



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES
GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

**Biosensores basados en nanohilos de plata
para la detección de compuestos de interés
en la Industria alimentaria**

Autora:

Giraldes Fernández, Iria Nerea

Tutoras:

**Rodríguez Méndez, María Luz
Salvo Comino, Coral**

**Departamento de Química Física y
Química Inorgánica**

Valladolid, mayo de 2020.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todos aquellos que han formado parte de este Trabajo Fin de Grado, de alguna forma, a que se haya hecho posible.

En primer lugar, a mi tutora y profesora María Luz Rodríguez Méndez, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su equipo de investigación, formándome, dándome autonomía y haciendo que estos meses de trabajo hayan supuesto un aprendizaje muy valioso para mí.

Quisiera agradecer también a mis compañeros de laboratorio, por su acogida, por su ayuda y entrega en todo momento. En especial a mi cotutora, Coral, por enseñarme con tanto cariño y comprensión, incluso en la distancia; su dedicación tanto en lo profesional como en lo personal y, sobre todo, su alegría y su humor. Sin ella no hubiese sido lo mismo. Te deseo lo mejor, eres una mujer fuerte y vas a conseguir todo lo que te propongas.

Por otro lado, me gustaría agradecer a mis amigas de clase, Fani, Raquel, Chabe e Icíar, por ser un gran apoyo durante estos años, por aguantar como campeonas los momentos duros de exámenes, trabajos y el estrés que eso conlleva. Pero todo eso lo hemos superado con creces y ya podemos decir: ¡Somos ingenieras!

También agradecer a mis amigos de siempre por todo lo que hemos compartido estos años por todos los momentos de alegría, por entenderme y animarme.

A mi compi de vida, Ales, por ser mi mejor amigo, mi pareja, mi confidente, por ayudarme a reponerme en los malos momentos y sobre todo por apoyarme día a día y alegrarme la vida. Eres el mejor ingeniero, siempre te lo digo. Espero compartir contigo todos tus logros.

Por último, quiero darle las gracias a mi familia porque sin ella esto no hubiese sido posible. A pesar de los 11.000 km que nos separan, siempre os tengo presentes. En especial, a los que tengo cerca, mis padres, agradecerles toda la valentía, el esfuerzo, el sacrificio y el trabajo realizado durante toda su vida para que yo recibiese la mejor educación y me formase como persona. Mami, tú siempre me dices que lo que me voy a llevar de esta vida son el conocimiento y los buenos momentos vividos. En estos años me he dado cuenta que tienes toda la razón y lo tengo grabado a fuego. Papá, por tu interés en la ciencia y la tecnología hiciste que me ilusionara con esta carrera. Gracias a la niña de mis ojos y la jefa perruna de la casa, Maggie, por todo el amor que me das, que, aunque no hables, te haces entender solo con la mirada. Gracias a los tres por acompañarme en este viaje.

Muchas gracias a todos.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

Resumen

En el presente trabajo, se han desarrollado biosensores electroquímicos nanoestructurados basados en la detección de analitos de interés en la industria alimentaria: galactosa (como ejemplo de azúcares) y catecol (como ejemplo de antioxidante). Con el objetivo de obtener sensores con alta sensibilidad y bajos límites de detección, se han preparado biosensores combinando la enzima correspondiente (Galactosa Oxidasa o Tirosinasa), con nanohilos de plata (AgNWs) que actúan como mediador electrónico.

Durante el desarrollo de este trabajo, se ha desarrollado un método para sintetizar los AgNWs, que consiste en una modificación de métodos anteriores, que permite obtener AgNWs de tamaño homogéneo. Además, los AgNWs se han caracterizado mediante técnicas espectroscópicas de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) e infrarroja (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos X (DRX).

Para ello, los AgNWs se depositaron en un sustrato de óxido de indio y estaño (ITO) por medio de la técnica spin-coating, sobre los cuales se depositaron la enzima Galactosa Oxidasa (GaOx) o Tirosinasa (TYR).

Con el fin de obtener los biosensores con mejores presentaciones frente a galactosa o catecol, se han estudiado distintos métodos de inmovilización enzimática. Se ha evaluado su respuesta con la técnica electroquímica voltametría cíclica, analizando su reproducibilidad, repetitividad y sensibilidad donde se seleccionaron las configuraciones óptimas, alcanzando LOD de órdenes de 10^{-7} M.

Palabras clave

Biosensores electroquímicos; nanohilos de plata (AgNWs); spin-coating; Galactosa oxidasa (GaOx); Tirosinasa (TYR); Nafion®.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

Abstract

In the present work, nanostructured electrochemical biosensors have been developed for the detection of analytes of interest in the food industry: galactose (as an example of sugars) and catechol (as an example of antioxidant). In order to obtain sensors with high sensitivity and low detection limits, biosensors have been prepared combining the corresponding enzyme (Galactose Oxidase or Tyrosinase), with silver nanowires (AgNWs) that act as an electronic mediator.

During the development of this work, a method has been developed to synthesize AgNWs, which consists of a modification of previous methods, which allows obtaining AgNWs of homogeneous size. Furthermore, AgNWs have been characterized by spectroscopic techniques of visible ultraviolet (UV-Vis) and infrared (FT-IR) absorption, scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD).

For this, the AgNWs were deposited on a substrate of indium and tin oxide (ITO) by means of the spin-coating technique, on which the enzyme Galactose Oxidase (GaOx) or Tyrosinase (TYR) was deposited.

In order to obtain the biosensors with the best presentations against galactose or catechol, different methods of enzyme immobilization have been studied. Its response has been evaluated with the cyclic voltammetry electrochemical technique, analyzing its reproducibility, repeatability and sensitivity where the optimal configurations were selected, reaching LOD of orders of 10^{-7} M.

Keywords

Electrochemical biosensors; silver nanowires (AgNWs); spin-coating; Galactose Oxidase (GaOx); Tyrosinase (TYR); Nafion®.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



Índice

1.	Introducción y objetivos	25
1.1.	Introducción	25
1.2.	Objetivos.....	26
2.	Fundamento teórico	31
2.1.	Antecedentes y estado del arte	31
2.2.	Sensores.....	31
2.2.1.	Definición y clasificación	32
2.2.2.	Biosensores electroquímicos.....	33
2.2.3.	Técnicas espectroscópicas de caracterización de sensores y biosensores electroquímicos.....	51
2.2.4.	Técnicas electroquímicas de medida para sensores y biosensores electroquímicos	53
2.2.5.	Especies electroactivas estudiadas	63
3.	Reactivos, material y equipos utilizados.....	71
3.1.	Reactivos	71
3.2.	Material.....	72
3.3.	Equipos.....	72
4.	Metodología y desarrollo experimental.....	75
4.1.	Acondicionamiento de los sensores y biosensores nanoestructurados.....	75
4.1.1.	Preparación de disoluciones	75
4.1.2.	Síntesis de nanohilos de plata (AgNWs)	77
4.1.3.	Preparación de enzimas	80
4.1.4.	Preparación de los sensores	81
4.2.	Caracterización de los sensores y biosensores nanoestructurados.....	83
4.2.1.	Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis)	83
4.2.2.	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).....	84
4.2.3.	Estudio del comportamiento electroquímico.....	84
4.2.4.	Determinación de la sensibilidad y del límite de detección (LOD) mediante voltametría de pulso diferencial.....	87
5.	Resultados experimentales y discusión.....	91
5.1.	Preparación y caracterización de nanohilos de plata (AgNWs)	91
5.1.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	91
5.1.2.	Difracción de rayos X (DRX)	92
5.1.3.	Espectroscopía de absorción ultravioleta visible	93



5.1.4.	Técnicas electroquímicas: voltametría cíclica	94
5.2.	Preparación de biosensores enzimáticos	97
5.2.1.	Espectroscopía de absorción ultravioleta visible	97
5.2.2.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	100
5.2.3.	Respuesta voltamétrica de los biosensores.....	102
6.	Conclusiones y trabajo futuro	143
7.	Bibliografía	147

Índice de figuras

Figura 1. Subsectores más importantes en cuanto a producción de la industria alimentaria en Castilla y León.	25
Figura 2. Esquema estructural de un biosensor electroquímico.	33
Figura 3. Esquema de la reacción catalizada y no catalizada por la enzima.....	36
Figura 4. Modelo cinético de Michaelis-Menten.	36
Figura 5. Estructura tridimensional de la enzima Galactosa Oxidasa, GaOx [48]. ...	38
Figura 6. Estructura química del centro activo de la Galactosa Oxidasa, GaOx [48].	39
Figura 7. Mecanismo de reacción de la enzima Galactosa Oxidasa, GaOx.	40
Figura 8. Estructura tridimensional de la enzima Tirosinasa, TYR [17].	41
Figura 9. Estructura química del centro activo de la tirosinasa, TYR [61].	41
Figura 10. Mecanismo de reacción de la enzima Tirosinasa, TYR.	42
Figura 11. Esquema de la técnica drop-casting.....	46
Figura 12. Esquema de la técnica spin-coating.	47
Figura 13. Representación esquemática de las etapas de crecimiento de los nanohilos de plata (AgNWs).....	48
Figura 14. Representación esquemática del electrodo de gas hidrógeno (SHE).	55
Figura 15. A la izquierda, celda electroquímica de tres electrodos. A la derecha, esquema básico del funcionamiento de un potencióstato.	56
Figura 16. Barrido triangular: potencial frente a tiempo.	58
Figura 17. Voltamograma cíclico: intensidad de corriente frente a potencial de la especie en estudio.	59

Figura 18. A la izquierda, señal de excitación de la voltametría de pulso diferencial. A la derecha, el voltamograma resultante.....	63
Figura 19. Estructura química de la D-Galactosa.	65
Figura 20. Posicionamiento de los grupos OH en los fenoles.....	66
Figura 21. Estructura del catecol.	67
Figura 22. Reacción de oxidación del catecol para obtener 1,2-benzoquinona.	67
Figura 23. Destilación de los reactivos para obtener nanohilos de plata.....	78
Figura 24. Adición de las disoluciones de nitrato de plata y polivinilpirrolidona gota a gota a la disolución de cloruro de cobre y etilenglicol.	78
Figura 25. Producto de reacción tras la destilación.	79
Figura 26. Centrífuga utilizada para el lavado de AgNWs.	79
Figura 27. Lavados mediante centrifugación del producto de síntesis. a) Producto sin lavar. b) Producto tras el primer lavado con acetona.....	80
Figura 28. Nanohilos de plata en etanol.	80
Figura 29. Spincoater utilizado para depositar los AgNWs.	82
Figura 30. Espectrofotómetro UV-Vis utilizado para caracterizar los sensores.	83
Figura 31. Espectrofotómetro FT-IR utilizado para caracterizar los sensores.	84
Figura 32. Potenciostato/Galvanostato utilizado para las medidas electroquímicas realizadas a los sensores.....	85
Figura 33. Montaje de la celda electroquímica.....	86
Figura 34. Imagen tomada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a una muestra de AgNWs.....	92
Figura 35. Patrón de difracción de rayos X de AgNWs.....	93

- Figura 36.** Caracterización de AgNWs mediante espectroscopía UV-Vis. En rojo, el producto de AgNWs sin lavar. En azul, el producto de AgNWs tras varios lavados. En negro, el sobrenadante en etanol (residuo)..... 94
- Figura 37.** Voltamograma comparativo entre ITO sin modificar (negro), AgNWs (rojo) y su réplica (azul)..... 95
- Figura 38.** Respuesta voltamétrica de AgNWs (a) en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (negro), en muestra patrón de galactosa 10^{-4} M (rojo) y en muestra patrón de galactosa 10^{-3} M (azul); (b) en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (negro), en muestra patrón de catecol 10^{-4} M (rojo) y en muestra patrón de catecol 10^{-3} M (azul). 96
- Figura 39.** Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/GaOx (rojo) y AgNWs/GaOx/GLU (azul)..... 97
- Figura 40.** Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/NF (rojo) y AgNWs/GaOx/NF (azul). 98
- Figura 41.** Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/TYR (rojo) y AgNWs/TYR/GLU (azul)..... 99
- Figura 42.** Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/NF (rojo) y AgNWs/TYR/NF (azul)..... 99
- Figura 43.** Espectro FT-IR de AgNWs (negro), AgNWs/ TYR (azul) y AgNWs/GaOx (rojo). 100
- Figura 44.** Espectro FT-IR comparativo de las configuraciones con Nafion®: a) Espectro AgNWs/NF (azul) y AgNWs/GaOx/NF (verde); b) Espectro AgNWs/NF (azul) y AgNWs/TY/NF (rojo). 101
- Figura 45.** Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con glutaraldehído en disolución patrón de galactosa 10^{-3} M: AgNWs/GaOx/GLU (negro) y AgNWs/GLU/GaOx (rojo). 103
- Figura 46.** Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando vapores de glutaraldehído como inmovilizador

enzimático de la GaOx en disolución de galactosa 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/GaOx/GLU; b) configuración AgNWs/GLU/GaOx.	104
Figura 47. Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima GaOx: a) configuración AgNWs/GaOx; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/GLU/GaOx; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/GaOx/GLU; c.1) detalle del pico catódico.	106
Figura 48. Respuesta voltamétrica comparativa de los sensores: AgNWs (negro), GaOx (rojo), AgNWs/GaOx (azul) y AgNWs/GaOx/GLU (verde) en disolución de galactosa 10^{-3} M.....	108
Figura 49. Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con Nafion® en disolución de galactosa 10^{-3} M: AgNWs/GaOx/NF (negro) y AgNWs/NF/GaOx (rojo).....	109
Figura 50. Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando Nafion® como inmovilizador enzimático de la GaOx en disolución de galactosa 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/GaOx/NF; b) configuración AgNWs/NF/GaOx.	110
Figura 51. Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima GaOx: a) configuración AgNWs/GaOx; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/NF/GaOx; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/GaOx/NF; c.1) detalle del pico catódico.....	111
Figura 52. Respuesta voltamétrica de AgNWs(negro), GaOx (rojo), AgNWs/GaOx (azul) AgNWs/GaOx/NF (verde) en disolución de galactosa 10^{-3} M.	113
Figura 53. Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con glutaraldehído en disolución patrón de catecol 10^{-3} M: AgNWs/TYR/GLU (negro) y AgNWs/GLU/TYR (rojo).	114
Figura 54. Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando vapores de glutaraldehído como inmovilizador enzimático de la TYR en disolución de catecol 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/TYR/GLU; b) configuración AgNWs/GLU/TYR.	115

- Figura 55.** Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima TYR: a) configuración AgNWs/TYR; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/GLU/TYR; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/TYR/GLU; c.1) detalle del pico catódico..... 116
- Figura 56.** Respuesta voltamétrica de los AgNWs (negro), TYR (rojo), AgNWs/TYR (azul) y AgNWs/TYR/GLU (verde) en disolución de catecol 10^{-3} M..... 118
- Figura 57.** Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con Nafion® en disolución de catecol 10^{-3} M: AgNWs/NF/TYR (negro) y AgNWs/TYR/NF (rojo). 119
- Figura 58.** Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando Nafion® como inmovilizador enzimático de la TYR en disolución de catecol 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/TYR/NF; b) configuración AgNWs/NF/TYR..... 120
- Figura 59.** Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima TYR: a) configuración AgNWs/TYR; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/NF/TYR; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/TYR/NF; c.1) detalle del pico catódico..... 121
- Figura 60.** Respuesta voltamétrica de AgNWs(negro), TYR (rojo), AgNWs/TYR (azul) AgNWs/TYR/NF (verde) en disolución de galactosa 10^{-3} M..... 123
- Figura 61.** a) Respuesta de la voltametría diferencial de pulsos para la configuración AgNWs/GaOx/GLU ante adiciones de galactosa 10^{-3} M; a.1) detalle del pico catódico..... 124
- Figura 62.** Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de galactosa en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/GaOx/GLU..... 125
- Figura 63.** a) Respuesta de la voltametría diferencia de pulsos para la configuración AgNWs/GaOx/NF ante adiciones de galactosa 10^{-3} M; a.1) detalle del pico catódico..... 126

