



Universidad de Valladolid



UVaSens  
SENSOR GROUP UVA

# GENERACIÓN DE PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS LANGMUIR-BLODGETT Y SU USO COMO SENSORES ELECTROQUÍMICOS

---

Máster en nanociencia y nanotecnología molecular

Autor: Cristina Fernández Sánchez

Tutor/a: María Luz Rodríguez Méndez

Co-director: Jose Luis Pura Ruiz



## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, doy gracias a mi familia, por apoyarme en todo lo que hago y valorarme aun cuando a mí me costaba.*

*Gracias a mis amigos, por ser hogar en la distancia. Es muy bonito vernos crecer.*

*Gracias a mis compañeros de laboratorio y tutora, por hacer cada día más ameno y estar siempre dispuestos a ayudarme. No podría haber elegido un grupo mejor.*

*Finalmente, quiero agradecer especialmente a Jose toda la paciencia y dedicación que ha volcado sobre mí.*

*Todos vosotros hacéis del aprendizaje un disfrute.*

## RESUMEN

La necesidad de reducir las dimensiones físicas y mejorar la especificidad química de los dispositivos utilizados en electrónica molecular ha impulsado el uso de la nanotecnología en este tipo de dispositivos. Una de las posibilidades más interesantes es la utilización de películas delgadas. La técnica Langmuir Blodgett (LB) permite generar películas nanoestructuradas que facilitan la transferencia electrónica, incrementando la intensidad de las señales electroquímicas. Se ha demostrado que la modificación de la superficie de sensores electroquímicos con elementos electrocatalíticos y/o conductores como nanomateriales o ftalocianinas pueden mejorar la sensibilidad del sensor hacia ciertos compuestos. Por ello, el diseño de sistemas híbridos que combinen diferentes materiales se ha convertido en una poderosa herramienta para el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos más eficientes. Las ftalocianinas presentan la capacidad de actuar como mediadores electrónicos en sensores voltamétricos, mejorando la transferencia electrónica entre el analito y la superficie del sensor. Por otro lado, las enzimas destacan por ser empleadas para la generación de biosensores, aportando selectividad y especificidad hacia determinados compuestos. En este trabajo, se lleva a cabo la generación de películas LB compuestas por galactosa oxidasa (GaOx), bisftalocianina de gadolinio ( $GdPc_2$ ) y ácido araquídico (AA) con el fin de combinar las propiedades de cada uno de estos componentes. Las películas nanoestructuradas se depositaron posteriormente sobre sustratos de óxido de indio y estaño (ITO) para evaluar su comportamiento electroquímico mediante voltametría cíclica. La caracterización de las capas LB se realizó a través del análisis de la isoterma de presión superficial-área (isoterma  $\pi$ -A) y el uso de microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía UV-Visible. Las películas LB depositadas fueron empleadas como sensores con el fin de analizar su respuesta electroquímica hacia galactosa. El incremento en la intensidad en los picos de los voltamogramas permitió calcular el límite de detección (LOD) y analizar la cinética de la reacción, resaltando los beneficios del método Langmuir Blodgett para la generación de películas nanoestructuradas.

## ABSTRACT

The need to reduce the physical dimensions and improve the chemical specificity of the devices used in molecular electronics has driven the use of nanotechnology in this type of devices. The Langmuir Blodgett (LB) technique allows generating nanostructured layers that facilitate electronic transfer, giving rise to an increase in the intensity of electrochemical signals. It has been demonstrated that the modification of electrochemical sensors surfaces with electrocatalytic and/or conductive elements such as nanomaterials or phthalocyanines can improve the sensitivity of the sensor towards certain compounds. For this reason, the design of hybrid systems combining different materials has become an interesting tool for the development of new and more efficient electrochemical sensors. Phthalocyanines present the ability to act as electronic mediators in voltammetric sensors by improving the electronic transfer between the analyte and the sensor surface. On the other hand, the use of enzymes stands out for being applied in the generation of biosensors, in order to add selectivity and specificity towards specific compounds. In this work, the production of LB monolayers composed of galactose oxidase (GaOx), gadolinium bis-phthalocyanines ( $GdPc_2$ ) and arachidic acid (AA) is carried out in order to combine the different properties of each component. The nanostructured films were subsequently deposited on indium tin oxide (ITO) substrates to assess the electrochemical behavior of the LB layer by voltammetry. The characterization of the LB layers was carried out through the analysis of the surface pressure-area isotherms ( $\pi$ -A isotherms), atomic force microscopy (AFM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and UV-Visible spectroscopy. The deposited LB films were used as voltammetric sensors to test their electrochemical response towards galactose. The intensity enhancement on the voltammograms' peaks allowed to calculate the limit of detection (LOD) and the kinetics of the reaction, which allows us to observe the benefits of the Langmuir-Blodgett method to create ordered nanostructured thin films.

## Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	6
1.1.	JUSTIFICACIÓN DEL TFM.....	6
1.2.	OBJETIVOS.....	6
2.	FUNDAMENTO TEÓRICO .....	7
2.1.	SENSORES.....	7
2.2.	MODIFICACIONES QUÍMICAS DE LOS SENSORES .....	9
2.2.1.	NANOMATERIALES .....	9
2.2.2.	FTALOCIANINAS.....	10
2.2.3.	ENZIMAS .....	11
2.3.	PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS .....	12
2.3.1.	MONOCAPAS DE LANGMUIR-BLODGET (LB) .....	12
2.3.2.	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURALDE LAS PELÍCULAS DELGADAS LB .....	16
2.4.	TÉCNICAS DE DETECCIÓN VOLTAMETRÍA .....	16
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1.	REACTIVOS.....	18
3.2.	PREPARACIÓN DE LB FILMS <i>GdPc2/AA/GaOx</i> .....	18
3.3.	CARACTERIZACIÓN DE LAS MONOCAPAS.....	19
4.	RESULTADOS .....	20
4.1.	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	20
4.2.	CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA .....	22
4.3.	ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA DE OTROS COMPUESTOS SOBRE LA RESPUESTA A GALACTOSA.....	25
5.	CONCLUSIONES .....	27
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	29

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. JUSTIFICACIÓN DEL TFM

El presente trabajo, titulado “*Generación de películas nanoestructuradas Langmuir-Blodgett y su empleo como sensores electroquímicos*” ha sido llevado a cabo en el grupo de sensores de la Universidad de Valladolid (UvaSens). Se trata de un equipo multidisciplinar con sede en la escuela de Ingenierías Industriales dirigido por la profesora María Luz Rodríguez Méndez del Departamento de Química Física y Química Inorgánica. Este grupo ha desarrollado en los últimos años nuevos materiales y métodos de análisis basados en sensores electroquímicos, especializándose en el diseño y optimización de redes de sensores para su aplicación en el campo de la alimentación. Desde el año 1992 mantiene dos líneas de investigación, una básica sobre el diseño, preparación y caracterización de películas nanoestructuradas para su posible aplicación como sensores; y una línea de investigación aplicada, dedicada a diseñar redes de sensores especializados en el ámbito del análisis y control de calidad en la industria alimentaria, como por ejemplo el análisis de productos lácteos mediante la aplicación de leguas electrónicas.

El éxito derivado de la combinación de diferentes materiales electrocatalíticos, así como enzimas en la generación de biosensores y el empleo de películas delgadas utilizando diferentes métodos tanto de generación como deposición, ha sido muy explotado en los últimos años con el fin de mejorar la sensibilidad, reproducibilidad y especificidad de los sensores electroquímicos enfocados a la industria. Los buenos resultados previamente reportados con respecto a la sinergia entre ftalocianinas y enzimas nos han llevado a la combinación de ambos compuestos para la elaboración de sensores específicos para la galactosa con el fin de poder ser empleados en un futuro en el análisis de bebidas tales como leche o zumos.

## 1.2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- El diseño de nuevos biosensores voltamétricos mediante la combinación de enzimas que aportan especificidad (galactosa oxidasa) con un material que actúa de mediador electrónico (bis-ftalocianina de gadolinio).
- Generar películas nanoestructuradas mediante la técnica de Langmuir-Blodgett y estudiar las ventajas que supone sobre la calidad del sensor con respecto a otras técnicas de deposición (*drop cast*).
- Caracterizar estructuralmente la monocapa flotante y las películas transferidas con respecto a su homogeneidad, área por molécula y composición.
- Caracterizar la respuesta electroquímica del sensor frente a galactosa: conocer los límites de detección y analizar la cinética de la reacción.
- Analizar el funcionamiento del sensor frente a galactosa en presencia de otros analitos (análisis de las interferencias).

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. SENSORES

El desarrollo de la sociedad y la industrialización requiere de herramientas simples, baratas y portables para la medición de determinados compuestos. El progreso en la ciencia de materiales, así como otras ramas de investigación, han dado lugar a la evolución de los sensores químicos, siendo utilizados en el análisis de una gran variedad de analitos. Un sensor químico es un dispositivo que convierte una señal química (concentración, presión, actividad enzimática, etc) en analítica para obtener información cualitativa o cuantitativa resuelta en el tiempo y/o espacio sobre un componente químico específico. Esa señal química es creada a través de la interacción selectiva entre el material sensitivo del sensor y el analito diana. Posteriormente, la señal generada es transformada en una señal electrónica observable mediante un transductor[1].

En general, los sensores presentan dos componentes funcionales: un elemento de reconocimiento que proporciona una unión selectiva / específica con el analito y un componente transductor que traduce la señal derivada de la interacción entre el sensor y la solución. En otras ocasiones, también es necesario otro elemento procesador de la señal para amplificar la señal del transductor, visualizarla o grabar la respuesta final. El material sensible, también denominado selectóforo, es la parte más importante del sensor y dicho elemento es seleccionado o diseñado en función de la naturaleza del analito diana.

Los sensores químicos pueden ser clasificados en función tanto del compuesto a detectar como del medio de detección, así pues, tenemos sensores electroquímicos (potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, impedimétricos, conductimétricos), ópticos (absorbancia, luminiscencia, reflectancia, etc), térmicos o de masa. La combinación de datos de diferentes tipos de sensores puede ayudar a determinar la huella dactilar de una determinada sustancia, permitiendo una mejor identificación y clasificación de esta. Esto se logra gracias a la multi-transducción, es decir, midiendo diferentes propiedades de un mismo sensor, como puede ser el empleo de sensores ópticos y electroquímicos separados físicamente.

Los sensores de masa son dispositivos sólidos miniaturizados que explotan el efecto piezoeléctrico. Muchos de los sensores de masa desarrollados con el fin de analizar muestras líquidas se basan en una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, del inglés *quartz crystal microbalance*), el cual consiste en un piezoeléctrico de cristal de cuarzo oscilante que presenta resonancia a una frecuencia fundamental. Los cambios en la frecuencia de resonancia están asociados a cambios en la masa de las sustancias adheridas a la superficie del electrodo[4]. Por otra parte, los sensores ópticos se basan en la interacción entre la luz y la materia con el fin de determinar algunas de las propiedades de esta última. Estos sensores incluyen una fuente de excitación, un elemento sensitivo, un fotodetector y un circuito electrónico, esa fuente de luz se establece a una longitud de onda específica para obtener la mayor sensibilidad. El sensor puede presentar una capa quimiosensible cuyas propiedades ópticas cambien al ser expuesto al analito, provocando un cambio en la absorbancia o intensidad de fluorescencia de la membrana. Esos cambios son recogidos por el detector (fotodiodo o fotomultiplicador), el cual transforma la señal óptica a una eléctrica. Existen varios tipos de sensores ópticos en función de qué es lo que se desea detectar: la intensidad o adquisición de fluorescencia, o bien la absorbancia o reflectancia[5].

