldehyde-crosslinked chitosan beads: Effect of crosslinking degree on adsorption selectivity, capacity, and mechanism,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 248, no. March, p. 116989, 2020.
- [203] S. A. N. Entifar, J. W. Han, D. J. Lee, Z. R. Ramadhan, J. Hong, and M. H. Kang, “Simultaneously enhanced optical, electrical, and mechanical properties of highly stretchable transparent silver nanowire electrodes using organic surface modifier,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 20, no. 1, pp. 116–123, 2019.
- [204] Z. Cheng, L. Liu, S. Xu, M. Lu, and X. Wang, “Temperature dependence of electrical and thermal conduction in single silver nanowire,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. June, 2015.
- [205] B. Bari, J. Lee, T. Jang, P. Won, S. H. Ko, and K. Alamgir, “Simple hydrothermal synthesis of very-long and thin silver nanowires and their application in high quality transparent electrodes,” *J. Mater. Chem. A*, vol. 4, no. 29, pp. 11365–11371, 2016.
- [206] M. R. Johan, N. A. K. Aznan, S. T. Yee, I. H. Ho, S. W. Ooi, and N.

- Darman Singho, "Synthesis and growth mechanism of silver nanowires through different mediated agents (CuCl<sub>2</sub> and NaCl) polyol process," *J. Nanomater.*, vol. 2014, no. Sample 1, 2014.
- [207] D. Kumar, Kavita, K. Singh, V. Verma, and H. S. Bhatti, "Microwave-assisted synthesis and characterization of silver nanowires by polyol process," *Appl. Nanosci.*, vol. 5, no. 7, pp. 881–890, 2015.
- [208] Q. Zhang, D. Jiang, C. Xu, Y. Ge, X. Liu, and Q. Wei, "Wearable electrochemical biosensor based on molecularly imprinted Ag nanowires for noninvasive monitoring lactate in human sweat," *Sensors Actuators B. Chem.*, no. May, p. 128325, 2020.
- [209] V. B. Juska and M. E. Pemble, "A dual-enzyme, micro-band array biosensor based on the electrodeposition of carbon nanotubes embedded in chitosan and nanostructured Au-foams on microfabricated gold band electrodes," *Analyst*, vol. 145, no. 2, pp. 402–414, 2020.
- [210] Z. Liu, Y. Zhang, J. Feng, Q. Han, and Q. Wei, "Ni(OH)<sub>2</sub> nanoarrays based molecularly imprinted polymer electrochemical sensor for sensitive detection of sulfapyridine," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 287, no. December 2018, pp. 551–556, 2019.
- [211] W. Guo, F. Pi, H. Zhang, J. Sun, Y. Zhang, and X. Sun, "A novel molecularly imprinted electrochemical sensor modified with carbon dots, chitosan, gold nanoparticles for the determination of patulin," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 98, no. March, pp. 299–304, 2017.
- [212] K. Anderson, B. Poulter, J. Dudgeon, S. E. Li, and X. Ma, "A highly sensitive nonenzymatic glucose biosensor based on the regulatory effect of glucose on electrochemical behaviors of colloidal silver nanoparticles on MoS<sub>2</sub>," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 8, 2017.
- [213] N. P. S. Ramesh C. Chandan, Arun Kilara, *Dairy Processing and Quality Assurance*. .
- [214] C. Cofan and C. Radovan, "Simultaneous chronoamperometric sensing of ascorbic acid and acetaminophen at a boron-doped diamond electrode," *Sensors*, vol. 8, no. 6, pp. 3952–3969, 2008.
- [215] H. Romero, T. Vera, C. García, B. Lapo, and F. Pesantez, "Desarrollo y validación de un método voltamétrico para la determinación de antimonio en medio acuoso," *II Congr. Int. Cienc. y Tecnol.*, no. Cv, pp. 736–745, 2017.