Figura 64. Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de galactosa en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/GaOx/NF.	126
Figura 65. a) Respuesta de la voltametría diferencial de pulsos para la configuración AgNWs/TYR/GLU ante adiciones de catecol 10^{-3} M; a.1) detalle del pico catódico.....	127
Figura 66. Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de catecol en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/TYR/GLU.	128
Figura 67. Respuesta de la voltametría diferencial de pulsos para la configuración AgNWs/TYR/NF ante adiciones de catecol 10^{-3} M.	129
Figura 68. Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de catecol en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/TYR/NF.....	129
Figura 69. Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/GaOx/GLU en una disolución de galactosa 10^{-3} M.....	131
Figura 70. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/GLU para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido.....	132
Figura 71. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/GLU para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.	133
Figura 72. Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/GaOx/NF en una disolución de galactosa 10^{-3} M.....	134
Figura 73. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/NF para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido.....	134
Figura 74. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/NF para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.	135



- Figura 75.** Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/TYR/GLU en una disolución de catecol 10^{-3} M. 136
- Figura 76.** Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/GLU para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido. 136
- Figura 77.** Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/GLU para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. 137
- Figura 78.** Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/TYR/NF en una disolución de catecol 10^{-3} M. 138
- Figura 79.** Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/NF para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido. 138
- Figura 80.** Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/NF para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. 139



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Ecuación de Michaelis-Menten.....	37
Ecuación 2. Constante de Michaelis-Menten.....	37
Ecuación 3. Ley de Bragg.....	51
Ecuación 4. Fórmula de la absorbancia en función de la intensidad.....	53
Ecuación 5. Ley de Lambert-Beer.	53
Ecuación 6. Ecuación de Nernst.....	54
Ecuación 7. Reacción química general.....	54
Ecuación 8. Fórmula de la constante de equilibrio termodinámica para una reacción química general.....	54
Ecuación 9. Reacción de oxidación-reducción del electrodo de calomelanos saturado (ECS).....	56
Ecuación 10. Reacción de oxidación-reducción del electrodo de plata/cloruro de plata.....	56
Ecuación 11. Ecuación de Nernst para un sistema reversible en condiciones normales de temperatura.....	60
Ecuación 12. Ecuación de Randles-Sevcik para un sistema reversible.....	60
Ecuación 13. Potencial de las especies en un sistema reversible.....	60
Ecuación 14. Ecuación de Randles-Sevcik para un sistema irreversible.....	60
Ecuación 15. Potencial de pico para un sistema irreversible.....	61
Ecuación 16. Relación correspondiente a la capa electroactiva de adsorbato para un sistema reversible.....	61



Ecuación 17. Determinación de la superficie del electrodo recubierta por el receptor biológico.	62
Ecuación 18. Límite de detección.	63
Ecuación 19. Ecuación de Henderson-Hasselbalch para la preparación de tampón fosfato.	76



Índice de tablas

Tabla 1. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con glutaraldehído.....	107
Tabla 2. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con GaOx y glutaraldehído.....	107
Tabla 3. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con Nafion®.....	112
Tabla 4. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con GaOx y Nafion®.....	112
Tabla 5. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con glutaraldehído.....	117
Tabla 6. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con TYR y glutaraldehído.....	117
Tabla 7. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con Nafion®.....	122
Tabla 8. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con TYR y Nafion®.....	122
Tabla 9. Resumen de datos de las configuraciones con GaOx.....	130
Tabla 10. Resumen de datos de las configuraciones con TYR.....	130
Tabla 11. Resumen de datos de la cinética para las configuraciones seleccionadas.	139



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

1. Introducción y objetivos

1.1. Introducción

La industria alimentaria comprende un conjunto de actividades destinadas al tratamiento, transformación, conservación y envasado de productos alimentarios [1]. Es la principal industria manufacturera de la Unión Europea y genera alrededor de 1.109.000 millones de Euros anuales. Además, cuenta con casi 300.000 empresas, de las cuales el 90% son PYMES y proporcionan trabajo a más de cuatro millones y medio de personas [2].

En España, la industria alimentaria es clave a nivel económico, ya que representa el 24,3% del sector industrial y el 2,5% del PIB, y factura entorno a 107.000 millones de Euros al año. Se encuentra en quinta posición en el marco europeo, después de Francia, Alemania, Italia y Reino Unido. En España, en función de la distribución territorial y las cifras de negocio, Cataluña supone el 23,7 % de la industria alimentaria nacional, seguida de Andalucía con un 15,3 % y Castilla y León en tercer lugar con un 8,5 % [2].

La industria agroalimentaria en Castilla y León es la segunda más importante en producción a nivel regional. Los subsectores más importantes son la industria cárnica, la industria láctea, la industria vinícola y otras bebidas, la industria del azúcar y sus derivados, así como el pan y las galletas, que representan el 82 % de la producción total en esta comunidad autónoma [3]. En la **figura 1** se pueden observar los diferentes subsectores según la producción de la región.

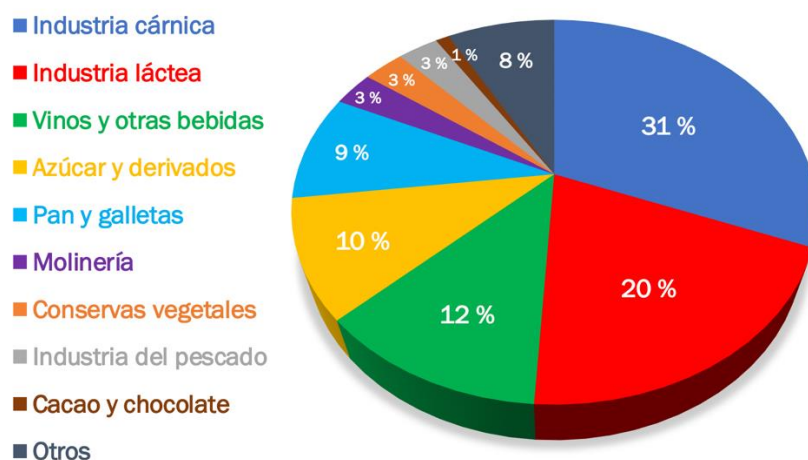


Figura 1. Subsectores más importantes en cuanto a producción de la industria alimentaria en Castilla y León.

Dentro de la industria de la alimentación tienen una gran importancia las industrias destinadas a la producción de leche y sus derivados y de bebidas, tales como el vino.

La industria láctea castellano-leonesa factura 1.100 millones de Euros anuales con una producción bruta de 1.425 millones de litros, mayoritariamente procedente de vaca, y aporta al país el 75 % del total nacional de leche de oveja [3].

En cuanto a la industria vinícola, la producción ha crecido exponencialmente en los últimos años. Castilla y León ocupa el cuarto puesto nacional en superficie, cuenta con 70.000 ha. de viñedo y produce 200 millones de litros al año [3].

La industria alimentaria crece y se renueva continuamente, empleando nuevas tecnologías y adaptándose a lo que requieren los consumidores, manteniendo controles de calidad cada vez más exigentes y mejorando la producción, es lo que se denomina la cuarta revolución industrial, Industria 4.0 [4].

La Industria 4.0 consigue que la economía sea más dinámica, se flexibilice la producción sin provocar cambios que afecten al tiempo de proceso, se satisfaga la demanda del cliente y se optimice la toma de decisiones, manejando la información en tiempo real y aumentando así la productividad y eficiencia de recursos [4].

Con esta demanda por parte de la industria y la población, surgen grupos de investigación que estudian las posibles mejoras en este sector.

El grupo UVaSens, dirigido por la profesora y catedrática de Química Inorgánica María Luz Rodríguez Méndez del departamento de Química Física y Química Inorgánica, situado en la Escuela de Ingenierías Industriales, es un equipo multidisciplinar que trabaja en el desarrollo de sensores nanoestructurados y en el diseño de narices y lenguas electrónicas para el análisis y control de calidad en alimentación, aplicadas en las industrias vinícola y láctea [5].

Este trabajo se ha centrado en el desarrollo de biosensores electroquímicos compuestos por nanoestructuras metálicas sobre los que se anclaron enzimas encargadas de detectar sustancias que se encuentran presentes en bebidas, como el vino o la leche.

1.2. Objetivos

El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar biosensores electroquímicos nanoestructurados, mediante la técnica spin-coating, para la detección de galactosa o catecol gracias a la intervención de las enzimas que catalizan sus correspondientes procesos redox: la Galactosa oxidasa (GaOx) y la Tirosinasa (TYR), respectivamente.



Para llevarlo a cabo, se siguieron una serie de pasos, que se exponen a continuación:

1. Se sintetizaron AgNWs por el método del poliol y se caracterizó su tamaño y dimensiones mediante técnicas espectroscópicas, difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
2. Se desarrollaron películas nanoestructuradas mediante la técnica spin-coating, al depositar AgNWs para mejorar la transferencia de electrones entre el analito y el electrodo de trabajo.
3. Para obtener los sensores que poseyeran las mejores características posibles, se estudiaron las diferentes configuraciones de las películas nanoestructuradas.
4. Se desarrollaron biosensores utilizando la técnica drop casting para la inmovilización enzimática sobre la película nanoestructurada.
5. Se caracterizaron los biosensores mediante técnicas espectroscópicas como FT-IR y UV-Vis.
6. Se estudió el comportamiento de estos sensores frente a disoluciones de galactosa o catecol mediante técnicas electroquímicas, concretamente, voltamperometría cíclica y voltametría diferencial de pulsos.
7. Se seleccionaron las configuraciones óptimas y se estudió su reproducibilidad, su repetitividad y su sensibilidad ante la presencia de analito.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



II. DESARROLLO DEL TFG



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

2. Fundamento teórico

2.1. Antecedentes y estado del arte

La industria alimentaria requiere una producción segura, con controles de calidad cada vez más exhaustivos y controles de proceso que aporten a las empresas mayor eficiencia y sostenibilidad.

Los nuevos avances en ciencia y tecnología se han convertido en una herramienta esencial para alcanzar los objetivos marcados en la industria alimentaria por el ser humano: el crecimiento de la población, su salud, el mantenimiento, suministro y seguridad de los alimentos y el uso sostenible de los recursos [6].

La nanociencia es la ciencia que estudia materiales con tamaños menores de 100 nm y su interés se basa en que estos materiales poseen propiedades físicas y químicas diferentes a las partículas macroscópicas.

La nanotecnología se basa en la manipulación o el autoensamblaje de materiales de tamaño nanométrico, para crear nuevos dispositivos y procesos [6]. Estos dispositivos ayudan a evaluar la calidad de los alimentos, discriminando los productos en función de su calidad y determinando adulteraciones y contaminantes. Aprovechando la versatilidad de la nanociencia y la nanotecnología analítica, se han desarrollado sensores que se benefician de las propiedades de los nanomateriales, siendo capaces de detectar la presencia de compuestos en concentraciones del orden de una parte por millón [7].

Los recientes estudios para la detección de estos compuestos han llevado a la mejora de las técnicas de determinación analíticas y de los sensores empleados. Los métodos de detección basados en la nanotecnología proporcionan una serie de ventajas frente a la metodología que poseen los laboratorios convencionales. Las tecnologías que utilizan nanomateriales, combinados con técnicas electroquímicas u ópticas ofrecen métodos rápidos, en tiempo real, simples, sensibles, selectivos y rentables que permiten la miniaturización, la automatización y la portabilidad de las pruebas, con el objetivo de determinar interferentes, adulteraciones, realizar controles de calidad, etc. Además, ofrecen la capacidad de realización de varias pruebas simultáneamente, para múltiples analitos con una sensibilidad excepcionalmente alta, que reduce significativamente el coste de las pruebas y el tiempo de detección [8].

2.2. Sensores

Una herramienta, cada vez más extendida en el diagnóstico biomédico, en el tratamiento y control de enfermedades, en el control ambiental, en la industria alimentaria y en el descubrimiento de fármacos, es la utilización de sensores [9].

Los sensores son capaces de detectar la presencia de ciertas sustancias a nivel de trazas. Además, al ser un método rápido, en caso de que hubiese un producto en mal estado o modificado debido a la presencia de algún agente no deseable, permitiría a las empresas detener la producción, limitando el daño a una parte del proceso y desperdiciando la menor cantidad de alimentos posible [10].

2.2.1. Definición y clasificación

Un sensor es un dispositivo que transmite un impulso eléctrico como respuesta a un estímulo físico, químico o biológico para medir un cambio en cualquier propiedad intrínseca del material que lo constituye [11]. Se caracteriza por su tamaño reducido, su robustez, su fácil utilización y su fiabilidad [12].

Un sensor consta de un **elemento de detección** que reconoce la presencia de un analito, el **receptor** que transmite la señal a un **transductor** altamente específico para el analito, que a su vez convierte la reacción analito-receptor en una señal cuantitativa óptica, térmica, másica o eléctrica a la que se denomina señalización [9] [13]. Esta señal de salida debe ser amplificada, ya que los transductores producen señales de intensidad bajas y se envía a un sistema que registre los datos, los procese y represente [14].

Según la naturaleza de la variable que se quiera medir, los sensores se clasifican en dos tipos:

- Sensores físicos: cuando la información recibida por el receptor es de tipo físico, como la presión o la temperatura.
- Sensores químicos: cuando la información es de tipo químico, como la concentración del analito.

Los sensores químicos son dispositivos que transforman una señal química en una señal capaz de cuantificar la concentración de un componente específico de la muestra analizada [15]. Se basan en transductores electroquímicos o eléctricos. Estos utilizan técnicas electroquímicas: amperometría, potenciometría, conductimetría y carga iónica [12].

Los sensores electroquímicos más utilizados se basan en la amperometría, la potenciometría o la impedancia [12]. Dentro de los sensores amperométricos se encuentran los **sensores voltamétricos o voltamperométricos**, que obtienen una señal de intensidad de corriente a partir de un potencial variable con el tiempo. Estos sensores se usan para analizar especies electroactivas sometidas a procesos de oxidación-reducción como, por ejemplo, los azúcares o los fenoles. Las ventajas que proporcionan los sensores son su facilidad de desarrollo y su rapidez y el principal inconveniente es que aportan una intensidad baja y son poco selectivos [16].

Para resolver este problema, en este proyecto se han empleado nanomateriales en los sensores con capacidades electrocatalíticas para mejorar la sensibilidad y la selectividad de la señal tras la inmovilización de las enzimas que catalizan los procesos redox que intervienen en presencia de los analitos correspondientes.

2.2.2. Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos contienen algún receptor biológico con el fin de detectar, transformar y cuantificar una sustancia específica, aprovechando su especificidad, su elevada sensibilidad y reproducibilidad, la estabilidad del receptor sobre el sustrato empleado y la selectividad [9, 17]. Un biorreceptor se encarga de reconocer el analito, interactúa con él y genera una señal de reconocimiento biológico, como son los aminoácidos, las proteínas, las enzimas, los anticuerpos, el ADN o algunas bacterias. Un transductor se encarga de interpretar la reacción que produce el biorreceptor y traducirla en una señal cuantificable. Por último, un detector amplifica y procesa la señal [18, 19].