En comparación con los sensores ópticos, de masa y térmicos, los sensores electroquímicos (incluidos potenciométricos, amperimétricos, voltamétricos e impedimétricos) resultan especialmente atractivos como unidades sensitivas debido a su especificidad, sensibilidad, rápida respuesta y simplicidad de operación. Dentro de los sensores electroquímicos, nosotros nos centraremos en los voltamétricos, los cuales han sido utilizados en el presente trabajo. Las interacciones que tienen lugar entre el sensor y el compuesto a analizar incluyen, entre otras: (1) el carácter oxidante/reductor de la solución que puede modificar el potencial oxidativo del electrodo, (2) la actividad electrocatalítica del electrodo que puede facilitar la oxidación de los compuestos disueltos en la solución, (3) el carácter ácido o básico de la solución que puede protonar/desprotonar el electrodo y (4) la naturaleza/concentración de iones presentes en la solución que se difunden dentro de la capa del sensor para mantener la electroneutralidad[2]. La eficiencia de los sensores depende de estos dos componentes ya que definen el proceso de reconocimiento en términos de tiempo de respuesta, relación señal / ruido, selectividad y límites de detección[3].

En este tipo de sensores, la concentración de determinados iones en una solución puede ser cuantificada midiendo el potencial de membrana creado a través de la interfase membrana/solución bajo un potencial variable. Dicho potencial depende de la naturaleza del material que conforma el electrodo y de la composición de la solución. Las curvas obtenidas como resultado del análisis son denominadas voltamogramas y los picos que presentan se deben a la oxidación/reducción de las moléculas presentes en la solución, de manera que la intensidad de dichos picos es proporcional a su concentración. La voltametría incluye diferentes técnicas de análisis electroquímico como son la voltamperometría cíclica, voltamperometría de onda cuadrada y voltamperometría diferencial de pulsos, haciendo de ésta una técnica versátil para el análisis. Este tipo de sensores han sido ampliamente aplicados en lenguas electrónicas voltamétricas, las cuales están compuestas por una serie de sensores químicos no específicos con sensibilidad cruzada que pretenden mimetizar el sentido del gusto para el análisis de diferentes compuestos en solución. Este tipo de sistemas se enfocan en la industria alimentaria tanto para el análisis de mostos como de vinos [6], además de para el análisis de otras bebidas como cervezas, zumos, té, leche[7] o café[8][3].

Los sistemas multisensor basados en sensores electroquímicos modificados con materiales orgánicos tales como nanomateriales, ftalocianinas o enzimas (biosensores) han sido desarrollados con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad del sensor hacia ciertos compuestos incrementando las interacciones entre el sensor y la solución a analizar[9]. La modificación de la superficie del electrodo con materiales electrocatalíticos (p.e. ftalocianinas, polímeros conductores o nanopartículas) incrementa la selectividad del electrodo[3][10][11]. En el caso de los electrodos voltamétricos, los voltamogramas muestran picos redox asociados no solo a la solución sino también al electrodo. Las interacciones entre el electrodo y la solución mejoran extraordinariamente incrementando dicha selectividad. Estas interacciones dan lugar a cambios en las intensidades y posiciones de los picos redox y muestran la importancia de la reactividad cruzada conseguida con estos sensores.

La combinación de la nanotecnología y bioelectrónica proporciona un nuevo abanico de posibilidades para la miniaturización y optimización de dispositivos a microescala y nanoescala. Hace posible la medición de propiedades eléctricas específicas de una manera mucho más precisa en combinación con varios transductores electroquímicos. Este tipo de dispositivo se denomina biosensor, ya que presenta un componente biológico acoplado a un transductor que transformará la señal biológica en una señal eléctrica. El elevado ratio superficie/volumen de los

nanomateriales incrementa la susceptibilidad de sus propiedades eléctricas a influencias externas. Teniendo en cuenta que la dimensión nanométrica de estos objetos es comparable con el tamaño de las biomoléculas a analizar, se puede obtener una mejora en la selectividad y sensibilidad analítica.

## 2.2. MODIFICACIONES QUÍMICAS DE LOS SENSORES

Para el análisis de componentes presentes en las soluciones a analizar se han desarrollado un gran número de biosensores electroquímicos que combinan la presencia tanto de enzimas como otros materiales, como matrices poliméricas o nanomateriales. Estas modificaciones han permitido obtener sensores con propiedades analíticas diferentes/complementarias. La finalidad de la incorporación de estos compuestos se basa en incrementar su eficacia y especificidad frente el compuesto a analizar.

### 2.2.1. NANOMATERIALES

Algunas de las características más importantes de los sensores son la diversidad de materiales aplicados en su generación, así como su sensibilidad, precisión informativa, selectividad y estabilidad. Es por ello que, dentro de las modificaciones químicas que se pueden realizar sobre estos sensores para su mejora y optimización, nos encontramos con nanomateriales, tales como nanopartículas metálicas[12][13], nanopartículas de óxido metálico[14], nanotubos de carbono[11] o grafeno[15], [16], polímeros y bio-nanomateriales[17].

La reducción en el tamaño de los materiales da lugar a tres cambios principales: (1) cambios estructurales en los que las propiedades de los materiales podrían alterarse, (2) cambios en las propiedades electrónicas debido al efecto de confinamiento cuántico y (3) elevado ratio superficie/volumen, lo cual aumenta la superficie disponible para el intercambio de electrones. Todas estas propiedades se pueden ajustar variando su tamaño, forma y entorno químico. La ventaja en el uso de nanomateriales reside precisamente en la variedad de sus propiedades como son la resonancia de plasmones, conductividad, comportamiento redox, propiedades electrocatalíticas, propiedades magnéticas, térmicas y ópticas; dando lugar a respuestas más intensas y detectables.

Los nanosensores son dispositivos sensitivos en los que al menos uno de sus componentes de detección presenta un tamaño inferior a 100nm. Pueden ser empleados como sensores químicos en diferentes áreas como la industria, en el control de calidad de los alimentos; o el medio ambiente, midiendo la calidad del aire y agua[17].

Los nanomateriales a base de carbono tales como los nanotubos de carbono (CNTs), el grafeno y el carbono nano/mesoporoso, tienen una amplia gama de aplicaciones incluyendo la monitorización de iones de metales pesados, moléculas de gas, aditivos alimentarios, anticuerpos y pesticidas tóxicos, así como para bioimagen. Presentan excelentes propiedades tales como buena conductividad, elevada estabilidad, bajo coste, amplias ventanas de potencial y fácil funcionalización de su superficie. Su estructura nanométrica permite que los grupos de la superficie se expongan de manera eficiente para la unión entre el analito y el material que transduce la señal, dando lugar a una elevada eficiencia en la detección de contaminantes ambientales.

Por otro lado, las características fisicoquímicas, espectrales y ópticas de las nanopartículas metálicas y de metales nobles han permitido sintetizar nuevos biosensores. Diversos metales tales como Au, Pt, Pd, Ag, Cu, Co y metales de tierras raras han sido empleados para la generación de nuevos sensores ya que se ha observado que aumentan tanto la sensibilidad como la selectividad a través de la amplificación de señales específicas[12][18]. Las películas delgadas y nanopartículas de óxidos de metales presentan numerosas ventajas como su elevada área/superficie, bajo coste y propiedades únicas. Estos nanomateriales se han utilizado ampliamente para fabricar nanosensores con alta eficiencia que se pueden utilizar en diferentes análisis tanto ambientales como de procesos, incluyendo combustión y emisiones, refinera de petróleo y tecnologías de energía renovable[14]. Por último, los materiales poliméricos y bio-nanomateriales presentan una rápida respuesta y selectividad gracias a sus propiedades eléctricas, catalíticas, mecánicas, térmicas y físicas[17].

### 2.2.2. FTALOCIANINAS

En los últimos años, se ha prestado especial atención a los compuestos fenólicos, los cuales conforman un grupo de sustancias activas presentes en alimentos con actividad antioxidante. Dentro de los compuestos con actividad antioxidante, los polifenoles son de gran interés debido a sus beneficios en la salud, reduciendo el riesgo de padecer cáncer y cardiomiopatías coronarias. Estos compuestos han sido analizados a través de diversos métodos tales como cromatografía, electroquímica, espectroscopía y otras técnicas ópticas. Entre las diversas técnicas disponibles, destacan las electroquímicas debido a su elevada sensibilidad y a su portabilidad[19]. La fabricación de matrices de sensores voltamétricos químicamente modificados con materiales electroactivos como las ftalocianinas han demostrado ser de gran interés para el análisis de compuestos fenólicos. Los voltamogramas de cada uno de los sensores que forman el conjunto muestran picos redox producidos por el material que compone el electrodo, así como la respuesta de la solución. Además, las interacciones entre el electrodo y la solución producen cambios en las posiciones de los picos y su intensidad. De este modo, cada electrodo produce una respuesta distintiva frente a diferentes soluciones[20].

Las ftalocianinas han demostrado tener la habilidad de actuar como mediadores electrónicos en biosensores voltamétricos, en los cuales han sido utilizadas para facilitar la transferencia electrónica entre la enzima y la superficie del sensor[21]. Las matrices de sensores generados mediante diferentes moléculas de ftalocianina han demostrado tener un elevado grado de selectividad cruzada y han sido utilizados con éxito en el análisis de soluciones modelo de sabores básicos y otros líquidos complejos de interés industrial tales como vinos[22], por eso han sido ampliamente utilizadas en la generación de lenguas electrónicas[9][22]–[24].

Las metaloftalocianinas (MPcs) son una interesante elección para la generación de biosensores debido a su variada actividad electroquímica y propiedades catalíticas. En MPcs, el anillo de ftalocianina (estado de oxidación -2) se coordina con un amplio rango de iones de metales de transición (estado de oxidación +2). En comparación con las MPcs, las bis-ftalocianinas, en las que dos anillos de Pc están coordinados con un ion central han demostrado poseer grandes cualidades en electroquímica asociadas a la variedad de estados de oxidación accesibles, rápida transferencia electrónica y gran capacidad como mediadores electrónicos[19][25]. Se trata de moléculas muy versátiles, ya que sus propiedades de detección pueden modularse variando la naturaleza del ion central de tierras raras y/o introduciendo sustituyentes en los anillos de ftalocianina[26]. Su estructura electrónica caracterizada por la presencia de electrones desapareados y la interacción intramolecular entre ligandos con sistemas  $\pi$ , permiten generar

complejos tipo “sándwich” que presentan numerosas aplicaciones, incluyendo la fabricación de sensores para la detección de una gran variedad de analitos, como pueden ser compuestos fenólicos[27][3].

Los beneficios derivados del uso de este tipo de ftalocianinas en sensores electroquímicos han sido reportados en numerosas ocasiones en el caso de las bis-ftalocianinas de lantánidos, las cuales han demostrado poseer excelentes cualidades electroquímicas frente a diferentes compuestos como hidroquinona, catecol, ácido cafeico, ácido vainillínico, ácido gálico o glucosa, convirtiéndolas en moléculas aplicables a la discriminación de fenoles en uvas y vinos[25][22]. Por otra parte, el diseño de sistemas híbridos combinando diferentes materiales electrocatalíticos resulta interesante para el desarrollo de sensores electroquímicos. La combinación de nanopartículas de oro (AuNPs) y bis-ftalocianinas bien por spin coating o Langmuir-blodgett ha obtenido resultados favorables, demostrando una actuación sinérgica entre las bis-ftalocianinas y las nanopartículas[25][28]. No obstante, este efecto sinérgico no ha sido únicamente observado entre bis-ftalocianinas y AuNPs, se han dado efectos electrocatalíticos similares en electrodos cubiertos con nanopartículas metálicas y otros materiales orgánicos[29][30].

### 2.2.3. ENZIMAS

La incorporación de enzimas en la superficie de los sensores da lugar a los llamados biosensores. Estas enzimas incrementan la especificidad de los biosensores frente a determinadas moléculas mejorando así su eficacia analítica. Las enzimas son macromoléculas biológicas que se encargan de la catálisis de reacciones químicas, dando lugar a una aceleración de la reacción química mediante la disminución de la energía de activación. Además, no son consumidas en el transcurso de la reacción ni alteran el equilibrio entre las especies involucradas en la misma. A excepción de algunos grupos de moléculas, como el RNA catalítico, todas las enzimas son proteínas compuestas por una cadena de aminoácidos que determina la configuración estructural del enzima y, por tanto, su actividad catalítica depende de la conformación proteica nativa de la enzima. La desnaturalización o pérdida de subunidades de la enzima suele conllevar la pérdida de su actividad catalítica. La catálisis tiene lugar en una pequeña región de la enzima denominada sitio activo, el cual retiene el sustrato mediante aminoácidos específicos de esa región mientras la reacción tiene lugar. La especificidad de los aminoácidos del sitio activo frente al sustrato es lo que hace que la enzima sea específica para la catálisis de una determinada reacción. Sin embargo, en ocasiones una misma enzima puede intervenir en la catálisis de diferentes compuestos. La actividad enzimática depende en gran medida de las condiciones del medio (pH, temperatura, concentración de la enzima, concentración del sustrato, etc) ya que pueden afectar a su conformación y afinidad por el sustrato. Además, las enzimas pueden verse afectadas por la presencia de otros compuestos como cofactores, coenzimas o moléculas reguladoras (activadores o inhibidores) que actúen a favor o en contra de la actividad enzimática[31].

Algunas de las enzimas utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos o azúcares son la tirosinasa y lacasa (oxidasas de fenoles), la glucosa oxidasa y la D-fructosa deshidrogenasa. La selectividad cruzada de un sistema multisensor puede ser optimizada mediante la generación de matrices híbridas que combinen sensores de baja especificidad con biosensores compuestos por enzimas que sean selectivas frente a específicos compuestos de interés[22]. En este trabajo, se hace uso de la enzima galactosa oxidasa, la cual se trata de una metaloenzima de cobre que se encuentra mayormente en hongos *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium graminearum* y *Dactylium*

*dendroides*. Es categorizada como una enzima mononuclear de cobre compuesta por un único polipéptido con una masa molecular de 68kDa. Cataliza la oxidación de isómeros D de un gran rango de alcoholes primarios tales como D-galactosa, dihidroxiacetona (DHA), así como benzil alcoholes substituidos; hacia su forma aldehído acoplada a la reducción de dioxígeno a peróxido de hidrógeno. El cobre (Cu) presente en el centro activo de la enzima se coordina con los residuos Tyr495, His496, His581 y Tyr272. En dicho sitio activo, Cu y Tyr272 pueden presentar diferentes estados de oxidación: el estado catalíticamente activo con Cu (II) y radical tirosilo, el estado intermedio con Cu (II) y tirosina, y el estado más bajo con Cu (I) y tirosina[32].

Finalmente, la inmovilización de metaloenzimas redox en electrodos resulta interesante tanto para el estudio de sus propiedades catalíticas mediante métodos electroquímicos, como para su aplicación en dispositivos bio-electroquímicos tales como biosensores. Entre los métodos de inmovilización, destaca el uso de matrices poliméricas adhesivas[33] o la generación de enlaces covalentes mediante entrecruzamiento (*cross-linking*)[34]. Con respecto a los sustratos empleados, principalmente se hace uso de cristales ITO (*Indium Tin Oxide*), electrodos de carbono o BDD (*Boron-doped Diamond*). Sin embargo, es posible llevar a cabo su inmovilización mediante técnicas que permitan controlar mejor la estructura del sensor como es el caso del empleo de la técnica Langmuir-Blodgett utilizada en este trabajo[35]–[37].

### 2.3. PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS

Los denominados *thin films* o películas delgadas de compuestos orgánicos surgen con el objetivo de reducir el tamaño y mejorar las propiedades químicas de los dispositivos utilizados en electrónica molecular. Los sensores nanoestructurados muestran una mayor sensibilidad y una mejor reproducibilidad que las películas no nanoestructuradas. Estudios electroquímicos también indican que las películas nanoestructuradas muestran cinéticas más rápidas, permitiendo que el analito interactúe con los sitios moleculares más fácilmente, incrementando así la intensidad de la señal y reduciendo los límites de detección[38]. Por ello, se han desarrollado diversas técnicas que aportan un mayor control sobre la estructura resultante y dan lugar a películas con una mejor relación superficie/volumen, facilitando la difusión de iones dentro de la película/capa. Entre las más habituales podemos encontrar: Langmuir-Blodgett (LB), *Layer-by-Layer* (LbL), técnicas de autoensamblaje (*Self-assembly*) o electrodeposición (EDP)[38]. Como ya se ha mencionado, este trabajo se centrará especialmente en la técnica LB.

#### 2.3.1. MONOCAPAS DE LANGMUIR-BLODGETT (LB)

La técnica de Langmuir-Blodgett permite generar capas delgadas homogéneas y de elevado orden molecular, así como controlar su espesor permitiendo reducir el grado de este hasta la escala nanométrica dando lugar a nanoestructuras. Además, un gran número de compuestos orgánicos pueden utilizarse en la generación de estas capas lo cual les aporta un gran potencial de aplicación en diversos campos, siendo utilizados en electrónica molecular, en la fabricación de sensores de gases y biosensores, en membranas separadoras de gases, etc[38].

Esta técnica fue desarrollada por Irving Langmuir y Katarine Blodgett entre los años 1917 y 1935. Consiste en preparar multicapas de moléculas sobre un soporte sólido a partir de monocapas previamente ordenadas formadas sobre la superficie de una subfase líquida. El equipo utilizado consta de una cubeta hidrofóbica denominada balanza LB que se llena de la subfase, junto con

un medidor de presión/tensión superficial, una barrera móvil que comprime las moléculas presentes en el agua a una velocidad controlada, un sistema de inmersión del sustrato sólido para la transferencia de la monocapa (*dipping system*) y un sistema de termostatación[39].

La ordenación de las moléculas en la subfase líquida se basa en el fenómeno de la tensión superficial derivado de la interrupción de la red de puentes de hidrógeno presentes en la subfase. La tensión superficial del agua a 20°C es de 73mN/m. Cuando una solución de una sustancia anfifílica se coloca en la superficie del agua, esta se extiende cubriendo toda el área disponible. Esta solución suele tener un componente orgánico el cual se evapora rápidamente haciendo que las moléculas queden en la superficie de la subfase formando una monocapa, la cual presenta los grupos polares inmersos en agua y las colas hidrofóbicas fuera de la superficie en un orden aleatorio. En estas condiciones, la distancia entre las moléculas es grande, existen pocas interacciones entre ellas y ejercen relativamente poco efecto sobre la tensión superficial, dando lugar a lo denominado “gas bidimensional”. Una vez que el disolvente orgánico se ha evaporado, las moléculas se comprimen mediante la barrera del dispositivo haciendo que se aproximen e interaccionen lo cual aumenta la tensión superficial. Estas interacciones hacen que las moléculas se ordenen en la interfase aire-agua dando lugar a una monocapa de Langmuir[40].

La representación de la presión superficial en función del área de superficie de agua disponible por cada molécula se denomina isoterma, puesto que los experimentos se realizan a temperatura constante. La forma de las isotermas es un reflejo de las interacciones presentes entre la monocapa de Langmuir y la subfase acuosa, y las interacciones intermoleculares en la propia monocapa. A medida que disminuye el área superficial, aumenta la presión, debido a que las moléculas se van comprimiendo y las colas hidrofóbicas aumentan sus interacciones dando lugar a un “líquido bidimensional”. A presiones más altas se produce un cambio en la pendiente de la recta la cual pasa a ser una recta prácticamente vertical debido a que se pasa a un estado “sólido bidimensional” con una compresibilidad estable, pero menor que la anterior (Figura 1). La extrapolación de esta porción lineal a presión cero nos aporta el valor del área por molécula ( $A_0$ ) para el caso hipotético de una monocapa de moléculas compacta, la cual viene determinada por el corte de dicha recta con el eje de abscisas (Figura 1A). A partir de este punto, el aumento de la compresión da lugar a un colapso molecular de compresibilidad infinita, esto hace que las moléculas se deslicen unas encima de otras dando lugar a capas desordenadas. Las isotermas también pueden aportar información acerca del ordenamiento más probable de las moléculas en la monocapa mediante la comparación entre el área real de cada molécula y el valor obtenido mediante la isoterma, así se puede, por ejemplo, obtener información sobre si las moléculas en la monocapa presentan algún grado de inclinación. Otra forma de conocer la disposición de las moléculas se basa en el análisis de las variaciones de potencial superficial al comprimir la monocapa. No obstante, su interpretación es difícil ya que los cambios de potencial relativos al agua pura se deben tanto a la estructura molecular de la monocapa como a los cambios inducidos por la monocapa en la superficie del agua[41].

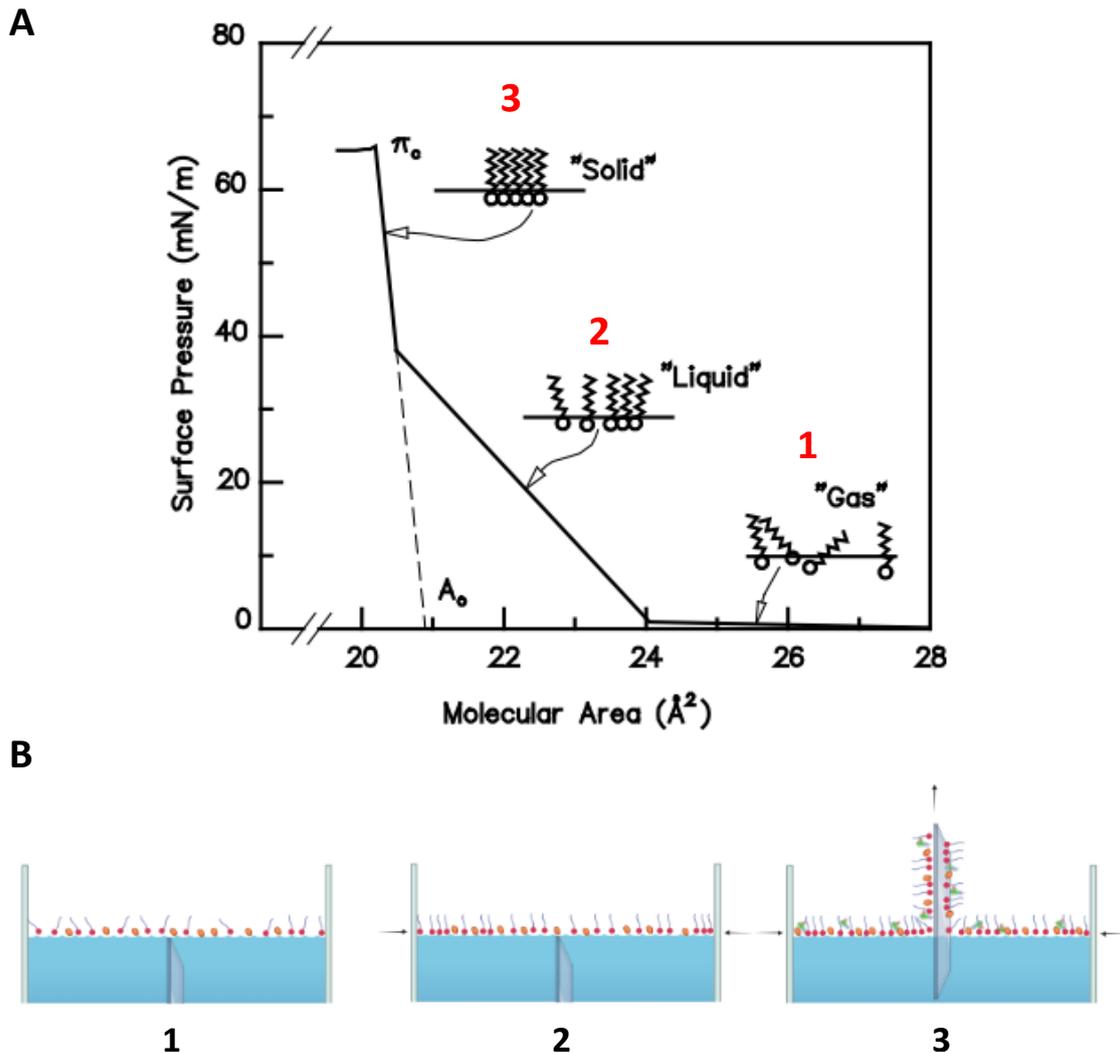


Figura 1. (A) Isotherma idealizada de una monocapa compuesta por una molécula anfifílica típica[42]. (B) Representación de las tres fases del proceso de formación de la monocapa flotante sobre la superficie de la subfase: (1) Gas bidimensional, (2) líquido bidimensional, (3) sólido bidimensional y transferencia.