La estructura de un biosensor se muestra en la **figura 2**:

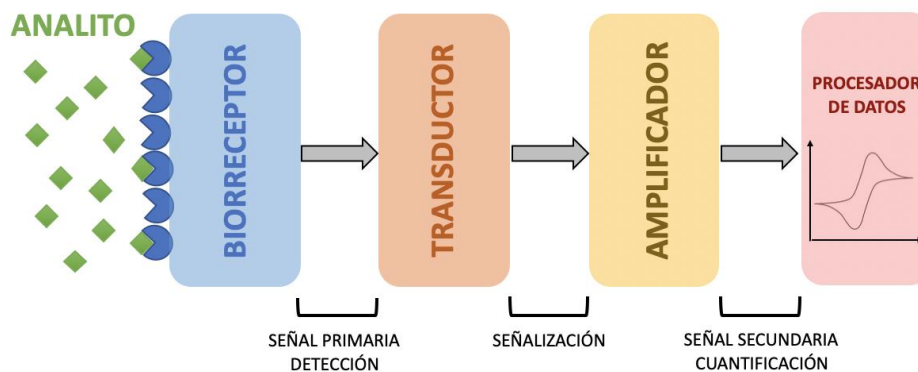


Figura 2. Esquema estructural de un biosensor electroquímico.

Los biosensores se encuentran en continuo desarrollo para asegurar la inocuidad y la calidad de los alimentos, porque conducen a métodos de detección rápidos, sensibles y específicos. En los últimos años se han realizado muchas mejoras en el desarrollo de estos dispositivos, gracias a la nanotecnología y la microfluídica, especialmente para la detección de compuestos en la industria alimentaria. Por ello, se consideran herramientas innovadoras y que prometen detectar gran cantidad de componentes y adulteraciones en los alimentos [20].

Estos sensores son de especial interés en la industria alimentaria para mantener controles de calidad y preservar la seguridad de los productos [17].

2.2.2.1. Materiales utilizados en el desarrollo de biosensores electroquímicos

Los materiales utilizados en esta investigación para desarrollar biosensores electroquímicos se clasifican en: materiales para el electrodo y sustratos utilizados, elementos biológicos, materiales utilizados para la inmovilización de receptores biológicos y materiales para mejorar el rendimiento electroanalítico del biosensor [21].

2.2.2.1.1. Materiales del electrodo y sustratos utilizados

Los materiales utilizados para el electrodo, que actúa como sustrato, suelen ser materiales conductores [22]. Los más utilizados son: metales, como el platino [23], el oro [24] o la plata [25]; óxidos metálicos, como el óxido de indio y estaño (ITO) [26]; materiales de carbono, como grafito [27], fibra de carbono [28], carbono vítreo [29], diamante dopado con boro [30], polímeros orgánicos electroconductores [31] o sales [32]. En este proyecto se utilizó un sustrato de óxido de indio y estaño (ITO) para el desarrollo de los sensores.

Los nanomateriales conductores son ideales para mejorar la actividad electrocatalítica de los biosensores ya que favorecen la inmovilización de un receptor biológico en la superficie de un electrodo, manteniendo su actividad biológica y además, actúa como mediador electrónico facilitando la transferencia de electrones entre el biorreceptor y el electrodo [33], lo que es un aspecto crucial en el desarrollo de biosensores [34].

Seleccionar el método de inmovilización adecuado depende de la naturaleza del elemento biológico, del tipo de transductor, de las propiedades fisicoquímicas del analito y de las condiciones funcionales del biosensor [35].

2.2.2.1.1.1. ITO (Óxido de Indio y Estaño)

El óxido de indio y estaño (ITO) se deposita como una película delgada de óxido conductor transparente sobre vidrio. Este material se ha convertido en uno de los más importantes en el desarrollo de biosensores, debido a sus excelentes propiedades [36, 37].

El ITO es una disolución de óxido de indio (III) con óxido de estaño (V) ($\text{In}_2\text{O}_3\text{-SnO}_2$) en proporción 9:1 [37]. Se trata de un material transparente depositado sobre vidrio, que presenta conductividad eléctrica, gran adhesión al sustrato, baja corriente capacitiva y características electroquímicas y físicas estables y que, por tanto, se utiliza en análisis electroquímico [38, 39].

Gran cantidad de nanomateriales como: nanotubos de carbono [40], nanopartículas de oro [41] o nanohilos de plata [42] se han utilizado en la construcción de sensores y biosensores basados en ITO, debido a que aumentan la actividad electroanalítica de los electrodos de este material [37].

El ITO ha demostrado ser un material muy útil como electrodo en el desarrollo de biosensores por su conductividad y robustez, además de su larga vida útil, su alta estabilidad y su bajo coste [37].

2.2.2.1.2. Receptores biológicos

Según el tipo de receptor biológico, los biosensores electroquímicos se pueden clasificar en biosensores enzimáticos, biosensores microbianos, genosensores e inmunosensores [43]. En este proyecto, se desarrollaron biosensores enzimáticos.

Los biosensores enzimáticos son dispositivos analíticos que poseen una enzima como receptor biológico asociado a un transductor para producir una señal proporcional a la concentración de analito presente en la muestra [43].

2.2.2.1.2.1. Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos proteicos que aceleran las reacciones químicas sin consumirse en el proceso, hacen disminuir la energía de activación y aumentan la velocidad de reacción sin alterar los productos de reacción, como puede verse en la **figura 3**. Para ello, se une a una molécula llamada sustrato, que es específica de la propia enzima, formando el complejo enzima-sustrato y llevando a cabo la reacción con una mayor selectividad, mayor eficiencia y menor consumo energético [44].

La actividad catalítica de las enzimas se puede expresar mediante la tasa de rotación, k_{cat} , que representa el número de moléculas de sustrato que se pueden transformar en producto, utilizando una única molécula de enzima por unidad de tiempo [44].

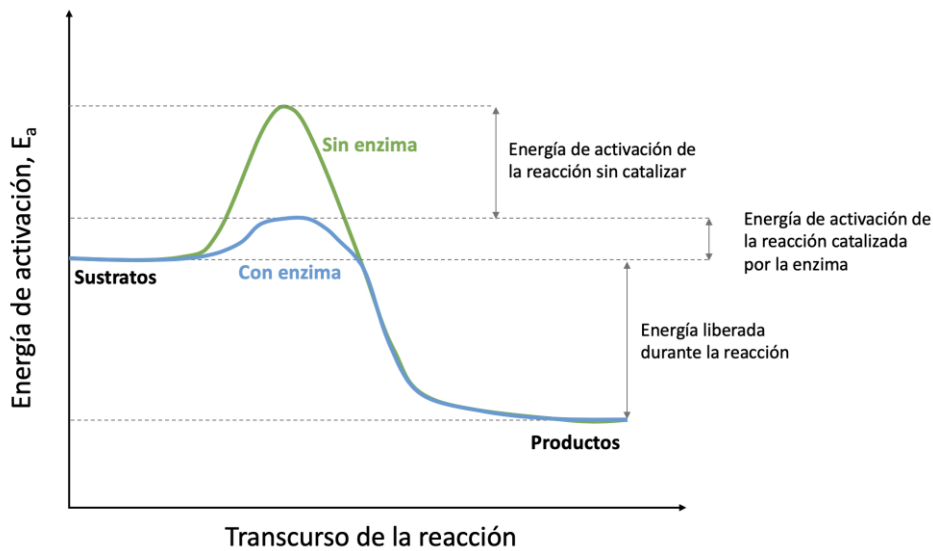


Figura 3. Esquema de la reacción catalizada y no catalizada por la enzima.

Los parámetros cinéticos de esta reacción se rigen por la teoría de Michaelis-Menten. El modelo describe la reacción que se muestra en la figura 4 [45]:

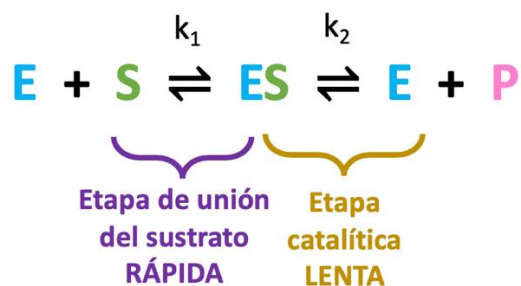


Figura 4. Modelo cinético de Michaelis-Menten.

La ecuación de Michaelis-Menten, de forma simplificada se presenta a continuación:

$$\frac{\partial [P]}{\partial t} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 1. Ecuación de Michaelis-Menten.

Donde [P] es la concentración de producto formado en mol/m³, [S] la concentración de sustrato en mol/m³, V_{max} la tasa máxima de consumo de la especie en mol/s, y K_m la constante de Michaelis-Menten en mol/m³ [45].

La constante de Michaelis-Menten representa la concentración para la cual la velocidad de reacción es la mitad de V_{max} y su expresión es la siguiente [45]:

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

Ecuación 2. Constante de Michaelis-Menten.

Donde k₁ es la constante de la velocidad de asociación enzima-sustrato en mol/m³ s, k₋₁ es la constante de velocidad de disociación enzima-sustrato en s⁻¹ y k₂ es la constante de velocidad de disociación que resulta en la transformación de sustrato al producto en s⁻¹ [45].

Las enzimas son altamente sensibles a las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica en las que se encuentran, por lo que pequeños cambios pueden derivar en la pérdida de actividad enzimática, o incluso llegar a la desnaturalización de las mismas [46].

Según el tipo de reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en seis clases principales [46]:

- **Oxidoreductasas.** Estas enzimas catalizan reacciones redox. Este grupo incluye deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas y oxigenasas [46].
- **Transferasas.** Son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo de átomos de un sustrato donador a otro aceptor [46].
- **Hidrolasas.** Son enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces C-O, C-N, C-S y O-P mediante hidrólisis [46].

- **Liasas.** Catalizan la ruptura de los enlaces C-C, C-S y C-N, excluyendo los enlaces peptídicos, en un sustrato y forman dobles enlaces o ciclos [46].
- **Isomerasas.** Catalizan reacciones de isomerización de cualquier tipo: ópticas, geométricas o posicionales [46].
- **Ligasas.** Catalizan la unión de dos moléculas de sustrato, mediante enlaces covalentes [46].

La GaOx y TYR, pertenecen al primer grupo de la clasificación y son las que se estudian en este trabajo.

Galactosa oxidasa (GaOx)

La GaOx (**figura 5**), es una enzima oxidorreductasa; una metaloenzima de cobre con masa molecular entre 65 y 68 kDa, que se encuentra en las especies de hongos *Polyporus circinatus* y *Dactylium dendroides* [47].

Esta enzima cataliza la oxidación regioselectiva de alcoholes primarios a sus correspondientes aldehídos. La reacción requiere oxígeno molecular como oxidante y puede realizarse en disolución acuosa, por lo que resulta poco costosa [47].

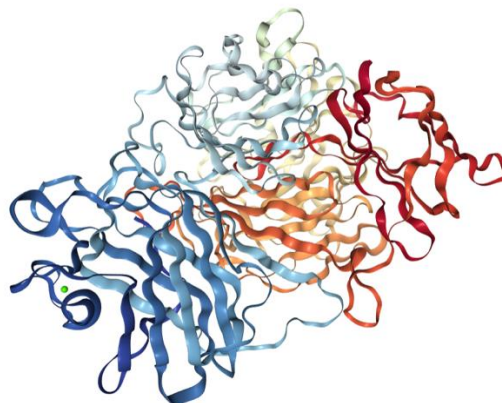


Figura 5. Estructura tridimensional de la enzima Galactosa Oxidasa, GaOx [48].

La utilización de GaOx en técnicas analíticas, como biosensores, para la detección de galactosa y sacáridos que la contienen, como la lactosa, es factible y resulta de gran utilidad [49].

La actividad enzimática está regulada por el pH de la disolución. Si este se altera, se puede producir un cambio en el estado de ionización de los grupos aminoácido en el sitio activo [50]. La GaOx pierde su actividad enzimática por debajo de pH 5 [51] y su pH óptimo es 7 [52].

La estructura del sitio activo de la GaOx (**figura 6**) muestra la coordinación del ion cobre con dos residuos de histidina (His496 y His581), una tirosina simple (Tyr495) y una tirosina modificada covalentemente (Tyr272) con un residuo de cisteína (Cys228). El enlace tioéter que une estos últimos dos residuos afecta a la estructura y a la reactividad de la proteína, ya que actúa como ligando al átomo de cobre formándose un complejo estable [53].

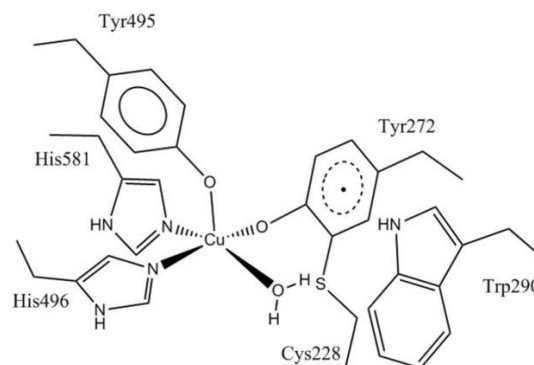


Figura 6. Estructura química del centro activo de la Galactosa Oxidasa, GaOx [48].

El centro activo de la enzima posee tres niveles de oxidación accesibles: una forma activa, una forma inactiva y una forma totalmente reducida [47].

- En la forma activa, el cobre se encuentra en estado de oxidación +2 y la tirosina en forma de radical [47].
- En la forma inactiva, la tirosina se reduce. Esta se puede tratar con oxidantes suaves para devolverla a su forma de radical activo [47].
- En su forma reducida, el cobre está en estado de oxidación +1 y puede reaccionar con el oxígeno molecular y generar el peróxido de hidrógeno. Se conoce que las elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno inactivan la enzima GaOx, por lo que se puede agregar a la reacción catalasa, que degrada el peróxido de hidrógeno y prolonga la actividad enzimática de la GaOx [47].

La reacción catalítica de la GaOx implica semirreacciones de oxidación y reducción, que oxidan la galactosa al aldehído correspondiente y reducen el oxígeno molecular, que actúa como aceptor de electrones, produciéndose peróxido de hidrógeno [54, 55]. La **figura 7** indica el mecanismo de reacción de la GaOx:

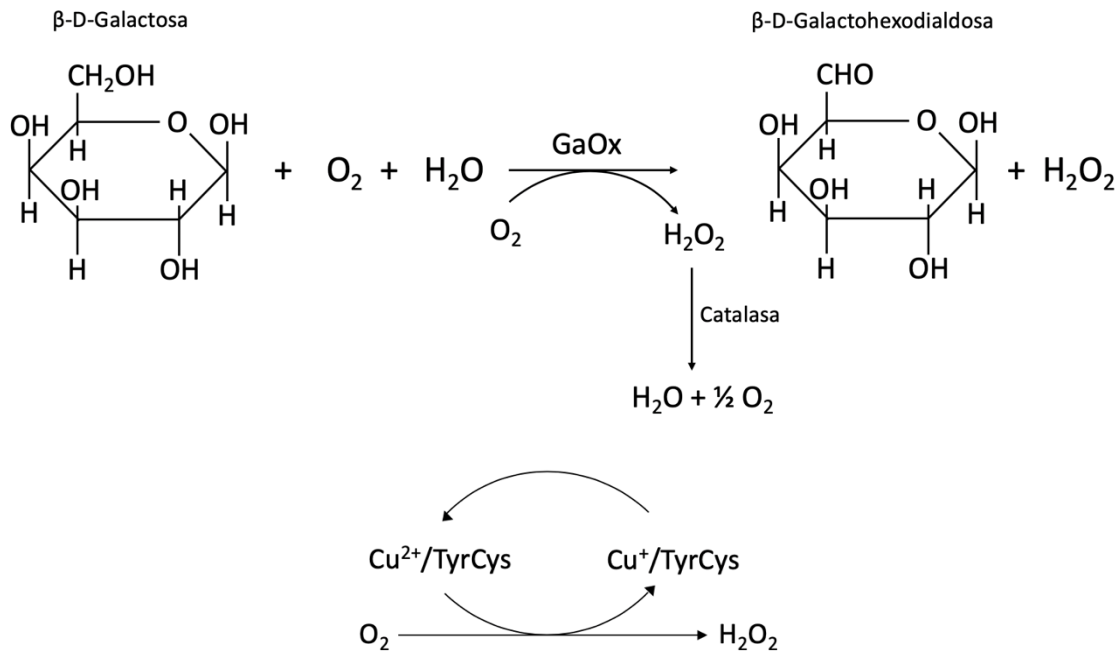


Figura 7. Mecanismo de reacción de la enzima Galactosa Oxidasa, GaOx.

El uso de GaOx en la preparación de biosensores es un método rápido y estable para la determinación de galactosa en la industria química clínica, en alimentación y fermentación, menos costoso y sensible, además de no requerir tratamientos previos [56].

Tirosinasa (TYR)

La tirosinasa, TYR (**figura 8**) es una polifenol oxidasa; una proteína presente en los vegetales, las frutas y los champiñones, que tiene un centro catalítico formado por cobre dinuclear de tipo III, es decir, cada átomo está rodeado por tres residuos de histidina dentro de su sitio activo [57]. Su peso molecular es de 120 kDa y proviene de la cepa *Agaricus bisporus* [58].

Esta enzima cataliza la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles y la oxidación del producto difenólico a la ortoquinona resultante [53].

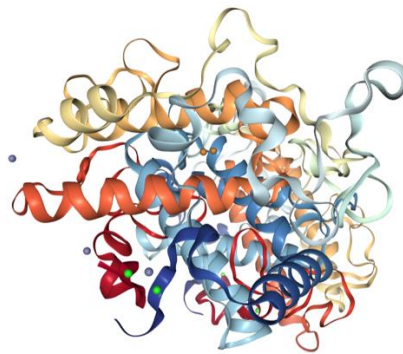


Figura 8. Estructura tridimensional de la enzima Tirosinasa, TYR [17].

La actividad enzimática de la TYR se pierde cuando el pH alcanza el valor de 10 [59], mientras que su pH óptimo se encuentra en el valor 7 [60].

Una característica del centro activo de la TYR, mostrado en la **figura 9**, es el enlace tioéter entre el residuo de histidina (His109), ligando del ion cobre A, y el residuo de cisteína (Cys92), similar al que posee la GaOx [61].

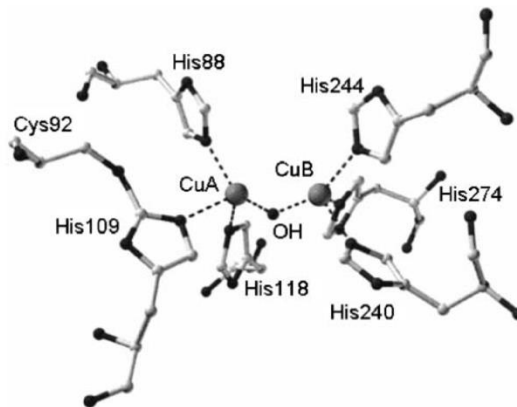


Figura 9. Estructura química del centro activo de la tirosinasa, TYR [61].

Durante la reacción catalítica, el centro del cobre tipo III coexiste en tres formas:

- La forma desoxi, $\text{Cu}^+ - \text{Cu}^+$, es una especie reducida que se une al oxígeno molecular para dar la forma oxi [53].

- La forma oxi, $\text{Cu}^{2+} - \text{O}_2^{2-} - \text{Cu}^{2+}$, desestabiliza el enlace O-O y lo activa. Esto se produce porque el oxígeno molecular se une en forma de peróxido al cobre +2 [53].
- La forma met, $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{2+}$, es una especie en reposo. El ion cobre +2 se conecta a una molécula de agua o a un grupo hidroxilo [53].

El mecanismo de reacción de la TYR se observa en la **figura 10**:

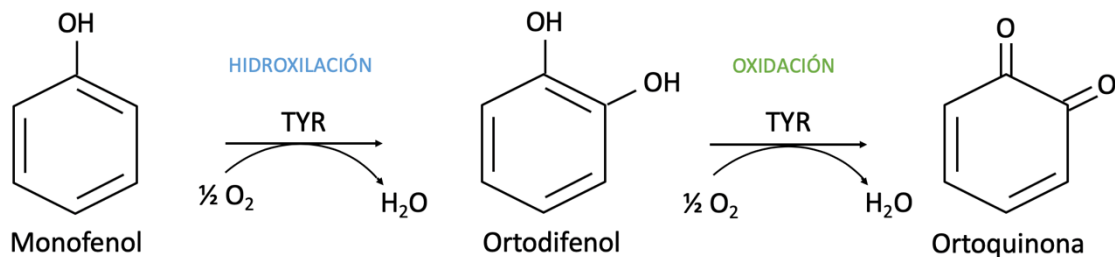


Figura 10. Mecanismo de reacción de la enzima Tirosinasa, TYR.

Los biosensores electroquímicos se consideran un método interesante para la detección de compuestos fenólicos, basados en la inmovilización de la fenol oxidasa correspondiente. Esta técnica ofrece alta sensibilidad, buena selectividad, una respuesta rápida y un bajo coste, además de tener buenas propiedades electrónicas y ser de fácil acceso al analito [17].

2.2.2.2. Métodos de inmovilización enzimática

El empleo de enzimas como catalizadores biológicos ofrecen condiciones de reacción suaves, biodegradabilidad y eficiencia catalítica. Sin embargo, los procesos industriales operan en condiciones duras, que aumentan la probabilidad de desestabilizar la actividad enzimática, acortando su vida útil. Por esta razón, los métodos de inmovilización enzimática son una forma eficaz para mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas [62].

Estas técnicas consisten en confinar una enzima en una fase matriz o soporte, normalmente un polímero inerte o un material inorgánico, que ayuda a estabilizarla [63].

La inmovilización de enzimas es un proceso fácil, rápido y fiable para el estudio electroquímico de las reacciones catalizadas por enzimas y para la determinación de la concentración de los compuestos a analizar [63].

Los principales métodos de inmovilización que se utilizan son los que se describen a continuación:

- **Adsorción.** La adsorción de enzimas es la técnica más sencilla. Se fundamenta en la interacción entre el soporte y la enzima, debida a fuerzas electrostáticas que se crean entre ellos [64]. El inconveniente de este método es que hay que tener en cuenta varios factores que influyen en la actividad enzimática, como la carga superficial, las condiciones de temperatura, de pH y concentración de la enzima [65]. Para esta técnica se utilizan soportes con una buena capacidad de retención de agua y una elevada propiedad de intercambio de cationes [63].
- **Unión covalente o cross-linking.** En esta técnica, las enzimas se unen entre sí formando una estructura tridimensional, usando algún reactivo bi o multifuncional para formar enlaces covalentes entre ellas [65]. Mantener las propiedades estructurales y funcionales de las enzimas es la principal función del agente de reticulación, uno muy utilizado es el glutaraldehído, de carácter bifuncional, ya que es soluble en disolventes acuosos y puede formar enlaces covalentes estables [63].
- **Inmovilización por afinidad.** La matriz se acopla a un ligando que tiene afinidad por la enzima o bien, se acopla la enzima con un ligando que tiene afinidad por la matriz a través de interacciones débiles por puentes de hidrógeno, fuerzas no-covalentes o fuerzas de Van del Waals [63].
- **Atrapamiento.** Esta técnica de retención física consiste en encapsular la enzima mediante enlaces covalentes o no-covalentes dentro de geles o fibras, manteniendo su estabilidad mecánica [63]. El movimiento de la enzima está restringido por la estructura tridimensional del gel, pero no hay unión entre la enzima y el gel, por lo que la enzima se puede mover con total libertad en su interior [64].

En este trabajo se inmovilizaron las enzimas GaOx y TYR mediante cross-linking con vapores de glutaraldehído y mediante atrapamiento con Nafion® comercial.

2.2.2.3. *Materiales utilizados para la inmovilización de receptores biológicos*

2.2.2.3.1. Glutaraldehído

El glutaraldehído ($C_5H_8O_2$) es un dialdehído lineal compuesto por 5 carbonos, con dos grupos aldehído en sus carbonos 1 y 5. Se trata de un líquido incoloro y aceitoso con un olor fuerte, que es soluble en agua y en disolventes orgánicos en todas proporciones [66]. Además, es más efectivo que otros aldehídos en la generación de reticulaciones térmica y químicamente estables [67], ya que se demostró que la reactividad es máxima cuando el aldehído posee cinco carbonos [68].

El empleo de enzimas libres en sensores es limitado, ya que se desnaturalizan con facilidad, tienen un tiempo de vida útil corto y son bastante inestables. La inmovilización de enzimas mediante cross-linking con glutaraldehído puede aumentar su estabilidad y protegerlas de la degradación [69], porque se consigue que las enzimas se unan al soporte con bastante rigidez al utilizar glutaraldehído como inmovilizador enzimático. Además, aunque las enzimas quedan atrapadas, el transporte de materia entre el medio y las enzimas no está impedido [70].

La inmovilización enzimática por entrecruzamiento retiene la capacidad catalítica de la enzima, ya que se forman enlaces entre el glutaraldehído y la enzima, previniendo así la deformación de su centro activo [71].

Por otro lado, la elección del pH es un factor importante a tener en cuenta. La mayoría de las inmovilizaciones enzimáticas con glutaraldehído se llevan a cabo a pH neutro para evitar su desnaturalización [72].

La estabilidad térmica de las enzimas aumenta al inmovilizarlas por entrecruzamiento con glutaraldehído, ya que este método introduce enlaces covalentes, que hacen que la estructura de las enzimas sea más fuerte y, por lo tanto, se pueda trabajar a temperaturas superiores [71].

2.2.2.3.2. Nafion®

En los últimos años, se ha mejorado la sensibilidad de las mediciones, la selectividad y la vida útil de los electrodos mediante la modificación química con recubrimientos de membrana [73].

El Nafion® ($C_7HF_{13}O_5S \cdot C_2F_4$) es una marca comercial de la compañía Chemours para denominar a un copolímero a base de tetrafluoroetileno sulfonado, que pertenece a una clase de polímeros sintéticos con propiedades iónicas, llamados ionómeros. Se utiliza como membrana de intercambio de protones debido a su excelente estabilidad térmica y mecánica [74, 75].

Los polímeros hidrofóbicos e hidrófilos pueden formar estructuras micelares estables, como es el caso del Nafion®. Este polímero hidrofóbico se ha empleado en sensores electroquímicos porque su estructura porosa permite el fácil transporte y la concentración de cationes dentro de la membrana, además de su aplicación en la inmovilización de enzimas [73] mediante atrapamiento [76] para el desarrollo de biosensores, debido a su biocompatibilidad [73].

Se ha demostrado en numerosos estudios previos [77, 78, 79] que el Nafion® puede inmovilizar y estabilizar eficazmente las enzimas oxidorreductasas y se observa mayor actividad enzimática que con otras membranas como el quitosán. Además el entorno hidrofóbico aumenta la cinética de la enzima [73].

2.2.2.4. *Técnicas de desarrollo de sensores*

El desarrollo de películas nanoestructuradas es una técnica de gran importancia en la mejora de la sensibilidad de los sensores electroquímicos, debido a que su superficie es uniforme y poseen una mayor relación superficie/volumen, que hace que las moléculas de analito se adsorban y desorban de los sitios activos de forma rápida. Además, la estructura y propiedades de las películas a escala nanométrica son distintas de las que tienen las películas de los mismos materiales, fabricadas a escala macromolecular [80].

Para el desarrollo de películas delgadas nanoestructuradas existen numerosas técnicas de preparación, entre ellas se incluyen Langmuir-Blodgett, Layer by Layer, monocapas autoensambladas o Self Assembled Monolayers, drop-casting y spin-coating.

A continuación, se da una breve explicación del funcionamiento de cada una de ellas:

La técnica **Langmuir-Blodgett** (LB) consiste en la obtención de películas LB a partir de la dispersión de moléculas de interés sobre la superficie del agua contenida en una cubeta de teflón, denominada balanza de Langmuir. Cuando el disolvente, en el que la molécula es soluble, se evapora, se comprimen las moléculas en la interfase aire-agua para provocar su orientación. Como resultado se obtiene una monocapa flotante ordenada que se puede depositar sobre un sustrato sólido por inmersión de este, de forma perpendicular a la superficie del agua. Si este proceso se realiza varias veces, se obtienen multicapas de la especie de interés sobre el sustrato [81, 82].

El método **Layer by Layer** (LbL) se basa en la adsorción sobre un sustrato sólido de películas y multicapas delgadas [83], alternando disoluciones con polielectrolitos de carga opuesta [84]. Las películas se adhieren por fuerzas electrostáticas y/o no

electrostáticas al sustrato (mediante puentes de hidrógeno y por interacciones ligando-receptor).

La técnica de **monocapas autoensambladas** o Self-Assembled Monolayers (SAM) consiste en la adsorción espontánea de moléculas sobre un sustrato sólido de manera ordenada. La fuerza impulsora para el autoensamblaje es la afinidad química entre las moléculas y el sustrato [85].

La técnica **drop-casting** consiste en depositar una gota del material en disolución sobre la superficie del sustrato, extenderla y dejarla secar al ambiente. El disolvente se evapora, obteniéndose una película del material de interés, como muestra la **figura 11** [86].

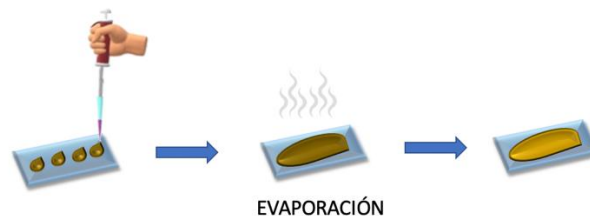


Figura 11. Esquema de la técnica drop-casting.

El espesor de la película depende del volumen depositado y de la concentración del material. También hay otras variables que influyen en la estructura de la misma, como la velocidad de evaporación, las fuerzas capilares y la tensión superficial [86]. Un inconveniente de esta técnica es que puede variar el espesor de la película y la concentración de material depositado en diferentes secciones de la misma, debido a la extensión manual del material en disolución, sin embargo, se trata de una técnica rápida, simple y que precisa poco material para su aplicación.

La técnica **spin-coating** es un método sencillo para fabricar películas delgadas uniformes sobre un sustrato. El proceso consiste en depositar una gota del material de recubrimiento sobre el centro de la superficie del sustrato. A continuación, el soporte se hace girar alrededor de un eje, el cual se encuentra perpendicular al área del recubrimiento, a velocidad controlada [87]. La disolución se dispersa debido a las fuerzas centrífugas y forma una capa uniforme sobre el electrodo. La evaporación del disolvente da como resultado un recubrimiento homogéneo del material depositado [88]. La **figura 12** muestra el mecanismo de esta técnica.

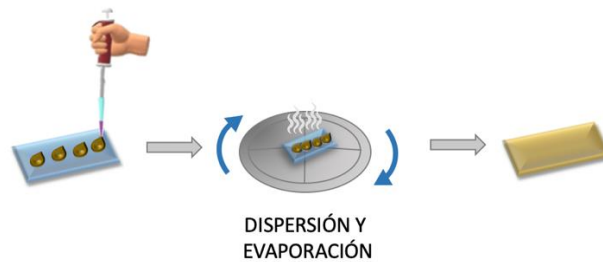


Figura 12. Esquema de la técnica spin-coating.

El grosor de la película está determinado por la velocidad de giro, la tensión superficial, la viscosidad de la disolución, la concentración de la disolución, la velocidad de evaporación del disolvente y la porosidad del soporte [88, 89].

En este trabajo, se utilizaron las técnicas drop-casting y spin-coating para el desarrollo de los sensores electroquímicos.