Para la transferencia de las monocapas a sustratos sólidos, lo más habitual es distribuir las moléculas en la superficie de la subfase y comprimirlas hasta que la presión alcance el valor en el cual se llega a la fase “sólido bidimensional” (10-40mN/m). Manteniendo dicha presión constante, se sumerge el sustrato lentamente (1 mm/s) de manera perpendicular a la superficie, consiguiendo así que las moléculas se transfieran al soporte sólido a medida que éste se va sumergiendo. El proceso se puede repetir dando lugar a varias capas sobre la superficie. No obstante, nos encontramos con diferentes tipos de deposición en función de las características de la superficie donde se realiza la transferencia (Figura 2):

- Tipo Y. Superficie hidrofílica, de manera que al bajar no hay deposición, pero al subir el agua moja la superficie generando un menisco, el cual se seca dejando una capa de moléculas en la cual los grupos hidrofílicos están colocados de cara a la superficie hidrofílica. Cuando el cristal vuelve a bajar ocurre el proceso contrario puesto que ahora la superficie es hidrofóbica de manera que la segunda capa se deposita con las cadenas hidrofóbicas en contacto con las otras cadenas de la primera capa, quedando la parte

hidrofílica hacia fuera. Si se quiere generar una tercera capa, el proceso será el mismo que para la primera capa y así sucesivamente. Distribución cabeza-cabeza o cola-cola.

- Tipo Z. Sustrato hidrofílico. Mecanismo similar al tipo Y, con la diferencia de que la capa sólo se deposita al subir, dando lugar a una disposición de las capas cola-cabeza. Este es el tipo de deposición que nos encontramos en las películas generadas en este trabajo.
- Tipo X. Sustrato hidrofóbico. La monocapa sólo se deposita al bajar, por tanto, nos encontraremos con una disposición cabeza-cola.

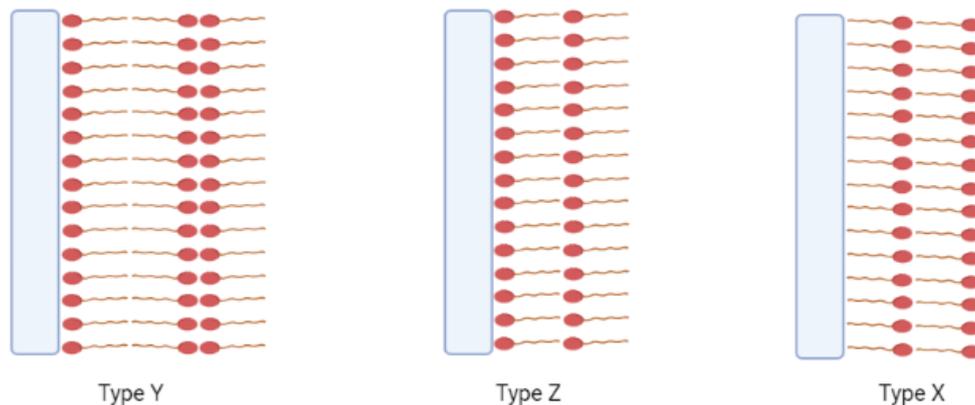


Figura 2. Tipos de deposición.

Para depositar la monocapa sobre un soporte sólido, la presión debe mantenerse constante mediante el movimiento de la barrera puesto que al transferir las moléculas estamos disminuyendo la presión. Para ello, se emplea un sistema de retroalimentación o *feedback* en el cual la señal recibida correspondiente al medidor de presión se compara con la presión seleccionada como presión de transferencia, esa diferencia de señal activa el mecanismo de la barrera haciendo que esta se mueva hasta igualar los valores[41].

No se conocen bien los mecanismos por los cuales ocurre la transferencia al sustrato sólido. Sin embargo, se puede conocer el coeficiente de transferencia que hace referencia a la calidad del proceso de transferencia:

$$r = AL/A$$

AL= disminución del área ocupada por la monocapa en la superficie del agua

A= área del sustrato sólido cubierto por la monocapa

Valores cercanos a 1 para este coeficiente de transferencia indican una correcta deposición de cada una de las películas transferidas.

Las moléculas más utilizadas en la generación de la monocapa son los ácidos grasos, debido a que se trata de moléculas anfífilas (insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos). No obstante, se está llevando a cabo el uso de otros compuestos para mejorar las propiedades de estas películas como las porfirinas, ftalocianinas, oligotiofenoles, quinonas aromáticas policíclicas o polímeros[38].

En este trabajo se analizará el efecto sinérgico causado por interacción de dos materiales electrocatalíticos, bis-ftalocianinas de gadolinio (*GdPc<sub>2</sub>*) junto con la enzima galactosa oxidasa

(GaOx) con el fin de optimizar la actividad de sensores para el análisis de compuestos específicos en solución. Se hace uso de este método debido a que permite la inmovilización de ftalocianinas, enzimas u otras moléculas de interés en una capa lipídica nanoestructurada gracias a la interacción de los grupos COOH. Como resultado, se obtiene una estructura similar a la de las membranas biológicas, lo cual ayuda a preservar la conformación y funcionalidad de las moléculas inmovilizadas. Además, la co-inmovilización de la enzima y el mediador electrónico en una misma capa facilita la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo[3].

### 2.3.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PELÍCULAS DELGADAS LB

El primer paso en la caracterización de las capas es la obtención de la isoterma específica para la mezcla de compuestos que la conforman. Dicha gráfica aporta información acerca de la presión a la cual ocurre el colapso, así como del área ocupada por molécula en la monocapa. Además de la caracterización de la estructura mediante isoterma, las capas pueden ser analizadas por microscopía de ángulo de Brewster (*Brewster Angle Microscopy*, BAM), que permite observar en directo la formación de la capa durante su compresión. Una vez obtenida la isoterma, se utilizan los datos proporcionados por estas gráficas para transferir las monocapas a un sustrato sólido y dar lugar a las películas LB. Tras la transferencia, existen diversos métodos para su caracterización como la elipsometría para medir su espesor, la difracción de rayos X, difracción de electrones o difracción de neutrones para caracterizarlas estructuralmente; la microscopía de efecto túnel (STM) o la microscopía de fuerza atómica (AFM), entre otras. Esta última nos permite obtener imágenes directas de la superficie a escala de nanómetros, lo cual resulta muy útil en la caracterización de capas LB per se o de capas LB modificadas con nanomateriales. Se basan en el barrido de la superficie por una punta metálica (tip) que actúa como sensor de la geometría de la superficie de la muestra. Las ventajas que presenta son: gran resolución, obtención de imágenes 3D, técnica no invasiva y posibilidad de operar en diferentes ambientes (vacío, aire y líquido). AFM mide las fuerzas interatómicas entre el tip unido a un vástago flexible y la superficie de la muestra. De manera que la imagen se obtiene midiendo la respuesta elástica de las moléculas a la fuerza ejercida por el tip (fuerzas desde  $10^{-6}$  N en aire a  $10^{-11}$  N en líquido).

En el caso de que dichas capas sean incorporadas a superficies sólidas como potenciales sensores, también se requiere su caracterización electroquímica la cual se puede llevar a cabo mediante voltametría cíclica, potenciometría, amperometría o espectroscopía de impedancias, con el fin de conocer su respuesta a diferentes compuestos en disolución y, por tanto, su sensibilidad y efectividad como sensores electroquímicos[27].

## 2.4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN VOLTAMETRÍA

En las técnicas voltamétricas, el potencial del electrodo varía mientras se monitoriza la corriente inducida. Esto ocurre debido a que el electrodo se polariza, es decir, se produce la desviación del potencial del electrodo de su valor de equilibrio. El grado de desviación se denomina sobrepotencial ( $\eta$ ) y se define como:

$$\eta = E_{\text{electrodo}} - E_{\text{equilibrio}}$$

Es decir, se mide la diferencia de potencial (voltios) frente a un electrodo de referencia (RE), el cual tiene un potencial fijo. Este potencial es una función del ratio de las formas oxidadas y reducidas del material electroactivo. El electrodo en el cual se producen las variaciones de

potencial se denomina electrodo de trabajo (WE). También se incorpora un tercer electrodo denominado contraelectrodo (CE), el cual facilita el paso de corriente (amperios) hacia el WE. De manera que en este sistema el potencial del WE se medirá en referencia al RE y la corriente que pasa a través de WE se mide en referencia al CE. El sobrepotencial puede tener valores positivos o negativos en función de si la electroquímica es anódica o catódica, respectivamente. En la mayoría de voltametrías, la fuente de energía es el potencióstato, nombre que procede de “poten-“ (voltaje) y “-stat” (se mantiene estable)[43].

En voltametría cíclica (CV), el potencial varía desde un potencial inicial hasta uno final. Al final de este barrido lineal, la dirección del escaneado de potencial se invierte, yendo desde ese potencial final hacia el inicial dando lugar a un ciclo. El potencial en el cual se revierte se denomina potencial de cambio ( $E_{\lambda}$ ) y da lugar a un voltamograma cíclico en el que se generan picos en el lado directo e inverso. La magnitud de la corriente es proporcional a la concentración, por tanto  $I_p(\text{forward}) = I_p(\text{reverse})$ , siendo  $I_p$  la corriente del pico. Si los valores de potencial van de positivo a negativo, se producirá un pico de reducción en dirección *forward* y otro de oxidación en dirección *reverse*; y viceversa si el potencial va de negativo a positivo[43].

Para que un proceso se considere reversible, la diferencia entre  $E_{pa}$  y  $E_{pc}$  (los valores de potencial en el pico catódico y anódico) debe estar en torno a 59 mV/n (siendo n el nº de electrones que se intercambia en cada especie). Por otro lado, cuando tenemos un voltamograma en el que  $I_{pc} < I_{pa}$ , significa que una fracción del elemento nuevo formado ha sido consumido por otra reacción en la solución[43].

La intensidad de la corriente en CV es proporcional a la concentración de analito. Además, la intensidad también depende de la velocidad de barrido, siguiendo la ecuación de **Randles-Sevcik**[44][45]:

$$I_p = 0.4463nFA \left(\frac{nF}{RT}\right)^{\frac{1}{2}} D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C_{\text{analito}}$$

Donde:

$I_p$  = magnitud del pico de corriente

n = nº de electrones que se transfieren por especie

F = Constante de Faraday

R = Constante de los gases ideales

T = Temperatura

A = área del electrodo

D = coeficiente de difusión

v = velocidad de barrido

$C_{\text{analito}}$  = concentración del analito

La representación gráfica de la intensidad ( $I_p$ ) frente  $v^{\frac{1}{2}}$  es comúnmente denominado diagrama de “Randles-Sevcik”, la cual suele ser lineal y pasar por el origen. El gradiente de la región lineal puede ser empleado para determinar la concentración del analito si el coeficiente de difusión

(D) es conocido. Sin embargo, el diagrama de “Randles-Sevcik” es uno de los mejores métodos para el cálculo experimental de D y aporta información acerca de la cinética de la reacción[43].

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. REACTIVOS

Todos los experimentos fueron realizados en agua desionizada MiliQ (Milipore, Bedford, MA). Las sales inorgánicas, ácido araquídico (AA), azúcares, galactosa oxidasa (GaOx) y cristales ITO empleados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y Fluka. El tampón fosfato salino (PBS) 0.01 M/NaCl 0.1 M empleado en las medidas electroquímicas y la subfase fue generado mezclando fosfato sódico monobásico (pureza >99%), fosfato sódico dibásico (pureza >99%) y cloruro sódico 0.1 M en agua ultrapura. Las disoluciones de galactosa y otros azúcares empleadas en voltametría se realizaron disolviendo la correspondiente cantidad de estos en PBS 0.01 M/NaCl 0.1 M.

La bisftalocianina de gadolinio ( $GdPc_2$ ) fue proporcionada por la Dra L. Tomilova de la Universidad Estatal de Moscú.

#### 3.2. PREPARACIÓN DE LB FILMS $GdPc_2/AA/GaOx$

Para la preparación de las películas, se empleó una mezcla compuesta por una disolución de ácido araquídico (AA)  $5 \cdot 10^{-4}$  en cloroformo y una disolución  $10^{-5}$  M de bis-ftalocianina de gadolinio ( $GdPc_2$ ) en cloroformo en proporción 10:1 (AA:Ftalocianina). La monocapa fue preparada en una bañera KSV 2000 Langmuir-Blodgett (KSV Instruments, Finland) equipada con una placa Wilhelmy para medir la presión de la superficie. El volumen necesario de la disolución  $GdPc_2/AA$  fue incorporado a la una subfase de PBS gota a gota. La incorporación de la enzima (GaOx) se realizó posteriormente una vez alcanzada la presión de deposición (30mN/m), cuando la monocapa compuesta por  $GdPc_2/AA$  se había formado sobre la superficie. Para incluirla en la monocapa, la disolución compuesta por la enzima en PBS (5 mg/ml) fue añadida gota a gota por debajo de la monocapa previamente formada (Figura 3). Tras la estabilización de la monocapa, se realizó la deposición de un determinado número de capas sobre la superficie de cristales ITO limpios de  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  con un ratio de transferencia cercano a 1. Tras la deposición, se llevó a cabo la fijación de la GaOx sobre las capas depositadas exponiendo los cristales a vapores de glutaraldehído (25 v/v) durante 20 minutos.

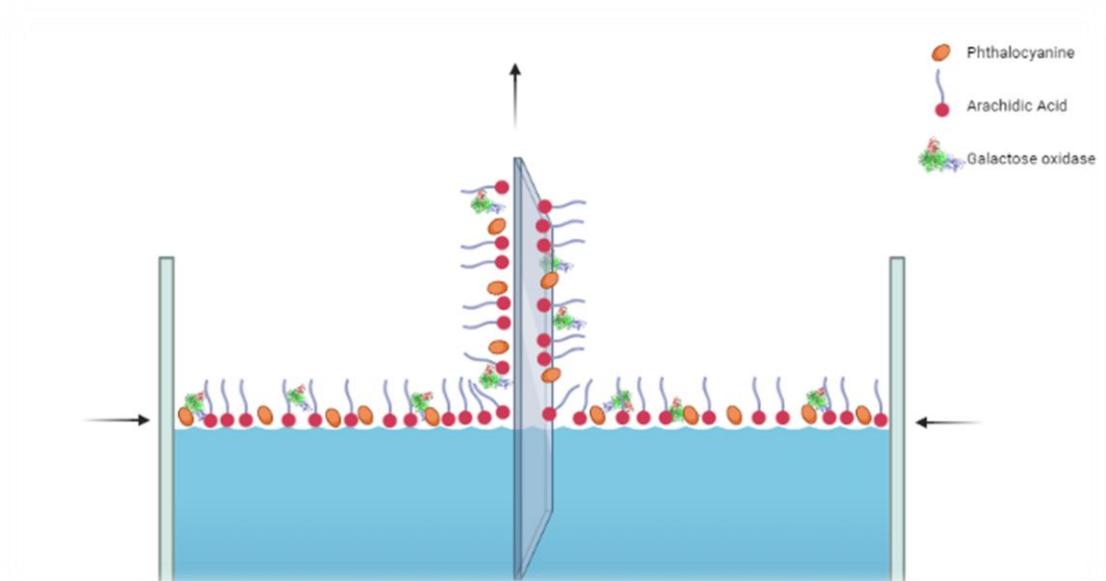


Figura 3. Imagen esquemática de la generación, composición y transferencia de las películas  $GdPc_2/AA/GaOx$ .

### 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MONOCAPAS

Las isothermas  $\pi$ -A fueron medidas tras la evaporación del solvente mediante la compresión de las moléculas flotantes a una velocidad de 10 mm/min y la formación de la capa fue analizada mediante BAM (KSV MicroBAM). Se tomaron imágenes de las capas transferidas a ITO empleando un microscopio de fuerza atómica (AFM) a temperatura ambiente. La caracterización mediante espectroscopía UV-Visible se realizó con un espectrofotómetro modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japón) y los espectros FTIR (Fourier Transform Infrared) se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro infrarrojo modelo FT/IR 6600 (Jasco Corporation, Japón).

El análisis electroquímico se realizó mediante voltametría cíclica en un potenciostato/galvanostato PGSTAT128 (Autolab Metrohm, Utrecht, The Netherlands) utilizando una celda electroquímica convencional de tres electrodos (electrodo de referencia, electrodo de trabajo y contraelectrodo). El cristal ITO junto con las capas depositadas fue usado como electrodo de trabajo. El electrodo de referencia utilizado fue un electrodo de  $Ag|AgCl/KCl$  3 M y como contraelectrodo se empleó una placa de platino puro. Los voltamogramas cíclicos fueron registrados a una velocidad de barrido de 0.1 V/s dentro de un rango de potencial de -0.6 V a 1 V. Los límites de detección fueron calculados a partir de los valores de intensidad de los picos en los voltamogramas a diferentes concentraciones de galactosa y para el análisis de la cinética se realizaron mediciones voltamétricas a diferentes velocidades (10 mV/s, 25 mV/s, 50 mV/s, 100mV/s, 250 mV/s, 500 mV/s y 1000 mV/s) en una disolución de galactosa en PBS ( $10^{-3}$  M).

## 4. RESULTADOS

A continuación, se van a presentar los resultados de las muestras correspondientes a sensores generados mediante la transferencia de una única monocapa  $GdPc_2/AA/GaOx$  y otros generados mediante la transferencia de 9 monocapas  $GdPc_2/AA/GaOx$  sobre ITO las cuales han sido caracterizadas estructuralmente mediante el análisis de la isoterma  $\pi$ -A, imágenes de AFM y espectros UV-Visible e infrarrojo FTIR. A nivel electroquímico se analizó la respuesta del sensor frente a distintas concentraciones de galactosa permitiendo obtener su límite de detección y se analizó la respuesta frente a diferentes azúcares que podrían actuar como interferentes en la detección de galactosa. Por otra parte, también se compararon los límites de detección obtenidos mediante este método con aquellos correspondientes a un *drop cast* con los mismos componentes para evaluar la influencia del orden molecular en la efectividad del sensor.

### 4.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

A partir de la isoterma  $\pi$ -A se pudo confirmar un área por molécula de  $58.61\text{\AA}^2$  en la monocapa flotante (Figura 4). Previo a este estudio se generaron monocapas compuestas únicamente por ácido araquídico (AA) y  $GdPc_2/AA$  (1:10), obteniendo unos valores de área por molécula de  $23.5\text{\AA}^2$  y  $38.8\text{\AA}^2$ , respectivamente. Por tanto, el incremento en el área por molécula obtenido en este caso podría ser debido a la adsorción de la enzima en la monocapa o a un cambio en la orientación de las ftalocianinas como consecuencia de la modificación de su interacción con el resto de componentes al incorporar la enzima. En cualquier caso, estos valores indican una orientación tipo “edge on” de las moléculas con respecto al sustrato [46][47]. La película generada presentaba una estructura *quasi*-ordenada debido a que estaba compuesta de diferentes materiales como se muestra en la imagen de AFM y su representación tridimensional (Figuras 5A y 5B). No obstante, pudimos comprobar que el sustrato quedaba completamente cubierto cuando se realizaba la transferencia de una única capa.

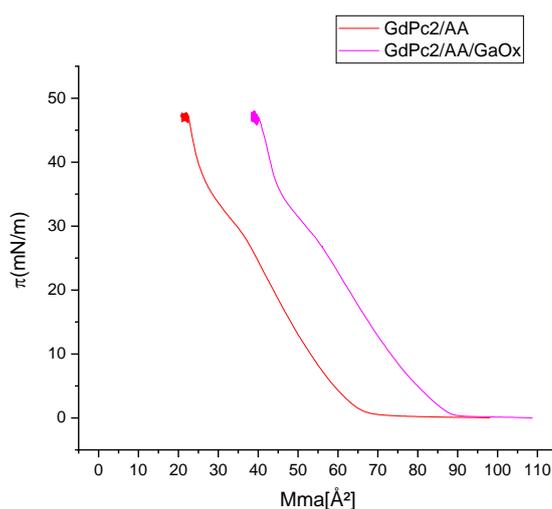


Figura 4. Isotermas de la monocapa flotante compuesta por  $GdPc_2/AA/GaOx$  y  $GdPc_2/AA$ .

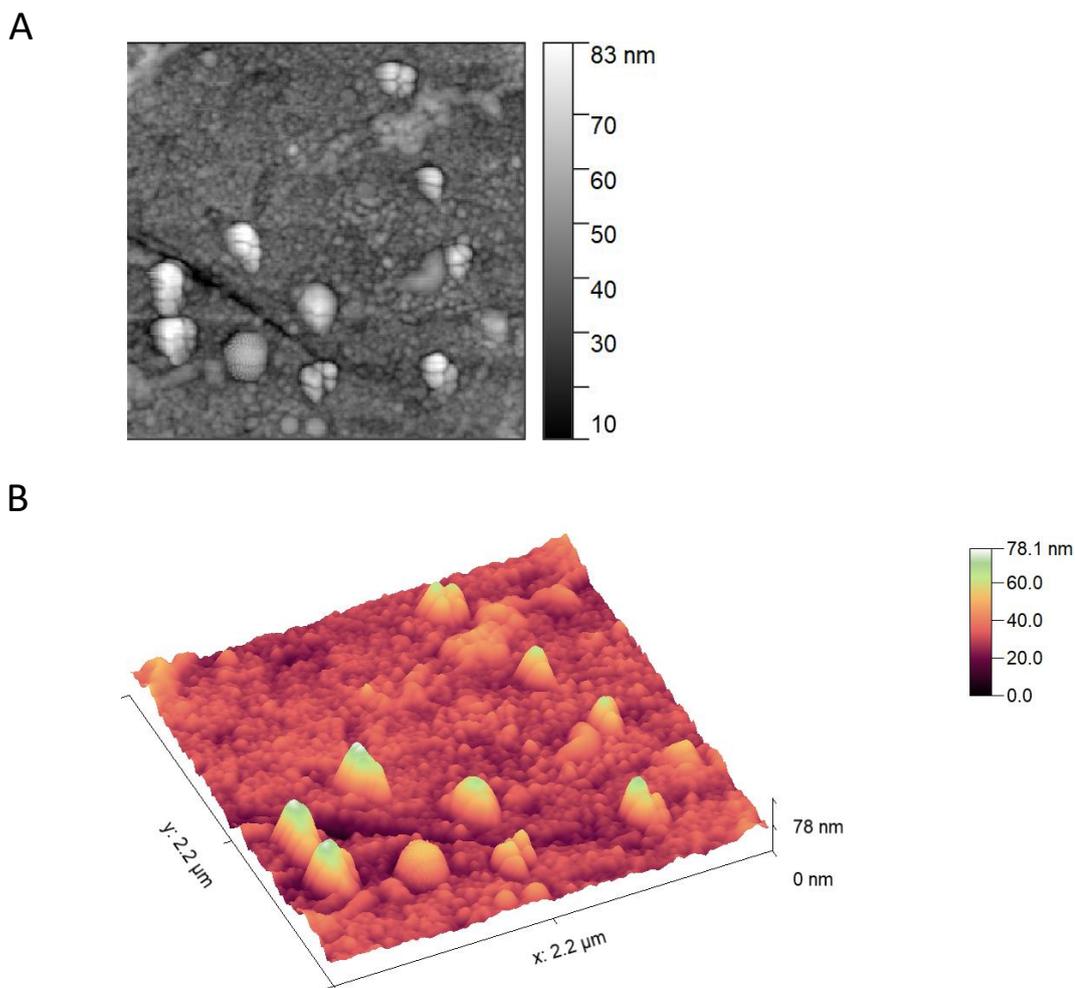


Figura 5. (A) Imagen de AFM y (B) representación tridimensional de la muestra compuesta por una única monocapa  $GdPc_2/AA/GaOx$  transferida a ITO.