2.2.2.5. *Nanomateriales como mediadores electrónicos para mejorar el rendimiento electroanalítico de biosensores electroquímicos*

Con el desarrollo de la nanociencia y la nanotecnología, la integración de nanomateriales metálicos en el campo de la biodetección ha sido el centro de atención de los investigadores en los últimos años, debido a las propiedades físicas, químicas, eléctricas y ópticas especiales que poseen los materiales nanoestructurados.

Se ha empleado una gran variedad de materiales metálicos unidimensionales en el desarrollo de sensores electroquímicos, incluyendo nanopartículas [90], nanotubos [91], nanobarras [92] o nanohilos [93], utilizando técnicas para depositarlos como las descritas anteriormente.

La plata tiene mayor conductividad eléctrica y térmica que otros metales [94], por lo que, los nanomateriales de este metal conservan dichas propiedades y se consideran de gran interés.

Los nanohilos de plata (AgNWs) se han utilizado en sensores electroquímicos con el objetivo de mejorar la transferencia de electrones entre el analito y el sustrato, ya que posee una elevada relación superficie/volumen [95].

2.2.2.4.1. *Nanohilos de plata (AgNWs)*

Los AgNWs se definen como estructuras de plata unidimensionales cuya relación longitud-diámetro es mayor a 10:1 [96]. Debido a su configuración específica exhiben propiedades eléctricas, térmicas, ópticas y magnéticas únicas [97].

En los últimos años, se han utilizado varios métodos para sintetizar AgNWs, como el método del poliol [98], la síntesis química húmeda [99], el método hidrotérmico [100] o la técnica de fotorreducción por radiación ultravioleta [101]. Entre ellos, el método del poliol es considerado el más simple, efectivo, económico y de elevado rendimiento. Es un método de reducción química, que se realiza con un disolvente de poliol en presencia de un tensoactivo de recubrimiento polimérico, utilizando una sal metálica como precursor. Al ser calentada la mezcla, se obtienen coloides de nanoestructuras metálicas [98]. Si se controla el tiempo de reacción, la relación molar entre el agente protector (cloruro de cobre II, CuCl_2) y el precursor metálico (nitrato de plata, AgNO_3), la temperatura y la velocidad de adición del precursor metálico y el tensoactivo (polivinilpirrolidona, PVP), se puede lograr un crecimiento controlado de los AgNWs [102].

En detalle, la reacción tiene lugar al incrementar de manera controlada la temperatura, de modo que se produce la reducción de una sal metálica (CuCl_2), por el poliol (etilenglicol, EG). Adicionando a continuación la sal de plata (AgNO_3) y el tensoactivo PVP, controlando la velocidad de inyección y manteniendo las condiciones de temperatura, comienzan a nuclearse y crecer los nanohilos de forma controlada. El PVP promueve el crecimiento anisótropo, debido a que se une de manera selectiva al cristal. Además, se emplea como agente de cobertura para prevenir que los nanohilos de plata se agreguen [96]. La síntesis de AgNWs tiene lugar a $160\text{ }^\circ\text{C}$, manteniéndose constante durante todo el proceso para favorecer así la oxidación de EG a glicolaldehído (GA) [103]. Este agente reductor es dominante en la formación de nanopartículas de plata y otras formas de baja relación longitud-diámetro como productos secundarios de la reacción. Debido a que estos subproductos actúan como defectos estructurales e interrumpen el empaquetamiento de los AgNWs, se eliminan al finalizar el proceso mediante centrifugación [104, 105].

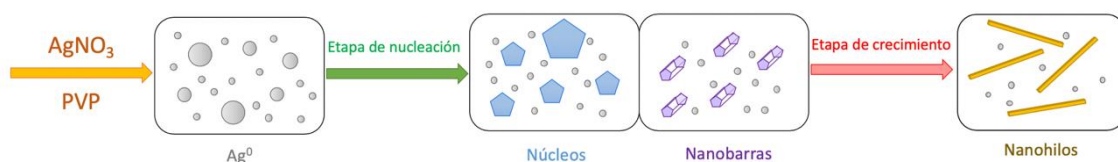


Figura 13. Representación esquemática de las etapas de crecimiento de los nanohilos de plata (AgNWs).

Hay cuatro pasos en el crecimiento de los cristales de AgNWs, que se muestran en la **figura 13**: reducción de Ag^+ a Ag^0 en EG, formación de semillas pentacíclicas,

absorción y pasivación superficial del PVP (etapa de nucleación) y, por último, crecimiento de los AgNWs en la dirección longitudinal, lo que facilita la nucleación en un tiempo más corto. Los iones cloruro se agregan a la reacción para que la tasa de nucleación se mantenga homogénea en todo el proceso. Debido al fuerte enlace con el PVP se producen AgNWs con una sección en forma pentagonal [106].

Los principales factores que afectan a la morfología y tamaño de los AgNWs en el proceso de síntesis se describen a continuación:

- **Temperatura y tiempo de reacción.** La reducción del CuCl_2 aumenta con la temperatura, y esto se debe a la oxidación del EG a GA. Normalmente, la síntesis se realiza a $160\text{ }^\circ\text{C}$ y el tiempo de reacción es de 1 hora. Cuando el proceso se realiza a menor temperatura, la longitud de los AgNWs no llega a alcanzar el valor máximo de crecimiento, porque no se proporciona la energía necesaria para ello y, además, la reacción transcurre más lentamente [96].
- **Concentración de PVP.** La efectividad de este polímero se relaciona con la presencia de átomos de oxígeno y nitrógeno en su composición, que permiten que se absorba en la superficie de la plata. El grado de polimerización del PVP también tiene una influencia significativa en la morfología de los AgNWs. Cuando las cadenas de PVP son más largas, producen AgNWs con una relación longitud-diámetro mayor [96].
- **Concentración de AgNO_3 .** El AgNO_3 actúa como precursor metálico en la formación de AgNWs y su concentración es vital en el rendimiento y morfología de estos. Cuando la concentración de precursor es demasiado alta, se obtienen AgNWs más cortos y el número de nanopartículas aumenta [104], lo que resulta indeseable.
- **Presencia de iones cloruro.** Los iones cloruro se coordinan con los núcleos de plata, haciendo que no se agreguen entre sí, que es el principal mecanismo para la formación de nanopartículas. La adición de iones cloruro facilita el crecimiento de los nanohilos de plata, ya que se unen con los cationes de plata libres, formando cloruro de plata, AgCl . Durante el crecimiento de los nanohilos, los iones plata se libera gradualmente, favoreciendo la formación de nuevos núcleos [96].

Debido a la baja o nula toxicidad y biocompatibilidad de los AgNWs, se han empleado enzimas conjugadas con AgNWs para su aplicación en biosensores. Las enzimas electroquímicamente activas son muy específicas y selectivas por su estructura catalítica tridimensional. La transferencia de electrones entre ellas y el electrodo, normalmente se produce a través de sus centros activos, que se encuentran aislados

por una estructura proteica circundante. Para que los electrones puedan traspasar esta barrera con mayor facilidad se han introducido mediadores electrónicos con capacidad redox, como las nanoestructuras, más concretamente los AgNWs. Es por ello, que el empleo de enzimas conjugadas con AgNWs en el desarrollo de biosensores aporta una mayor especificidad, sensibilidad y actividad biológica [107].

2.2.2.4.1.1. Técnicas de caracterización de AgNWs

Las características dimensionales y estructurales de los AgNWs son importantes en la determinación de sus propiedades y se pueden estudiar mediante diferentes técnicas. Estas técnicas incluyen la microscopía electrónica de barrido o Scanning Electron Microscopy (SEM), microscopía electrónica de transmisión o Transmission Electron Microscopy (TEM) y microscopía de fuerza atómica o Atomic Force Microscopy (AFM). Por otro lado, el análisis estructural se realiza mediante la difracción de rayos X (DRX) y técnicas espectroscópicas ópticas, como la espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) y la espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) [108, 109, 110].

A continuación, se explica resumidamente el fundamento de las técnicas empleadas en el presente TFG.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La **microscopía electrónica de barrido** (Scanning Electron Microscopy, SEM) es uno de los instrumentos más versátiles disponibles para analizar la morfología [111] de materiales orgánicos e inorgánicos a escala micrométrica. Una característica destacable de esta técnica es que es capaz de obtener imágenes de la superficie de una gran variedad de materiales [112].

En el SEM, el área a examinar se irradia con un haz de electrones de alta energía con un diámetro aproximado de 50 μm o menos [113] que produce difracción en la superficie de la muestra, que permite reconstruir la imagen de la superficie [112]. Las señales obtenidas de la muestra aportan información sobre la morfología externa de los materiales.

Las imágenes SEM proporcionan información sobre la longitud, diámetro, morfología, densidad, distribución espacial y estructural de los AgNWs.

Difracción de Rayos X

La **difracción de rayos X (DRX)** es una técnica que aporta información detallada sobre la estructura cristalográfica y la composición química de los materiales. Además, se emplea para el cálculo del tipo de sistema cristalino, los parámetros de red o el tamaño de cristal [114]. Se basa en la difracción de los rayos X que se produce al atravesar una estructura cristalina.

La ley de Bragg establece la relación entre los ángulos a los que difracta cada familia de planos y la estructura cristalina, según la expresión [114]:

$$n\lambda = 2d \cdot \text{sen } \vartheta$$

Ecuación 3. Ley de Bragg.

Siendo θ el ángulo de dispersión, d la distancia interplanar, n el orden de pico de difracción y λ la longitud de onda de la radiografía [114].

A la hora de identificar una sustancia desconocida, el patrón de difracción se registra con la ayuda de un difractómetro y se prepara una lista de valores de la distancia interplanar y las intensidades relativas de las líneas de difracción. Esos datos se comparan con la base de datos del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD). La aparición de las líneas características más intensas del patrón de la base de datos es una evidencia de la existencia de una fase cristalina de la sustancia analizada [115].

2.2.3. Técnicas espectroscópicas de caracterización de sensores y biosensores electroquímicos

Las técnicas espectroscópicas son fundamentales para analizar los materiales sensibles depositados sobre los electrodos [116]. Las técnicas empleadas en este trabajo y las más habituales para realizarlo son la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y la espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-Vis).

2.2.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica analítica que se utiliza para identificar grupos funcionales orgánicos y en algunos casos inorgánicos. Mide la absorción de radiación infrarroja por ciertos grupos

funcionales a determinadas frecuencias. Estas bandas de absorción infrarroja son capaces de identificar componentes y estructuras moleculares concretos. La especificidad de las bandas permite realizar búsquedas de datos en bibliotecas de referencia para identificar un material, constituyendo una de las herramientas más poderosa para identificar enlaces químicos [117].

La radiación infrarroja comprende un rango de longitudes de onda entre 750 nm y 1000 μm , y se clasifica en infrarrojo cercano (de 750 nm hasta 2500 nm), infrarrojo medio (de 2500 nm hasta 10000 nm) e infrarrojo lejano (de 10000 nm hasta 10^6 nm) [118].

Los espectros infrarrojos estudian las interacciones entre la materia y los campos electromagnéticos en la región infrarroja. En esta, las ondas electromagnéticas se acoplan con las vibraciones moleculares y las moléculas, al absorber la radiación infrarroja, se excitan a niveles vibracionales más altos [119]. Las vibraciones moleculares están asociadas a los enlaces químicos y los grupos funcionales presentes en las moléculas [120].

Los portamuestras utilizados en el análisis FTIR deben ser transparentes al paso de la radiación infrarroja y no provocar pérdidas por reflexión o dispersión. Además, deben ser inertes y resistentes a la muestra. Normalmente se utilizan fluoruro de calcio (CaF_2), fluoruro de bario (BaF_2), seleniuro de zinc (ZnSe) y sulfuro de zinc (ZnS).

2.2.3.2. Espectroscopía de Absorción Ultravioleta Visible (UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis estudia la absorción de un haz de luz UV-Vis al atravesar la superficie de una muestra o reflejarse sobre ella. Las mediciones de absorción se pueden recoger en una única longitud de onda o en un intervalo espectral. Esta técnica se ocupa de estudiar las transiciones electrónicas entre orbitales o bandas atómicas e iones o moléculas en estado sólido, líquido o gaseoso [121].

El espectro ultravioleta está asociado con la excitación de los electrones, tanto en átomos como en moléculas, desde niveles de energía más bajos hasta los más altos. Cada longitud de onda tiene una energía asociada, si esta es la adecuada para provocar la excitación de los electrones y, por tanto, su 'salto' al siguiente nivel energético, esta longitud de onda es absorbida. Un electrón es excitado desde un orbital lleno, que se encuentra en su estado fundamental, hacia un orbital anti enlazante vacío, aumentando su energía. Cuanto mayor es el espacio entre los niveles energéticos, mayor es la energía necesaria para la transición del electrón, produciendo una luz de mayor frecuencia y, por consiguiente, una longitud de onda más corta [122].

La región ultravioleta varía entre 190 y 400 nm, mientras que la región visible se extiende desde 400 hasta 800 nm [122].

Se mide la intensidad de la luz que pasa a través de la celda de referencia (I_0) y para cada longitud de onda se mide la intensidad de la luz que pasa a través de ella (I). El detector convierte la luz en corriente y el registrador de gráficos genera la gráfica absorbancia frente a longitud de onda (nm) de la muestra [122].

La absorbancia (A) de la muestra sigue la siguiente expresión:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Ecuación 4. Fórmula de la absorbancia en función de la intensidad.

La absorbancia es proporcional a la concentración de la sustancia en solución, siguiendo la ley de Lambert-Beer, por lo que la espectroscopía UV visible puede emplearse para medir la concentración de dicha muestra. La ley de Lambert-Beer puede expresarse como [123]:

$$A = \epsilon cl$$

Ecuación 5. Ley de Lambert-Beer.

Siendo, A la absorbancia de la muestra, l el paso óptico, es decir, la dimensión de la cubeta en cm, c la concentración de la solución en mol/dm³ y ϵ la extinción molar, que se mantiene constante para una sustancia particular en una determinada longitud de onda, en dm³/mol · cm [123].

2.2.4. Técnicas electroquímicas de medida para sensores y biosensores electroquímicos

Las técnicas electroquímicas emplean una medida de potencial, carga o corriente para determinar la concentración de un analito o para caracterizar la reactividad química del mismo.

La electroquímica estudia la relación entre la energía eléctrica y la energía química.

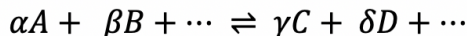
La relación matemática entre el potencial del electrodo (conductor eléctrico) y las concentraciones de las formas oxidadas y reducidas de un analito (conductor iónico) en solución, viene determinada por la ecuación de Nernst, que se muestra a continuación:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln K_{eq}$$

Ecuación 6. Ecuación de Nernst.

Siendo, E el potencial del electrodo, E^0 el potencial en condiciones estándar, R la constante de los gases ideales, T la temperatura en Kelvin, n el número de moles que participan en la reacción, F la constante de Faraday ($F= 96485,34$ C/mol), K_{eq} la constante de equilibrio termodinámica.

Esta última para una reacción química genérica:



Ecuación 7. Reacción química general.

Se calcula como:

$$K_{eq} = \frac{[C]^\gamma \cdot [D]^\delta \dots}{[A]^\alpha \cdot [B]^\beta \dots}$$

Ecuación 8. Fórmula de la constante de equilibrio termodinámica para una reacción química general.

Siendo [A], [B], [C], [D], ... la concentración molar de reactivos y productos que intervienen en la reacción, elevada al coeficiente de actividad de cada uno de ellos.

Los métodos de análisis electroquímico poseen ventajas frente a otros procedimientos como, por ejemplo, el hecho de que las medidas electroquímicas, que son específicas de un estado de oxidación en particular para cada elemento, haciendo posible la determinación de la concentración de cada una de las especies intervinientes en la reacción; también son más económicos que otros métodos [124].