El espectro UV-Vis junto con los picos analizados en el espectro FTIR nos permitieron confirmar la presencia tanto de la enzima como de la bis-ftalocianina y el ácido araquídico en las películas transferidas. En el espectro UV-Vis se pueden observar dos picos correspondientes a las bandas B y Q, a 340 nm y 647 nm. La banda B corresponde a la banda de absorción fundamental que puede ser empleada para determinar el *band gap* del material y corresponde con el segundo estado de transición  $\pi-\pi^*$  del anillo macrocíclico de la ftalocianina, es decir, la transición del estado fundamental al segundo estado de excitación. Por otro lado, la banda Q se corresponde con el primer estado de transición  $\pi-\pi^*$  y es sensible a cambios en el ambiente. También puede observarse un hombro presente alrededor de los 220 nm que no se encontraba presente en el espectro UV-Vis de la disolución  $GdPc_2/AA$  en cloroformo, lo cual correspondería a los residuos de tirosina de la enzima, confirmando por tanto su presencia en las monocapas transferidas (Figura 6A).

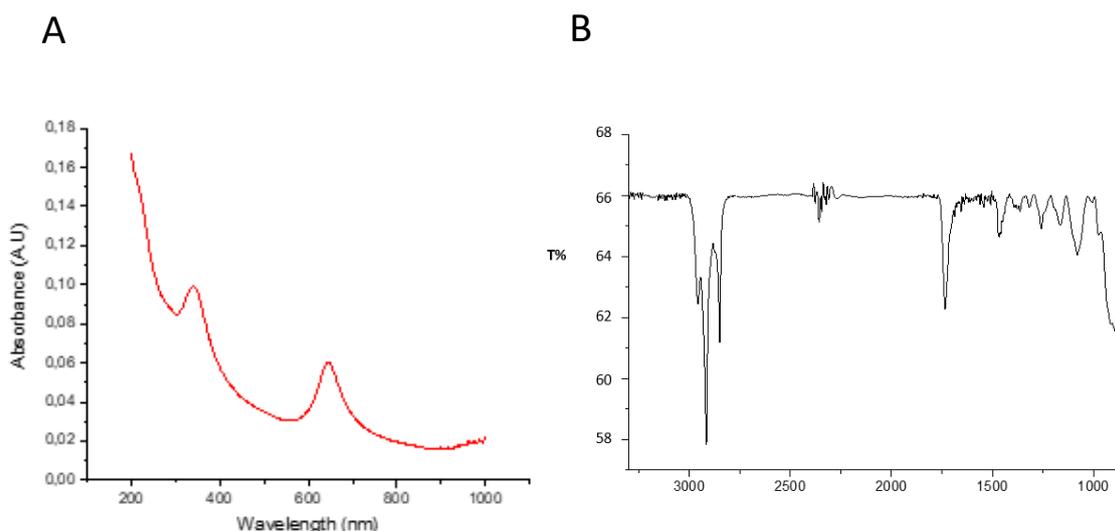


Figura 6. (A) Espectro UV-Vis y (B) espectro FTIR de las muestras correspondientes a nueve películas  $GdPc_2/AA/GaOx$  depositadas sobre cristal de cuarzo y ZnSe, respectivamente.

A partir del espectro FTIR también pudimos confirmar la presencia de picos correspondientes a los grupos amida I y II ( $1730\text{ cm}^{-1}$  y  $1473\text{ cm}^{-1}$ ) junto con los correspondientes a la bis-ftalocianina y el araquídico (Tabla 1 y figura 5B).

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Correspondencia
901	Anillo de benceno
1075	Anillo de ftalocianina
1168	Anillo de pirrol
1250	Estiramiento N-H del isoindol
1473	Amida II
1730	Amida I
2850	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> alifáticos
2917	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> alifáticos
2954	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> alifáticos

Tabla 1. Vibraciones infrarrojas y su asignación en las películas LB.

#### 4.2. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

Para evaluar el comportamiento electroquímico del sensor y su respuesta a galactosa, las películas transferidas a ITO fueron empleadas como electrodos de trabajo en voltametría cíclica. Los resultados se presentan en la Figura 7. Se puede observar una clara respuesta a galactosa al presentar un incremento en la intensidad de los picos a medida que se aumentaba la cantidad de galactosa en la disolución de PBS. Los voltamogramas presentaban un pico anódico alrededor de 0.20 V y uno catódico en 0.13 V (Figura 7). Dichos valores hacen referencia al proceso redox correspondiente a los residuos de tirosina (Tyr·/Tyr), lo cual indica que se lleva a cabo una transferencia directa de electrones (DET) en el centro activo de la molécula el cual presenta la Tyr272 y Cu[48][49]. No se observan los picos de oxidación/reducción correspondientes a la bis-ftalocianina lo cual indica que actúa como transportador electrónico hacia el centro activo de la enzima facilitando su función como catalizador, pero sin presentar actividad electroquímica.

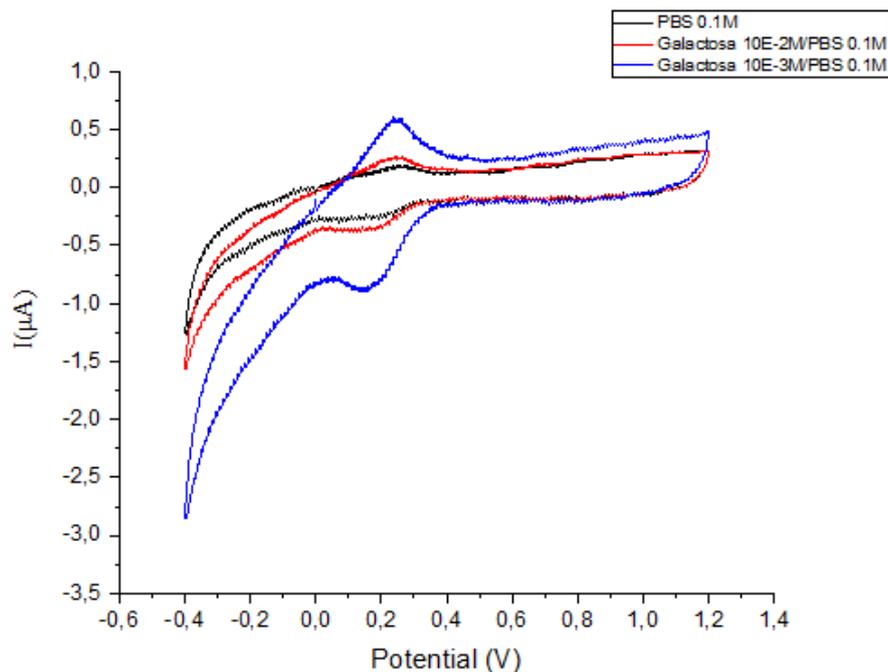


Figura 7. Respuesta del sensor compuesto por una monocapa  $GdPc_2/AA/GaOx$  inmerso en diferentes soluciones: PBS, galactosa  $5 \times 10^{-2}M$  en PBS y galactosa  $5 \times 10^{-3}M$  en PBS.

Analizando la respuesta a concentraciones crecientes de galactosa se pudo llevar a cabo el cálculo de los límites de detección (LOD) mediante la ecuación:

$$LOD = 3Sd/m$$

Siendo  $Sd$  la desviación estándar y  $m$  la pendiente de la representación de las concentraciones frente a los valores de intensidad de los picos anódico y catódico, obteniendo valores de  $8.89 \times 10^{-6} M$  ( $I_{pa}$ ) y  $1.09 \times 10^{-5} M$  ( $I_{pc}$ ) (Figura 8). Estos valores se compararon con los obtenidos para una muestra preparada con *drop cast* utilizando los mismos componentes que las películas LB. La primera ventaja que supuso el empleo de LB frente a *drop cast* es la capacidad de poder reutilizar el sensor en varias medidas electroquímicas, mientras que en el caso de *drop cast* solo podía ser empleado para una única medida debido al desprendimiento del material durante el análisis. Por otro lado, se produce una mejora de los límites de detección del sensor fabricado por LB en más de un orden de magnitud comparado con el sensor preparado por *drop cast*, lo cual se traduce en un incremento de la sensibilidad a la galactosa. Por tanto, se confirma que la presencia de una capa nanoestructurada facilita el transporte electrónico hacia la enzima durante el proceso redox.

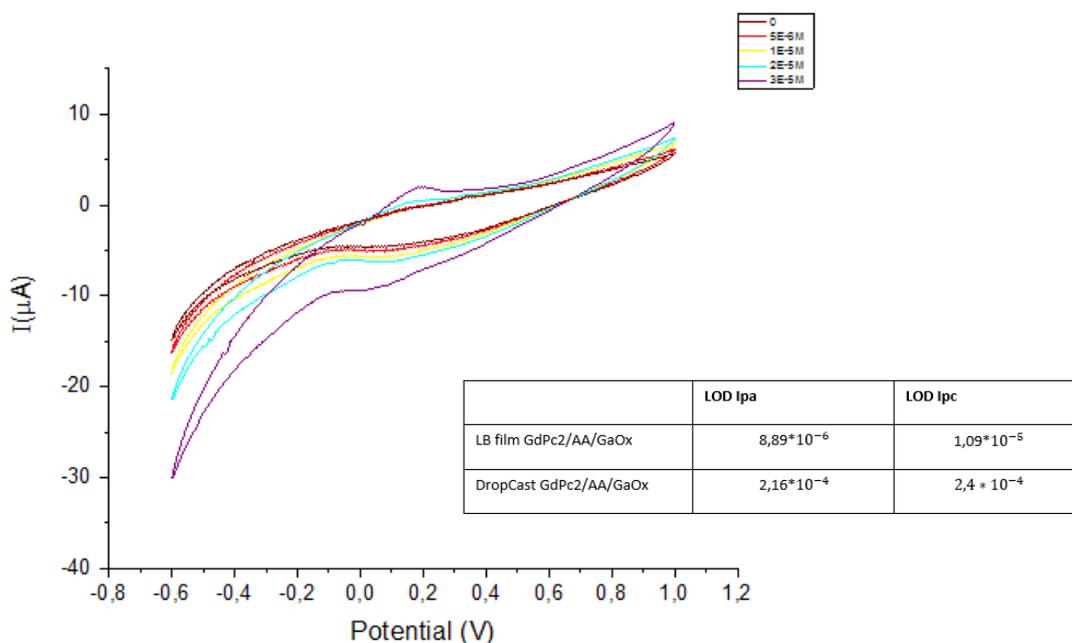


Figura 8. Voltamogramas del sensor  $GdPc_2/AA/GaOx$  (1 capa) sobre ITO generado mediante el método LB en respuesta a concentraciones crecientes de galactosa de 0 a  $3 \cdot 10^{-5}$  M en PBS y valores de LOD obtenidos para las capas preparadas mediante LB y *drop cast*.

Posteriormente, se estudió la influencia del potencial de barrido sobre la intensidad de los picos redox en una solución de galactosa  $10^{-3}$  M con el fin de saber si se daba un proceso de difusión durante la reacción redox. En voltametría cíclica, la ecuación de Randles-Sevcik describe el efecto de la velocidad de barrido sobre los picos de corriente  $I_p$ . Dichos picos no solo dependen de la concentración del analito y el coeficiente de difusión, sino también de la velocidad de barrido debido a que el gradiente de difusión se ve influenciado por como de rápido difunden las especies en la solución. Conforme se incrementa el voltaje se produce un mayor gradiente de concentración cerca del electrodo, dando lugar a un incremento en la corriente. Mediante la representación de la intensidad de los picos frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (diagrama de Randles-Sevcik) se puede conocer la naturaleza del proceso redox que se está produciendo. En caso de dar lugar a una representación lineal, estaríamos frente a un proceso de difusión.

La velocidad de barrido se modificó entre 0.01 y 1 V/s, obteniendo los voltamogramas que se observan en la Figura 9A en la cual se puede ver el incremento de intensidad al aumentar la velocidad de barrido. En la representación de la intensidad de los picos redox con respecto a la raíz cuadrada de dicha velocidad de barrido se pudo observar un incremento lineal hasta valores de barrido de 0.5 V/s, lo cual confirma que hasta esos valores el sistema está controlado por difusión (Figura 9B). Para valores de barrido superiores a 0.5 V, se produce una desviación de la linealidad debido a la adsorción de analitos durante el mecanismo redox, como ya ha sido reportado en otras ocasiones[3][43].

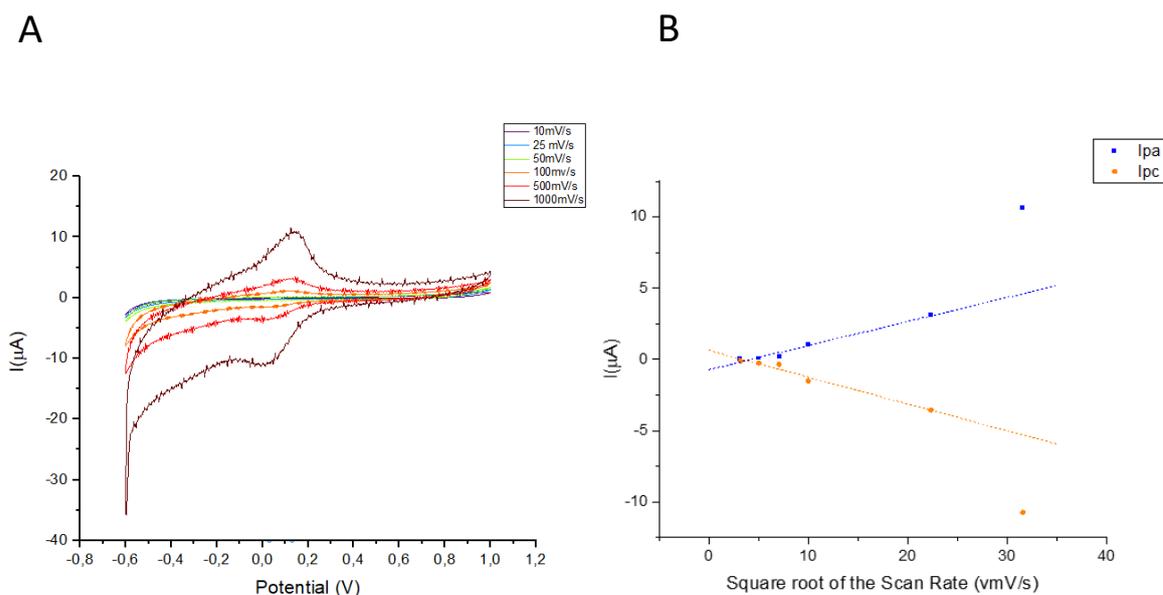


Figura 9. (A) Voltamogramas obtenidos a diferentes velocidades de barrido del sensor compuesto por 9 capas de  $GdPc_2/AA/GaOx$  en una solución de galactosa  $10^{-3}M$ . (B) Representación Randles-Sevcik a partir de los datos de los voltamogramas anteriores.

#### 4.3. ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA DE OTROS COMPUESTOS SOBRE LA RESPUESTA A GALACTOSA

Se estudió la influencia ejercida por la presencia de otros compuestos en la detección de galactosa con la finalidad de determinar la selectividad del sensor. Para llevarlo a cabo se analizó la respuesta del sensor para la detección de galactosa con una concentración de  $10^{-3}M$  en PBS junto con diferentes compuestos: glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa y ácido glutámico (Figura 10). Los azúcares fueron elegidos debido a que se encuentran en diversas bebidas tales como zumos y leche. En el caso del ácido glutámico, también se trata de un compuesto presente en lácteos. En la Figura 10, se muestra el valor máximo del pico anódico obtenido mediante voltametría cíclica para las diferentes soluciones. Los valores obtenidos se muestran en comparación con el obtenido para la solución que contenía únicamente galactosa, siendo este el valor 100%. En el caso de la sacarosa y lactosa, no se producen apenas variaciones en los valores obtenidos debido a que se trata de disacáridos por los que la enzima no presenta afinidad. No obstante, en el caso de la fructosa y la glucosa se observan incrementos considerables, de un 20 y 60% respectivamente, que puede derivar de la similitud en la estructura de dichos azúcares con respecto a la galactosa o bien debido a la actuación de  $GdPc_2$  como transportador electrónico. En el caso del ácido glutámico, se produce una reducción de un 20% con respecto a la detección de la galactosa debido a que produce una modificación del pH óptimo al cual actúa la enzima. Por lo tanto, sí que se observaron interferencias con azúcares de estructura similar a la galactosa y otros componentes que modifiquen el entorno óptimo para la enzima. No obstante, únicamente en el caso del ácido glutámico se producía una reducción en la señal detectada, lo cual quiere decir que el sensor sigue siendo capaz de detectar la galactosa en presencia de otros azúcares e incluso podrían ser empleados en la solución para mejorar la detección ya que dan lugar a señales más intensas.

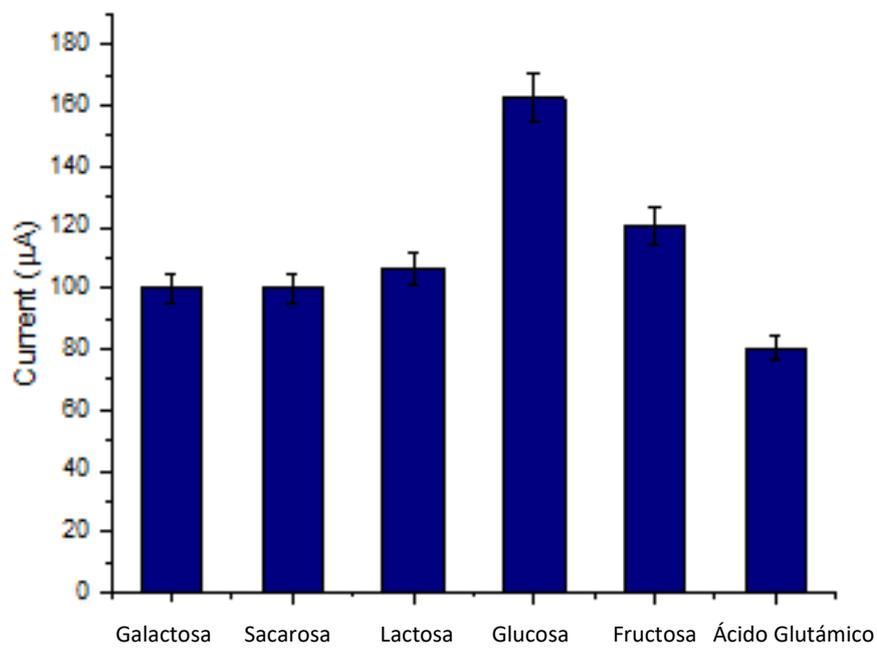


Figura 10. Valores del pico anódico de los voltamogramas para el sensor *GdPc*<sub>2</sub>/AA/GaOx (9 capas) en la detección de 10<sup>-3</sup>M de galactosa en PBS.

## 5. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Máster se ha conseguido generar un sensor biomimético a través de la combinación de ftalocianinas y enzimas en capas delgadas y su posterior transferencia a cristales ITO. El efecto sinérgico entre la bis-ftalocianina y la enzima fue analizado, confirmando la actuación de la ftalocianina como mediador electrónico de la galactosa oxidasa. Además, se optimizó un método para la inclusión de la enzima (soluble en agua) en la monocapa gracias a su interacción con las cabezas polares del AA.

La caracterización estructural de las monocapas LB depositadas sobre ITO mediante el análisis de la isoterma, imágenes AFM, UV-Vis y FTIR confirmaron la presencia de todos los elementos, dando lugar a una monocapa quasi-ordenada debido a la presencia de diferentes moléculas tanto anfifílicas como no anfifílicas. Esto fue observado a través del incremento en el área por molécula de la isoterma ( $58.61 \text{ \AA}^2$ ), así como la presencia de los picos correspondientes a los anillos de la bis-ftalocianina, los  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  alifáticos del ácido araquídico y los grupos amida de la enzima en el espectro infrarrojo. Por otro lado, la presencia de un hombro alrededor de 220 nm en el espectro UV-Visible reafirmaba la correcta inclusión de la enzima en las monocapas transferidas.

Así mismo, la caracterización electroquímica permitió analizar la efectividad como sensor de las capas transferidas dando lugar a picos en respuesta a galactosa que corresponden con los de oxidación/reducción ( $I_{pa} = 0.13 \text{ V}$ ,  $I_{pc} = 0.20 \text{ V}$ ) de los residuos de tirosina de la enzima, lo cual apunta hacia un proceso DET (Direct Electron Transfer) entre el analito y el centro activo de la enzima gracias a la actuación de la ftalocianina como intermediario en la transferencia de electrones.

Los límites de detección obtenidos para los sensores generados mediante la transferencia de 9 monocapas resultaron ser mejores que los conseguidos mediante drop cast, dando lugar a una diferencia de dos órdenes de magnitud. Este hecho resalta la importancia del orden molecular a nivel nanométrico en la sensibilidad y eficiencia electroquímica. Además, el sensor compuesto por las monocapas LB podía ser empleado repetidas veces, al contrario que el generado mediante *drop cast* en el que se producía un desprendimiento de los componentes durante el proceso electroquímico.

El estudio de la cinética de reacción nos permitió confirmar que se llevaba a cabo un proceso de difusión durante la reacción redox. No obstante, se podía observar la adsorción de solutos de la solución a velocidades elevadas ( $1000 \text{ mV/s}$ ). Finalmente, pudo observarse como la presencia de azúcares de estructura similar a la galactosa interfería en la intensidad de detección de la misma. Los azúcares disacáridos no daban lugar a interferencias, ya que debido a su estructura la enzima no presentaba afinidad por ellos. También se confirmó que el entorno en el cual se encuentra la enzima determina directamente su eficacia, por ello la introducción de interferentes como el ácido glutámico, el cual modifica el pH, producía una reducción en la señal de detección de la galactosa.

La combinación de enzimas junto con el elevado orden molecular de las películas nanoestructuradas LB mejora la sensibilidad del sensor frente a la galactosa. El sensor desarrollado en este trabajo permite detectar galactosa con valores de límites de detección en torno a  $10^{-4}$ , mejores a los obtenidos mediante el empleo de otras técnicas de preparación de sensores como los electrodos de pasta de carbono. Los sensores electroquímicos son

ampliamente empleados en la industria alimentaria para el análisis de diferentes componentes presentes en zumos, cafés, tés, leches, vinos, etc. En este caso, el sensor desarrollado presenta la capacidad de ser empleado para la detección de galactosa en líquidos tales como la leche. La ventaja que supone la técnica empleada y el desarrollo de un protocolo efectivo para la inclusión de la enzima se encuentra en la versatilidad del sensor. Mediante la inclusión de diferentes enzimas tales como la lactasa o la glucosa oxidasa, así como la combinación de ellas en un mismo sensor, se podrían desarrollar sensores específicos para la detección de diferentes componentes y podría ser empleado no solo en leche sino en otros sectores alimentarios.