Las reacciones químicas producidas por la oxidación y la reducción del analito debidas a la acción de un potencial o a una corriente que varía linealmente con el tiempo, se denominan reacciones de oxidación-reducción o redox y se producen en celdas electroquímicas, entre dos electrodos, conocidos como electrodo de trabajo y electrodo auxiliar o contraelectrodo, o entre tres electrodos, en cuyo caso incluye adicionalmente un electrodo de referencia.

Una celda electroquímica consta de dos o tres conductores eléctricos llamados electrodos, sumergidos en una disolución electrolítica. Para que circule corriente por ella, es necesario que los electrodos estén conectados por un conductor metálico al potencióstato [124].

Al electrodo de trabajo se le aplica un potencial o una intensidad de corriente variable para que, en su superficie, se produzca la oxidación o reducción del analito de interés [125]; el contraelectrodo cierra el circuito, ya que por él circula la corriente necesaria para equilibrar la intensidad que va al electrodo de trabajo; y el electrodo de referencia mide el potencial del electrodo de trabajo, manteniendo su potencial constante. El electrodo de referencia mantiene un potencial constante, gracias a que en su superficie ocurre una semirreacción reversible que sigue la ley de Nernst, cuyo potencial debe ser constante en el tiempo y fácil de montar y mantener [125].

Los electrodos normales de hidrógeno (SHE) han sido los más utilizados en electroquímica, no solo como electrodos de referencia, sino como indicadores del pH. Su composición puede representarse como indica la **figura 14** [124]:

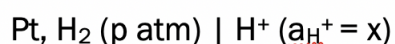


Figura 14. Representación esquemática del electrodo de gas hidrógeno (SHE).

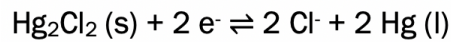
En este tipo de electrodos, el potencial en la superficie de platino depende de la actividad de ion hidrógeno en la disolución y de la presión parcial del hidrógeno empleado para saturar la disolución. Sin embargo, en la práctica, es difícil de preparar y no suele utilizarse [124].

Los sustitutos del electrodo de gas hidrógeno son el electrodo de calomelanos saturado (ECS) o el electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl).

El electrodo de calomelanos saturado (ECS) consiste en un dispositivo lleno de mercurio en contacto con una disolución saturada de cloruro de mercurio (I) o calomelanos, y cloruro de potasio. El contacto eléctrico se realiza con un alambre de platino sumergido en el mercurio para el conductor y un puente salino para completar

el circuito. El potencial es de + 0,24 V respecto del electrodo estándar de hidrógeno [124].

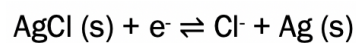
La reacción del electrodo es [124]:



Ecuación 9. Reacción de oxidación-reducción del electrodo de calomelanos saturado (ECS).

El electrodo de plata/cloruro de plata es más sencillo de construir y más fácil de utilizar, además del más empleado. En él, un alambre de plata se sumerge en una disolución diluida de cloruro de potasio, formándose una capa de cloruro de plata en su entorno. El potencial de este electrodo es + 0,2 V respecto del electrodo estándar de hidrógeno [124].

La semirreacción que tiene lugar en el electrodo es [124]:



Ecuación 10. Reacción de oxidación-reducción del electrodo de plata/cloruro de plata.

El esquema de una celda electroquímica se muestra en la **figura 15**:

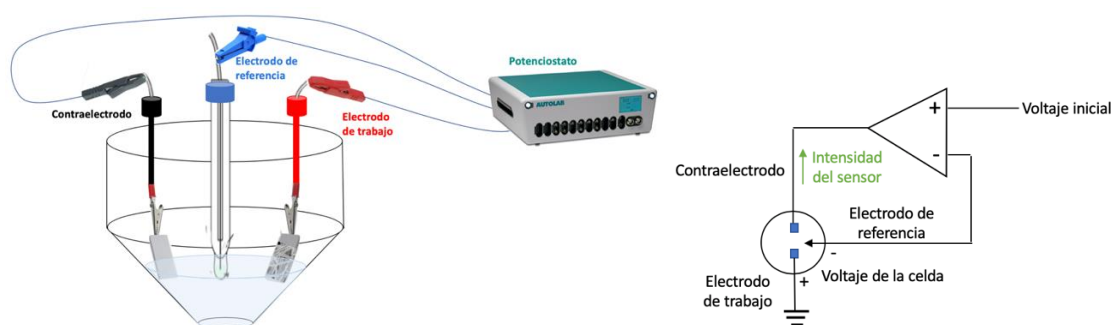


Figura 15. A la izquierda, celda electroquímica de tres electrodos. A la derecha, esquema básico del funcionamiento de un potenciostato.

Los métodos utilizados en el análisis electroquímico se pueden diferenciar según la variable medida:



- Métodos potenciométricos: medida del potencial de la celda electroquímica [126].
- Métodos conductimétricos: medida de la conductancia de un electrolito, siendo el inverso de la resistencia [126].
- Métodos coulombimétricos: método cuantitativo que determina la cantidad de electricidad (en coulombios) necesaria para modificar el estado de oxidación del analito [126].
- Métodos electrogravimétricos: método cuantitativo que determina la masa depositada sobre el electrodo de trabajo [126].
- Métodos voltamperométricos: medida de la intensidad en función del potencial aplicado para favorecer la polarización del electrodo de trabajo [126].

Las técnicas empleadas en el presente trabajo se describen a continuación.

2.2.4.1. *Técnicas Voltamperométricas*

La voltamperometría mide la intensidad de corriente generada en una celda electroquímica en función de la diferencia de potencial que se aplique para obtener información de un determinado analito, de tal forma que se favorezca la polarización del electrodo indicador o de trabajo [127].

Según sea la relación entre la señal de excitación (potencial variable) y el tiempo, se pueden distinguir:

- Voltamperometría de barrido lineal, en la que el potencial varía de forma lineal entre el electrodo de trabajo y el de referencia [124].
- Voltamperometría de onda cuadrada, en la que se realiza un barrido de potencial de onda cuadrada simétrica en un rango de valores previamente establecidos, que varía de manera escalonada entre los electrodos de trabajo y de referencia [128, 129].
- Voltamperometría diferencial de pulsos, en la que se produce una discriminación mejorada de las corrientes faradaicas (transferencia de electrones hacia y desde un electrodo), y consiste en pulsos pequeños

superpuestos sobre un potencial que varía escalonadamente, manteniéndose constante la amplitud [124, 130].

- Voltamperometría cíclica, que se expone a continuación [124].

La principal ventaja de estas técnicas es su buena precisión y sensibilidad [125].

2.2.4.1.1. Voltamperometría Cíclica

La voltamperometría cíclica o voltametría cíclica es la técnica electroquímica más utilizada para obtener información cualitativa sobre las propiedades y características de los procesos electroquímicos [128]. Mide la respuesta de una disolución activa redox a un barrido de potencial de ciclo lineal entre dos o más valores establecidos y se utiliza para investigar los procesos de oxidación-reducción de especies moleculares y estudiar la cinética de las reacciones químicas heterogéneas de transferencia de electrones [131].

Esta técnica se basa en la aplicación de un barrido de potencial al electrodo de trabajo más rápido que en las otras técnicas anteriormente nombradas. Este barrido se realiza en el sentido directo y en el sentido inverso, a lo que se denomina barrido triangular (**figura 16**). Los voltamogramas (**figura 17**) que se obtienen dan información de las propiedades electroquímicas individuales de los sistemas redox y aportan información cualitativa de los procesos de transferencia de electrones [124, 132].

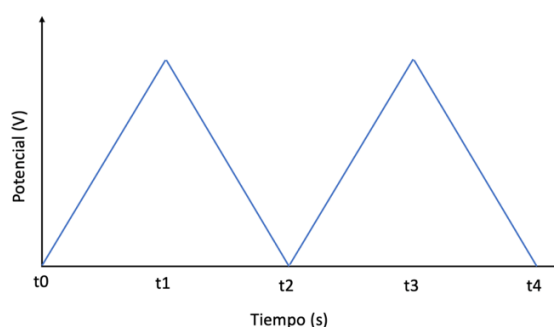


Figura 16. Barrido triangular: potencial frente a tiempo.

El potencial del electrodo de trabajo se mide frente al potencial del electrodo de referencia, que permanece constante. El potencial aplicado resultante produce una señal de excitación como la que se muestra en la **figura 16**. El barrido directo se

produce en el intervalo t_0 a t_1 . En él, el potencial realiza escaneos negativamente, comenzando a un potencial mayor y terminando en un potencial menor. Este último, es el punto en el que el voltaje es suficiente como para haber causado la reducción del analito. El barrido inverso ocurre de t_1 a t_2 , intervalo en el que el potencial realiza escaneos positivamente. Aquí, ocurre la oxidación del analito. Este ciclo se puede repetir sucesivas veces y la pendiente de la señal de excitación se corresponde con la velocidad de barrido.

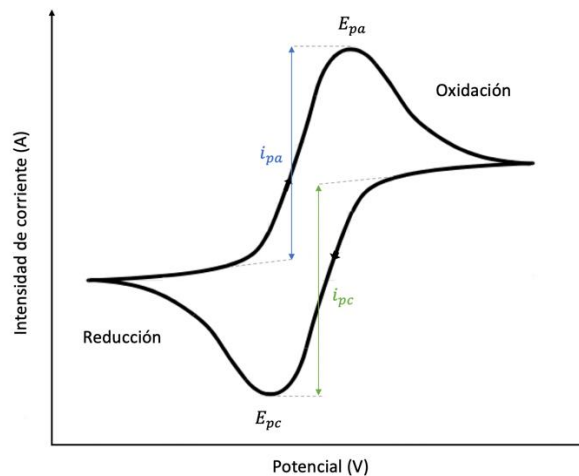


Figura 17. Voltamograma cíclico: intensidad de corriente frente a potencial de la especie en estudio.

Los parámetros que se deben tener en cuenta en este tipo de representación (**figura 17**) son los potenciales de pico anódico, E_{pa} y pico catódico, E_{pc} y las corrientes de pico anódico, i_{pa} y pico catódico, i_{pc} , que se miden por prolongación de la línea base desde el inicio de la electrolisis [132].

El barrido comienza a potencial cero habitualmente y se dirige a potenciales positivos, oxidando el compuesto de interés y provocando la aparición del pico anódico. Posteriormente, se invierte el barrido, reduciéndose el compuesto y apareciendo, consecuentemente, el pico catódico [132].

En una reacción reversible, las corrientes de pico catódico y anódico, tienen el mismo valor (pero en sentido inverso) y las concentraciones de las especies en el electrodo siguen la ley de Nernst. La diferencia de potencial entre ambos picos es inversamente proporcional al número de electrones transferidos y se corresponde con la siguiente expresión [132]:

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n}$$

Ecuación 11. Ecuación de Nernst para un sistema reversible en condiciones normales de temperatura.

Con la ecuación de Randles-Sevcik se puede obtener información cuantitativa de la concentración y el grado de difusión del analito en estudio:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{D \cdot v}$$

Ecuación 12. Ecuación de Randles-Sevcik para un sistema reversible.

Siendo i_p la intensidad de corriente de pico, n el número de electrones transferidos en el proceso redox, A el área superficial del electrodo, C la concentración del analito, D el coeficiente de difusión, y v la velocidad de barrido [133].

Las **ecuaciones 12 y 13** se cumplen para pares electroquímicamente reversibles a una temperatura de 25 °C [132].

El potencial de las especies electrolizadas es la media de los potenciales en los picos [132]:

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

Ecuación 13. Potencial de las especies en un sistema reversible.

En una reacción irreversible, la ecuación de Radles-Sevcik a 25 °C corregida es la siguiente [133]:

$$i_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot n \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{\alpha \cdot D \cdot v}$$

Ecuación 14. Ecuación de Randles-Sevcik para un sistema irreversible.

Siendo α el coeficiente de transferencia [133].

En los sistemas irreversibles, la intensidad de pico depende de la velocidad de barrido, y, consecuentemente, del potencial en función del tiempo [133]:

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

Ecuación 15. Potencial de pico para un sistema irreversible.

Siendo F la constante de Faraday, R la constante de los gases ideales y k la constante heterogénea de velocidad de transferencia de electrones [133].

El uso principal de la voltamperometría cíclica es la obtención de información sobre las velocidades y los mecanismos de reacción que tienen lugar en los procesos de oxidación-reducción [124].

Cinética de las reacciones

En voltametría cíclica tiene una gran influencia la velocidad de barrido de cada medida sobre la intensidad. Existen dos procesos que intervienen en el transporte del analito desde la disolución hasta la superficie del electrodo, que son la difusión del analito hasta la superficie del electrodo y la transferencia de electrones del analito al electrodo. La etapa más lenta, será la etapa que controle la cinética del proceso. Según esto podemos tener [134]:

- Procesos controlados por difusión, que se rigen por la ecuación de Randles-Sevcik (**ecuación 12**) [134].
- Procesos controlados por la transferencia de electrones, que se rigen por la ecuación que se muestra a continuación [135].

$$i_p = 9,39 \cdot 10^5 \cdot n^2 \cdot v \cdot A \cdot \Gamma$$

Ecuación 16. Relación correspondiente a la capa electroactiva de adsorbato para un sistema reversible.

Siendo Γ la superficie del electrodo recubierta por el receptor biológico [135].

La cobertura superficial de la sustancia absorbida se puede estimar con la pendiente de la recta que representa la intensidad del pico frente a la velocidad de barrido, de acuerdo con la **ecuación 17** [136, 137, 138]. Este parámetro representa el número de sitios activos (mol/cm^2) que posee el receptor biológico en su superficie y actúan promoviendo la reacción química.

$$i_p = \frac{n^2 \cdot F^2 \cdot A \cdot \Gamma \cdot v}{4 \cdot R \cdot T}$$

Ecuación 17. Determinación de la superficie del electrodo recubierta por el receptor biológico.

Para conocer el mecanismo que controla las reacciones electroquímicas que tienen lugar, se puede hacer un estudio de la variación de la intensidad de corriente frente a la velocidad de barrido. De este modo, se obtienen representaciones de la variación de intensidad de los picos en función de la velocidad de barrido o de su raíz cuadrada y, de acuerdo con la linealidad de cada una de ellas, se puede conocer el proceso electroquímico implicado. Si la intensidad registrada para un mismo sensor varía de forma lineal a medida que aumenta la velocidad de barrido, el proceso está controlado por la transferencia de electrones de la disolución al electrodo de trabajo; mientras que, si lo hace con la raíz cuadrada de la velocidad, será la difusión de iones quien controle el proceso [139].

2.2.4.1.2. Voltametría diferencial de pulsos

La voltametría diferencial de pulsos es una técnica voltamétrica dinámica que discrimina las corrientes faradaicas, es decir, la transferencia de electrones desde y hacia el electrodo [140], minimizando la interferencia de la corriente de carga, que se disipa más rápidamente que la corriente faradaica asociada a la reacción redox [141].

Esta técnica consiste en aplicar una perturbación de potencial, mediante pequeños pulsos de amplitud constante, que son superpuestos en forma de escalón y que ayudan a mantener la actividad del electrodo a largo plazo [140] mientras se aumenta el potencial con el tiempo. Esto quiere decir que con cada pulso se incrementa el potencial, aunque el tamaño del pulso sea el mismo [141], como se puede observar en la **figura 18**:

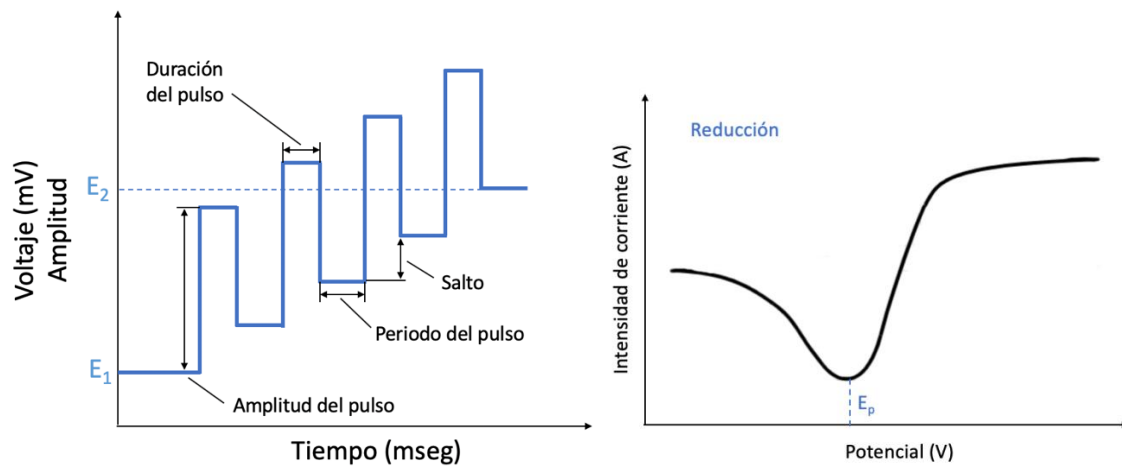


Figura 18. A la izquierda, señal de excitación de la voltametría de pulso diferencial. A la derecha, el voltamograma resultante.

Generalmente es aplicada en sistemas irreversibles y en sistemas que presentan una cinética de reacción lenta [142].

Comparada con otras técnicas voltamétricas, la voltametría de pulso diferencial proporciona una mejor selectividad para los procesos redox [140] y además posee baja corriente capacitiva, que puede mejorar la sensibilidad de los procedimientos voltamétricos para bajas concentraciones de analito [142].

El límite de detección es la concentración mínima de analito en la muestra analizada que se puede detectar con fiabilidad o que sería capaz de discriminarse de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, mediante un método analítico determinado [143, 144].

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

Ecuación 18. Límite de detección.

donde σ es la desviación estándar de la medida del blanco.

2.2.5. Especies electroactivas estudiadas

2.2.5.1. Azúcares

Los carbohidratos o azúcares son compuestos químicos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno y son denominados nutrientes energéticos, ya que son considerados la principal fuente de energía de los seres vivos. Su fórmula general es $C_n(H_2O)_m$ [145].

En función de su estructura química los azúcares se clasifican en:

- Monosacáridos: son los azúcares más simples, ya que no pueden hidrolizarse a compuestos más sencillos. A este grupo pertenecen la glucosa, la fructosa y la galactosa [145].
- Disacáridos: son azúcares que pueden hidrolizarse a dos monosacáridos. La sacarosa, por ejemplo, se puede hidrolizar a glucosa y fructosa [145].
- Oligosacáridos: se pueden hidrolizar a entre tres y diez moléculas de monosacáridos [145].
- Polisacáridos: son carbohidratos que pueden hidrolizarse a diez o más unidades de monosacáridos. El almidón o la celulosa forman parte de este grupo [145].

Los azúcares que contienen un grupo libre de aldehído, se conocen como azúcares reductores, ya que poseen la capacidad de actuar como reductores o aceptores de electrones en una disolución alcalina. Estos azúcares incluyen, por ejemplo, la glucosa, la fructosa, la galactosa o la ribosa [146].

Debido a los controles de calidad cada vez más exhaustivos, demandados tanto por los consumidores como por la industria alimentaria, se han desarrollado una gran cantidad de biosensores para la identificación y el análisis de carbohidratos utilizando, entre otros, métodos electroquímicos. La detección de estos compuestos se basa, principalmente, en la catálisis enzimática del análisis de hidratos de carbono. El azúcar se oxida en presencia de la enzima y, con la ayuda de un electrodo conductor, se mide la corriente resultante de la oxidación del peróxido de hidrógeno o la reducción del oxígeno consumido en la reacción enzimática [147]. El mecanismo de reducción de los carbohidratos se produce con la transformación del grupo carbonilo a un grupo alcohol, que conduce a la formación del correspondiente alditol o deoxialditol [148].

En este proyecto se ha empleado la galactosa como analito. A continuación, se describe más detalladamente este monosacárido.

2.2.5.1.1. Galactosa

La galactosa (**figura 19**) es un monosacárido con la misma fórmula molecular que la glucosa, $C_6H_{12}O_6$; su estructura es similar a esta, diferenciándose únicamente en la posición de uno de sus grupos OH. Su masa molecular es 180,156 g/mol [149].

La principal fuente de la galactosa es la lactosa, que es un disacárido constituido por una molécula de glucosa y otra de galactosa. La lactosa se encuentra exclusivamente en la leche, por lo que el ser humano incorpora estos azúcares en la ingesta de productos lácteos [149].

La detección de galactosa, a nivel clínico, es de vital importancia para el diagnóstico preliminar de galactosemia, que provoca niveles altos de galactosa en sangre, y de intolerancia a este azúcar [149]; pero también se utiliza este estudio para detectar galactosa en los productos lácteos a partir de la enzima Galactosa Oxidasa (GaOx), como ya se expuso en apartados anteriores. Esto se debe a que el control de calidad durante el proceso productivo y las pruebas de los parámetros cualitativos del contenido de azúcares en los alimentos es imprescindible, ya que deben cumplir una serie de requisitos antes de llevarse al mercado [150].

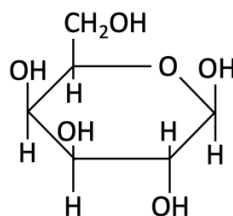


Figura 19. Estructura química de la D-Galactosa.

2.2.5.2. Fenoles

Los fenoles son compuestos orgánicos aromáticos que contienen, como mínimo, un grupo funcional hidroxilo, OH. Su débil acidez, debido a la deslocalización de la carga en el anillo de benceno, hace que se hayan agrupado junto con los ácidos carboxílicos y los taninos conformando los ácidos orgánicos [151].

Los fenoles y los taninos son metabolitos secundarios que forman parte de los tejidos de las plantas, particularmente se encuentra presente en la uva, y contribuyen a su defensa como fungicida y bactericida, además, de mejorar la calidad de los alimentos, el color, el sabor y la astringencia [152]. Los fenoles protegen los alimentos del deterioro oxidativo, por lo que se utilizan como antioxidantes, y en los

sistemas biológicos, donde se oxidan, ahorrando nutrientes [153]. La oxidación de estos compuestos da lugar a las quinonas.

Hay dos posibles clasificaciones de estos compuestos:

- Según el número de grupos OH presentes en el anillo aromático, los fenoles se clasifican en monofenoles, si contienen un solo grupo OH; difenoles, si contienen dos; y trifenoles, si contienen tres.
- Según la posición relativa del grupo OH en el anillo de benceno, se clasifican en ortofenol diol, si los grupos OH se encuentran en las posiciones 1 y 2; metafenol diol, si se encuentran en las posiciones 1 y 3; y parafenol diol, si se encuentran en las posiciones 1 y 4.

En la **figura 20** se puede observar esta última clasificación:

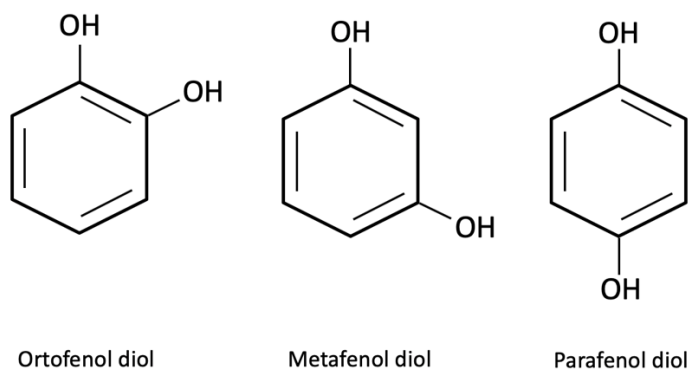


Figura 20. Posicionamiento de los grupos OH en los fenoles.

Los fenoles en estado puro son sólidos cristalinos de color blanquecino. Se forman por oxidación parcial del benceno y poseen olor dulce y alquitranado. Tienen un punto de fusión relativamente bajo, pero su punto de ebullición es alto, debido a que los grupos OH forma puentes de hidrógeno. Su solubilidad en agua es moderada y depende del número y la orientación de los grupos OH, aunque disminuye cuanto más sustituido se encuentre [151].

En el presente trabajo, se ha empleado el 1,2-dihidroxibenceno, también conocido como catecol o pirocatecol.

2.2.5.2.1. Catecol

El catecol, pirocatecol o 1,2-dihidroxibenceno (**figura 21**), según la IUPAC, es uno de los tres isómeros del bencenodiol, con los dos sustituyentes hidróxido en la posición orto. Su fórmula molecular es $C_6H_6O_2$. Se trata de un sólido blanco e inodoro soluble en agua [154].

Una exposición prolongada al aire y la luz, produce un cambio en su coloración a marrón. La masa molecular del catecol es 110,112 g/mol. Posee un punto de ebullición de 245,5 °C a 1 atm de presión, un punto de fusión de 105 °C y su punto de inflamabilidad es de 127 °C en espacios cerrados [154].

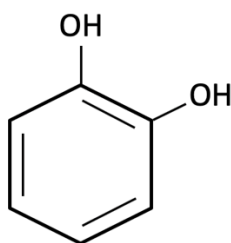


Figura 21. Estructura del catecol.

El catecol es uno de los compuestos fenólicos más importantes que se produce de manera natural en frutas y verduras. Su determinación se ha estudiado mediante métodos electroquímicos, utilizando biosensores enzimáticos [155].

La oxidación del catecol produce 1,2-benzoquinona, un compuesto muy inestable y reactivo de color rojizo. La reacción que tiene lugar se presenta en la **figura 22**:

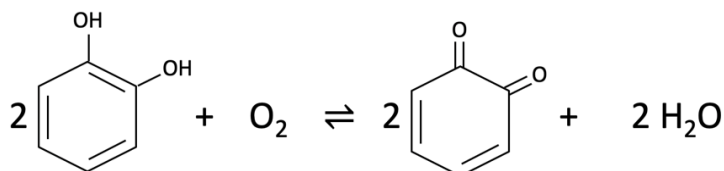


Figura 22. Reacción de oxidación del catecol para obtener 1,2-benzoquinona.

El vino es rico en catecol y otros compuestos fenólicos, que le aportan una actividad antioxidante y hace que conserve sus propiedades de manera natural. Además, el nivel de compuestos fenólicos presentes en los vinos varía según la materia prima



utilizada y el proceso de producción. La piel y las semillas de las uvas contienen la mayor parte de los fenoles presentes en la uva [156].



III. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS UTILIZADOS



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



3. Reactivos, material y equipos utilizados

3.1. Reactivos

Los reactivos empleados en este trabajo, se describen a continuación:

- Acetona, C_3H_6O (pureza mínima 99 %, QUALITY CHEMICALS, CAS Number: 67-64-1).
- Agua desionizada Milli-Q de conductividad 18,2 M Ω -cm.
- Catecol, $C_6H_6O_2$ (pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 120-80-9).
- Cobre II cloruro 2-hidrato, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Panreac, Código: 141264).
- D-(+)-Galactosa, $C_6H_{12}O_6$ (pureza mínima 99 %, Amresco, CAS Number: 59-23-4).
- Dihidrogenofosfato sódico, NaH_2PO_4 (pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-79-4).
- Etanol, C_2H_6O (pureza mínima 99,8 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 64-17-5).
- Etilenglicol, $C_2H_6O_2$ (anhidro al 99,8 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 107-21-1).
- Galactosa oxidasa, GaOx, (obtenida de *Dactylium dendroides*, actividad enzimática mínima 3000 ud/g sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9028-79-9).
- Glutaraldehído, $C_5H_8O_2$ (disolución acuosa al 50 %, Alta Aesar, CAS Number: 111-30-8).
- Hidrogenofosfato sódico, Na_2HPO_4 (pureza mínima 99 %, Sigma-Aldrich, CAS Number: 7558-80-7).
- Nafion[®] solución de resina perfluorada (contiene entre un 15 y un 20% de agua, Sigma-Aldrich, CAS Number: 31175-20-9).
- Nitrato de plata, $AgNO_3$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 7761-88-8).
- Polivinilpirrolidona, $(C_6H_9NO)_n$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 9003-39-8).

- Tirosinasa, TYR, (obtenida del hongo *Agaricus bisporus*, actividad enzimática mínima 1000 ud/mg sólido, Sigma-Aldrich, CAS Number: 9002-10-2).

3.2. Material

- Contraelectrodo placa de platino (2cm x 1 cm).
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl, 3M Nesslab).
- Sustrato ITO (Óxido de indio y estaño).
- Celda electroquímica (50 mL, Princeton Applied Research).

3.3. Equipos

- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japón).
- Espectrofotómetro infrarrojo modelo FT/IR 6600 (Jasco Corporation, Japón).
- Spincoater modelo 1H-D7 (MIKASA, Japón).
- Potenciostato/Galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research).
- Ultrasonidos Vortex 3 (IKA, USA).
- Centrífuga modelo Sorvall Centrifuge ST 8 (Thermo Scientific, USA).
- SEM y DRX del LTI (Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid).



IV. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

4. Metodología y desarrollo experimental

4.1. Acondicionamiento de los sensores y biosensores nanoestructurados

4.1.1. Preparación de disoluciones

Las disoluciones preparadas en este trabajo se han utilizado para la síntesis de AgNWs y para realizar las pruebas electroquímicas correspondientes a los sensores y biosensores desarrollados.

En la síntesis de AgNWs se utilizaron disoluciones de cloruro de cobre (II), nitrato de plata y polivinilpirrolidona en etilenglicol. Las enzimas se disolvieron en tampón fosfato y se enlazaron con glutaraldehído o Nafion®. En las medidas electroquímicas se empleó tampón fosfato como electrolito para determinar diferentes concentraciones de galactosa y catecol.

4.1.1.1. Cloruro de cobre (II), CuCl_2

Se preparó una disolución de cloruro de cobre (II) con una concentración $1,5 \cdot 10^{-4}$ M. Para obtenerla, se pesaron 0,1 mg de CuCl_2 , se añadieron a un matraz aforado de 5 mL y se enrasó con etilenglicol.

$$[\text{CuCl}_2] = \frac{0,1 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \cdot \frac{10^3 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{10^3 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{134,45 \text{ g}} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

4.1.1.2. Nitrato de plata, AgNO_3

Se obtuvo una concentración 0,12 M. Para ello, se pesaron 102 mg de AgNO_3 , se adicionaron a un matraz aforado de 5 mL y se añadió etilenglicol hasta el enrase.

$$[\text{AgNO}_3] = \frac{102 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \cdot \frac{10^3 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{10^3 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{169,87 \text{ g}} = 0,12 \text{ M}$$

4.1.1.3. Polivinilpirrolidona, PVP

La concentración a obtener de polivinilpirrolidona fue de $3,6 \cdot 10^{-4}$ M. Para ello, se pesaron 99 mg de PVP, se llevaron a un matraz aforado de 5 mL y se enrasó con etilenglicol, del mismo modo que con las disoluciones anteriores.

$$[\text{PVP}] = \frac{99 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \cdot \frac{10^3 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{10^3 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{5,5 \cdot 10^4 \text{ g}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

4.1.1.4. Tampón fosfato pH 7

La disolución de tampón fosfato pH 7 de concentración 0,01 M se realizó pesando 0,3659 g de NaH_2PO_4 y 0,2697 g de Na_2HPO_4 . Estas sales se disolvieron en un matraz aforado de 500 mL con agua desionizada Milli-Q.

Conocido el pKa de la disolución ($\text{pKa} = 6,8$), se puede hallar, mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch, el pH de la misma.