Como perspectivas de futuro, el sensor podría ser mejorado a través de la incorporación de materiales que incrementen la conductividad e incrementen la señal obtenida, como pueden ser nanohilos de plata. Ya han sido observados efectos sinérgicos entre ftalocianinas y nanomateriales tales como nanopartículas de oro (AuNPs)[50], [51], por tanto podría analizarse la existencia de un efecto sinérgico con otros nanomateriales y su efecto sobre la efectividad de las enzimas incluidas en la monocapa.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. Faridbod, M. R. Ganjali, and M. Hosseini, "Lanthanide materials as chemosensors," *Lanthanide-Based Multifunctional Materials: From OLEDs to SIMs*, pp. 411–454, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-813840-3.00012-0.
- [2] C. Pérez-González *et al.*, "Analysis of Milk Using a Portable Potentiometric Electronic Tongue Based on Five Polymeric Membrane Sensors," *Frontiers in Chemistry*, vol. 9, no. July, pp. 1–11, 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.706460.
- [3] D. María Luz Rodríguez Méndez, "Sensor arrays for Enology applications: Using nanoscience for grape analysis," 2016. doi: 10.35376/10324/18886.
- [4] S. Abdul, T. Judit, F. Ilona, and M. Nikoletta, "Functional thin films and nanostructures for sensors," *Fundamentals of Nanoparticles: Classifications, Synthesis Methods, Properties and Characterization*, pp. 485–519, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-323-51255-8.00016-1.
- [5] N. W. McCready, *Principles of chemical thermodynamics*, vol. 252, no. 3. 1951. doi: 10.1016/0016-0032(51)90556-x.
- [6] M. L. Rodríguez-Méndez *et al.*, "Electronic noses and tongues in wine industry," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 4, no. OCT, 2016, doi: 10.3389/FBIOE.2016.00081.
- [7] M. Bougrini *et al.*, "Aging time and brand determination of pasteurized milk using a multisensor e-nose combined with a voltammetric e-tongue," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 45, pp. 348–358, Dec. 2014, doi: 10.1016/J.MSEC.2014.09.030.
- [8] M. Podrazka, E. Bączyńska, M. Kundys, P. S. Jeleń, and E. W. Nery, "Electronic tongue-A tool for all tastes?," *Biosensors (Basel)*, vol. 8, no. 1, pp. 1–24, 2017, doi: 10.3390/bios8010003.
- [9] C. Medina-Plaza *et al.*, "The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 62, no. 2, pp. 940–947, 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2015.02.027.
- [10] C. Salvo-Comino *et al.*, "Biosensors platform based on chitosan/AuNPs/phthalocyanine composite films for the electrochemical detection of catechol. the role of the surface structure," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 7, Apr. 2020, doi: 10.3390/S20072152.
- [11] A. K. Wanekaya, W. Chen, N. v. Myung, and A. Mulchandani, "Nanowire-based electrochemical biosensors," *Electroanalysis*, vol. 18, no. 6, pp. 533–550, Mar. 2006, doi: 10.1002/ELAN.200503449.
- [12] J. Rick, M. Tsai, and B. J. Hwang, "Biosensors Incorporating Bimetallic Nanoparticles," no. December 2015, pp. 21–29, 2016, doi: 10.3390/nano6010005.
- [13] A. Manuscript and B. Sensing, "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing," vol. 112, no. 5, pp. 2739–2779, 2014, doi: 10.1021/cr2001178.Gold.

- [14] E. Çevik and S. Mehmet, "Potentiometric urea biosensor based on poly ( glycidylmethacrylate ) -grafted iron oxide nanoparticles," vol. 13, pp. 280–286, 2013, doi: 10.1016/j.cap.2012.07.025.
- [15] B. Paczosa-bator, R. Piech, C. Wardak, and L. Cabaj, "Application of graphene supporting platinum nanoparticles layer in electrochemical sensors with potentiometric and voltammetric detection," pp. 2455–2464, 2018, doi: 10.1007/s11581-017-2356-7.
- [16] J. Yang, D. Mu, Y. Gao, J. Tan, A. Lu, and D. Ma, "Cobalt phthalocyanine-graphene complex for electro-catalytic oxidation of dopamine," *Journal of Natural Gas Chemistry*, vol. 21, no. 3, pp. 265–269, 2012, doi: 10.1016/S1003-9953(11)60363-0.
- [17] R. Abdel-Karim, Y. Reda, and A. Abdel-Fattah, "Review-Nanostructured Materials-Based Nanosensors," 2020, doi: 10.1149/1945-7111/ab67aa.
- [18] J. Wang, "Biomolecule-functionalized nanowires: From nanosensors to nanocarriers," *ChemPhysChem*, vol. 10, no. 11, pp. 1748–1755, 2009, doi: 10.1002/cphc.200900377.
- [19] C. Apetrei *et al.*, "Biomimetic biosensor based on lipidic layers containing tyrosinase and lutetium bisphthalocyanine for the detection of antioxidants," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 5, pp. 2513–2519, 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.10.047.
- [20] C. Medina-Plaza, J. A. de Saja, and M. L. Rodriguez-Mendez, "Bioelectronic tongue based on lipidic nanostructured layers containing phenol oxidases and lutetium bisphthalocyanine for the analysis of grapes," *Biosensors and Bioelectronic*, vol. 57, pp. 276–283, 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.02.023.
- [21] P. Alessio *et al.*, "Structural and electrochemical properties of lutetium bis-octachlorophthalocyaninate nanostructured films. Application as voltammetric sensors," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 14, no. 9, pp. 6754–6763, 2014, doi: 10.1166/jnn.2014.9355.
- [22] C. Medina-Plaza *et al.*, "Electronic tongue formed by sensors and biosensors containing phthalocyanines as electron mediators:," *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, vol. 18, no. 1–2, pp. 76–86, 2014, doi: 10.1142/S1088424613501137.
- [23] D. Kirsanov *et al.*, "Electronic tongues for inedible media," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 23, 2019, doi: 10.3390/s19235113.
- [24] M. del Valle, "Electronic tongues employing electrochemical sensors," *Electroanalysis*, vol. 22, no. 14, pp. 1539–1555, 2010, doi: 10.1002/elan.201000013.
- [25] C. Medina-Plaza, L. N. Furini, C. J. L. Constantino, J. A. de Saja, and M. L. Rodriguez-Mendez, "Synergistic electrocatalytic effect of nanostructured mixed films formed by functionalised gold nanoparticles and bisphthalocyanines," *Analytica Chimica Acta*, vol. 851, no. C, pp. 95–102, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.08.049.
- [26] C. Medina-Plaza *et al.*, "Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir-Blodgett films based on functionalized nanoparticles," *Analytica Chimica Acta*, vol. 853, no. 1, pp. 572–578, 2015. doi: 10.1016/j.aca.2014.10.046.
- [27] M. Gay Martín, J. A. de Saja, R. Muñoz, and M. L. Rodríguez-Méndez, "Multisensor system based on bisphthalocyanine nanowires for the detection of antioxidants," *Electrochimica Acta*, vol. 68, pp. 88–94, 2012, doi: 10.1016/j.electacta.2012.02.042.

- [28] E. Demir, H. Silah, and B. Uslu, "Phthalocyanine Modified Electrodes in Electrochemical Analysis," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 0, no. 0, pp. 1–37, 2020, doi: 10.1080/10408347.2020.1806702.
- [29] M. Pal and V. Ganesan, "Zinc phthalocyanine and silver/gold nanoparticles incorporated MCM-41 type materials as electrode modifiers," *Langmuir*, vol. 25, no. 22, pp. 13264–13272, Nov. 2009, doi: 10.1021/LA901792B.
- [30] U. P. Azad and V. Ganesan, "Influence of metal nanoparticles on the electrocatalytic oxidation of glucose by poly(Nilteta) modified electrodes," *Electroanalysis*, vol. 22, no. 5, pp. 575–583, Mar. 2010, doi: 10.1002/ELAN.200900435.
- [31] David L. Nelson; Michael M. Cox, "Lehninger Principios de Bioquímica", 7 ed, p. 1403, 2018.
- [32] C. Figueiredo, A. L. de Lacey, and M. Pita, "Electrochemical studies of galactose oxidase," *Electrochemical Science Advances*, Nov. 2021, doi: 10.1002/ELSA.202100171.
- [33] S. Tembe, M. Karve, S. Inamdar, S. Haram, J. Melo, and S. F. D'souza, "Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric WIm," *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, vol. 349, pp. 72–77, 2006, doi: 10.1016/j.ab.2005.11.016.
- [34] Y. Li Zhou, R. Hai Tian, and J. Fang Zhi, "Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 822–828, 2007, doi: 10.1016/j.bios.2006.03.001.
- [35] D. Rodrigues, F. F. Camilo, and L. Caseli, "Cellulase and alcohol dehydrogenase immobilized in Langmuir and Langmuir-Blodgett films and their molecular-level effects upon contact with cellulose and ethanol," *Langmuir*, vol. 30, no. 7, pp. 1855–1863, Feb. 2014, doi: 10.1021/LA500232W.
- [36] C. da Rocha Junior and L. Caseli, "Adsorption and enzyme activity of asparaginase at lipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films," *Materials Science and Engineering C*, vol. 73, pp. 579–584, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2016.12.041.
- [37] F. T. Araujo, L. O. Peres, and L. Caseli, "Conjugated Polymers Blended with Lipids and Galactosidase as Langmuir-Blodgett Films To Control the Biosensing Properties of Nanostructured Surfaces," *Langmuir*, vol. 35, no. 22, pp. 7294–7303, Jun. 2019, doi: 10.1021/ACS.LANGMUIR.9B00536.
- [38] M. L. Rodríguez-Méndez *et al.*, "Improvement of electrocatalytic effect in voltammetric sensors based on phthalocyanines," *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, vol. 20, no. 1–4, pp. 413–420, 2016, doi: 10.1142/S1088424616500218.
- [39] O. N. Oliveira, L. Caseli, and K. Ariga, "The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films," 2022, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00754.
- [40] A. J. A. Zasadzinski, R. Viswanthan, L. Madsen, J. Garnæs, and D. K. Schwartz, "Langmuir-Blodgett Films," vol. 263, no. 5154, pp. 1726–1733, 1994, doi: 10.1126/science.8134836.
- [41] R. H. Tredgold, *The physics of Langmuir-Blodgett films*, vol. 50. 1987. doi: 10.1088/0034-4885/50/12/002.

- [42] J. Brodovitch, "LAB MANUAL Langmuir-Blodgett Film." [https://www.sfu.ca/~brodovit/files/chem366/manual/01\\_LANGM131.pdf](https://www.sfu.ca/~brodovit/files/chem366/manual/01_LANGM131.pdf) (accessed Oct. 19, 2021).
- [43] P. Monk, "Fundamentals of Electro-Analytical Chemistry," *Fundamentals of Electro-Analytical Chemistry*, pp. 1–361, Mar. 2007, doi: 10.1002/9780470511329.
- [44] B. J. Privett, J. H. Shin, and M. H. Schoenfisch, "Electrochemical Sensors," *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 12, pp. 4723–4741, Jun. 2010, doi: 10.1021/AC101075N.
- [45] E. Bakker and M. Telting-Diaz, "Electrochemical Sensors," *Analytical Chemistry*, vol. 74, no. 12, pp. 2781–2800, Jun. 2002, doi: 10.1021/AC0202278.
- [46] P. Alessio, F. J. Pavinatto, O. N. Oliveira, J. A. de Saja Saez, C. J. L. Constantino, and M. L. Rodr Iiguez-M Endez, "Detection of catechol using mixed Langmuir-Blodgett films of a phospholipid and phthalocyanines as voltammetric sensors", doi: 10.1039/c0an00159g.
- [47] S. Singh, A. Aggarwal, N. v S Dinesh K Bhupathiraju, G. Arianna, K. Tiwari, and C. Michael Drain, "Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids for Diagnostics and Therapeutics", doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00244.
- [48] C. Figueiredo, A. L. de Lacey, and M. Pita, "Electrochemical studies of galactose oxidase," *Electrochemical Science Advances MINI REVIEW*, 2021, doi: 10.1002/elsa.202100171.
- [49] J. M. Abad, M. Gass, A. Bleloch, and D. J. Schiffrin, "Direct Electron Transfer to a Metalloenzyme Redox Center Coordinated to a Monolayer-Protected Cluster", doi: 10.1021/ja9026693.
- [50] C. Salvo-Comino *et al.*, "Biosensors platform based on chitosan/AuNPs/phthalocyanine composite films for the electrochemical detection of catechol. the role of the surface structure," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 7, Apr. 2020, doi: 10.3390/S20072152.
- [51] M. L. Rodriguez-Mendez, A. I. Ruiz-Carmuega, A. Sastre, J. Ortiz, C. Garcia-Hernandez, and C. Garcia-Cabazon, "Improving the Performance of Electrochemical Sensors by Means of Synergy. Combinations of Gold Nanoparticles and Phthalocyanines," *Proc West Mark Ed Assoc Conf*, vol. 1, no. 10, p. 413, 2017, doi: 10.3390/proceedings1040413.