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

Ecuación 19. Ecuación de Henderson-Hasselbalch para la preparación de tampón fosfato.

4.1.1.5. Disolución de galactosa

Se preparó una disolución de galactosa de concentración 10^{-3} M a partir de 0,018 g y se llevaron a un matraz aforado de 100 mL con la disolución de tampón fosfato hasta su enrase. De esta disolución se preparó una disolución hija con una concentración 10^{-4} M.

4.1.1.6. Disolución de catecol

Para preparar la disolución de catecol de concentración 10^{-3} M, se pesaron 0,011 g de pirocatecol, se añadieron a un matraz aforado de 100 mL y se enrasó con tampón fosfato. De ella, se preparó una disolución hija de concentración 10^{-4} M.

4.1.1.7. Preparación de glutaraldehído

La concentración utilizada de glutaraldehído para inmovilizar las enzimas mediante cross-linking fue de 0,125 % w/w. Para ello, se diluyó en tampón fosfato 0,01 M glutaraldehído comercial, que se encuentra en disolución acuosa al 50 % w/w.

4.1.1.8. Preparación de Nafion®

Se empleó Nafion® comercial, del que se tomaron 25 μ L sin disolución previa y se depositaron mediante drop casting sobre el sensor.

4.1.2. Síntesis de nanohilos de plata (AgNWs)

En un matraz de fondo redondo de dos bocas con un agitador en su interior, se añadieron 5 mL de etilenglicol y se cerró con una columna de destilación. Se colocó en un baño de aceite a 160 °C y se sometió a agitación constante a 400 rpm, manteniendo la segunda boca tapada para evitar la evaporación del etilenglicol, como puede observarse en la **figura 23**. Transcurridos 5 minutos, por la boca secundaria se adicionaron 50 μ L de la disolución de cloruro de cobre (II) preparada anteriormente y se dejó reaccionar a temperatura y agitación constantes durante 5 minutos.



Figura 23. Destilación de los reactivos para obtener nanohilos de plata.

A continuación, se tomaron 2,5 mL de la disolución de nitrato de plata y 5 mL de la disolución de polivinilpirrolidona. En la **figura 24** se ilustra el método de adición de ambas disoluciones lentamente y gota a gota, con ayuda de dos jeringuillas al matraz de fondo redondo.



Figura 24. Adición de las disoluciones de nitrato de plata y polivinilpirrolidona gota a gota a la disolución de cloruro de cobre y etilenglicol.

Una vez finalizada la adición de las disoluciones de PVP y AgNO_3 , se dejó reaccionar durante 1 hora. En este proceso se pudo observar la transformación de color de la mezcla de reacción. En primer lugar, se formó una solución amarillenta, lo que indica

la presencia de iones Ag^+ . Pasados unos minutos, el color de la disolución fue cambiando de amarillo a gris, lo que se traduce en la formación de plata metálica (Ag^0). Cuando el tiempo de reacción fue aumentando, se formó una disolución de color gris intenso, lo que indica la alta densidad de concentración de AgNWs.

Pasado el tiempo de reacción, se desmontó la columna y se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, obteniéndose como producto de reacción la disolución representada en la **figura 25**.



Figura 25. Producto de reacción tras la destilación.

Por último, una vez enfriado el producto, se llevó a cabo su purificación mediante centrifugación, utilizando para ello la centrífuga, que se muestra en la **figura 26**.



Figura 26. Centrífuga utilizada para el lavado de AgNWs.

Para realizar los lavados, se adicionó etanol al producto y se centrifugó durante 20 minutos, como se observa en la **figura 27**. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se adicionó etanol para proceder con los lavados posteriores.

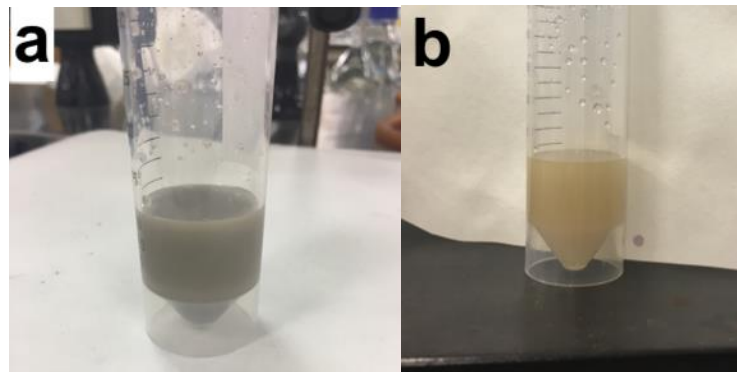


Figura 27. Lavados mediante centrifugación del producto de síntesis. a) Producto sin lavar. b) Producto tras el primer lavado con acetona.

Se siguió lavando el producto con etanol sucesivas veces hasta que el sobrenadante quedó transparente. Finalmente, el producto lavado en disolución de etanol se almacenó en eppendorfs de 1,5 mL de capacidad protegidos de la luz para su posterior utilización, como indica la **figura 28**.



Figura 28. Nanohilos de plata en etanol.

4.1.3. Preparación de enzimas

Se pesaron 5 mg de enzimas GaOx y TYR y se disolvieron en un volumen de 1 mL de tampón fosfato pH 7, obteniéndose una concentración de 5 mg/mL. Las disoluciones obtenidas se alicuotaron y se almacenaron a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización.

4.1.4. Preparación de los sensores

Para desarrollar los sensores y biosensores nanoestructurados se emplearon diferentes configuraciones con el objetivo de seleccionar las que mejor respuesta, ante la presencia de analito presentaran. Las configuraciones estudiadas se describen a continuación. Se denotó al Nafion[®] como NF y al glutaraldehído como GLU en todas ellas como forma abreviada.

- AgNWs/Enzima/GLU
- AgNWs/GLU/Enzima
- AgNWs/Enzima/NF
- AgNWs/NF/Enzima

Biosensores con la configuración AgNWs/Enzima/GLU

En primer lugar, se dejaron secar los AgNWs al aire y se llevaron a una disolución con etanol de concentración 2 mg/mL para su posterior dispersión en los dispositivos sensores.

Tras este proceso, se depositaron 50 μL de AgNWs sobre la cara conductora del sustrato ITO mediante la técnica spin coating, con una velocidad de giro de 2000 rpm durante 120 segundos, con el spincoater mostrado en la **figura 29**.



Figura 29. Spincoater utilizado para depositar los AgNWs.

Una vez transcurrido este tiempo, se depositaron 25 μL de enzima mediante drop casting sobre la película de nanohilos y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, se inmovilizó la enzima mediante una exposición de 20 minutos a vapores de glutaraldehído 0,125 % w/w. Por último, el biosensor se sumergió en la disolución de tampón fosfato durante 30 segundos para eliminar los restos de enzima que no quedaron adheridos al sustrato.

Biosensores con la configuración AgNWs/GLU/Enzima

Al igual que en la configuración anterior, se depositaron 50 μL de AgNWs sobre el sustrato ITO en las mismas condiciones de operación. A continuación, se sometió al sustrato a vapores de glutaraldehído durante 20 minutos. Después, se depositaron 25 μL de la enzima y se sumergió el biosensor en la disolución de tampón fosfato durante 30 segundos.

Biosensores con la configuración AgNWs/Enzima/NF

En esta configuración se siguieron los mismos pasos que en el primer apartado. Sin embargo, en vez de inmovilizar la enzima con glutaraldehído, se realizó la inmovilización añadiendo, sobre la capa de enzima, 25 μL de Nafion® comercial por la técnica drop casting y dejándolo secar a temperatura ambiente. Finalmente, el sensor se sumergió en tampón fosfato durante 30 segundos.

Biosensores con la configuración AgNWs/NF/Enzima

En primer lugar, se depositaron 50 μL de AgNWs sobre el sustrato ITO por spin-coating. Posteriormente, se depositó por drop casting una película de 25 μL de Nafion® comercial y, tras su secado, se inmovilizaron 25 μL de la enzima y se sumergió 30 segundos en tampón fosfato.

4.2. Caracterización de los sensores y biosensores nanoestructurados

La caracterización de los sensores se realizó mediante dos técnicas espectroscópicas complementarias: la espectroscopía UV-Vis y la espectroscopía FTIR.

4.2.1. Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis)



Figura 30. Espectrofotómetro UV-Vis utilizado para caracterizar los sensores.

La caracterización mediante esta técnica, se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en la preparación de los sensores, pero en esta ocasión, los materiales se depositaron sobre un sustrato de cuarzo, que es transparente en todo el rango UV-Vis (el ITO solo es transparente en el Vis). Se utilizó el software UV-Probe, con el espectrómetro mostrado en la **figura 30**.

Lo primero que se realizó fue una línea base en el intervalo de longitudes de onda de interés. A continuación, se registró el espectro de cada una de las películas que

componen al biosensor, en cada una de las configuraciones estudiadas. El rango de longitudes de onda utilizado comprendía entre 200 y 800 nm.

4.2.2. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Para la caracterización espectroscópica infrarroja, se empleó el mismo mecanismo para depositar los materiales anteriormente mencionado, pero sobre un sustrato de sulfuro de cinc (ZnS), utilizando el programa informático Spectragryph 1.1, en el espectrómetro mostrado en la **figura 31**.



Figura 31. Espectrofotómetro FT-IR utilizado para caracterizar los sensores.

En primer lugar, se realizó una línea base y, posteriormente, se fueron depositando paso a paso las películas que conformaron el biosensor, de cada configuración. El rango de números de onda estaba comprendido entre 4000 y 800 cm^{-1} . Se realizaron 1000 escaneos para los diferentes componentes del sensor y 300 escaneos para el blanco.

4.2.3. Estudio del comportamiento electroquímico

La respuesta electroquímica de los sensores se evaluó mediante las técnicas de voltametría cíclica y diferencial de pulsos. Los analitos utilizados fueron la galactosa y el catecol, que participaron en los procesos redox catalizados por la GaOx y la TYR, respectivamente. El equipo utilizado fue el potenciostato/galvanostato, que puede observarse en la **figura 32**.

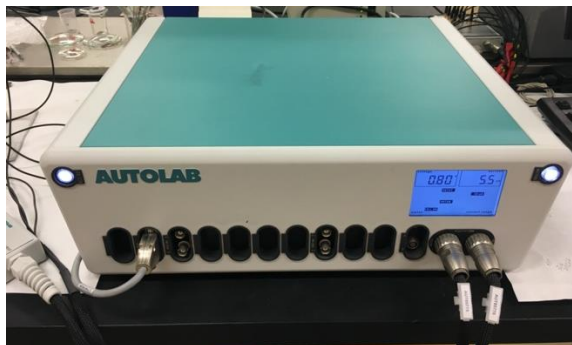


Figura 32. Potenciostato/Galvanostato utilizado para las medidas electroquímicas realizadas a los sensores.

4.2.3.1. Voltametría cíclica

La determinación de los analitos estudiados en el presente trabajo se realizó en una celda electroquímica de tres electrodos, electrodo de referencia Ag/AgCl, contraelectrodo de platino y electrodo de trabajo. Este último, constituyó el biosensor desarrollado.

El intervalo de potenciales seleccionado en este trabajo para todos los sensores elaborados, fue de - 600 a 1200 mV, comenzando en 0 mV; con una velocidad de barrido de 100 mV/s, un tiempo de acondicionamiento de 5 segundos y 5 ciclos para asegurar la estabilidad de las medidas.

Una vez definidos los parámetros de operación, se procedió al montaje de la celda. En primer lugar, se tomaron 40 mL de la disolución de interés (tampón fosfato, o disoluciones de catecol o galactosa en tampón fosfato), en la concentración deseada y se introdujeron en la celda. A continuación, se conectó la celda, se evaluó su correcto montaje, teniendo en cuenta que es de suma importancia sumergir siempre el mismo área del electrodo de trabajo y del contraelectrodo en todas las medidas para lograr reproducibilidad en los ensayos y se comenzaron las medidas, según muestra la **figura 33**. Una vez finalizada la voltametría, se seleccionó el último ciclo para su representación.



Figura 33. Montaje de la celda electroquímica.

4.2.3.2. Determinación de la cinética de los sensores. Ensayos a diferentes velocidades de barrido

En voltametría cíclica se trabajó con una velocidad de barrido constante de 100 mV/s y se estudió el comportamiento del sensor ante la presencia de analito. Los estudios cinéticos se realizaron modificando la velocidad de barrido, manteniendo los demás parámetros constantes, incluida la concentración de analito en disolución. Para ello, se operó del mismo modo que en la voltametría cíclica, pero esta vez, se sometió al electrodo de trabajo a diferentes velocidades de barrido de 1000, 500, 250, 100, 50, 25 y 10 mV/s.

Para determinar el mecanismo controlante de la reacción se realizó una regresión lineal de la intensidad de los picos frente a la velocidad de barrido y frente su raíz cuadrada. Si el mecanismo determinante es la transferencia electrónica, tiene un mayor ajuste la intensidad de pico frente a la velocidad de barrido. Sin embargo, si el coeficiente de ajuste es más cercano a la unidad en la representación de la intensidad frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, controla la difusión, como se señaló en el apartado **2. Fundamento teórico**.

Se pudieron calcular el número de sitios activos de las enzimas a partir de la pendiente de la recta intensidad de los picos frente a la velocidad de barrido y del número de electrones transferidos en la disolución patrón correspondiente con la ecuación 17.

4.2.4. Determinación de la sensibilidad y del límite de detección (LOD) mediante voltametría de pulso diferencial

Para determinar los límites de detección y la sensibilidad de los sensores desarrollados en este trabajo, se utilizó un método electroquímico llamado voltametría diferencial de pulsos.

Se seleccionaron los parámetros de operación, eligiendo un potencial desde - 600 hasta 1200 mV, comenzando en 1200 mV, con velocidad de barrido de 100 mV/s, un tiempo de acondicionamiento de 5 segundos.

Una vez escogidos los parámetros, se introdujeron 40 mL de tampón fosfato 0,01 M en la celda electroquímica y se procedió a medir el sensor en el blanco. A continuación, se adicionaron 50 μ L de disolución del analito de interés con concentración 10^{-3} M. Se esperó 5 minutos a que difundiese y se realizó otra medida, y así sucesivamente, hasta tener puntos suficientes para realizar la recta de regresión determinada por la intensidad de corriente respecto de la concentración de analito.

Los valores de intensidad y la forma del pico, dependen del compuesto, de la configuración de los sensores y de la enzima empleada en cada sensor.

Los resultados obtenidos, mediante todas las técnicas descritas anteriormente se mostrarán y discutirán a continuación.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



V. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

5. Resultados experimentales y discusión

5.1. Preparación y caracterización de nanohilos de plata (AgNWs)

El objetivo de este trabajo era utilizar AgNWs como mediadores electrónicos en biosensores de GaOx y TYR para mejorar la actividad enzimática, la transferencia de electrones entre la enzima y el sustrato, la sensibilidad de los sensores e intensificar la señal que dan lugar los sensores al someterlos a procesos redox. La selección de los AgNWs como mediador electrónico se debió a su alta relación superficie/volumen, alta conductividad, características que podrían utilizarse para mejorar el contacto entre el mediador y la enzima, aumentando así las superficies activas del sensor.

Los AgNWs son materiales extremadamente novedosos. Existen diferentes formas de prepararlos, y sus dimensiones y relación de aspecto depende enormemente de las condiciones de preparación, por lo que la primera tarea después de sintetizar los nanohilos fue caracterizar su estructura. Para ello, se emplearon diferentes técnicas, explicadas en puntos anteriores y de las que se analizan los resultados a continuación.

5.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La síntesis de AgNWs requiere muchos parámetros que deben estar bien controlados, entre ellos la temperatura, la velocidad de adición de los reactivos, la relación molar entre el PVP y la plata, etc. La alteración de alguno de estos parámetros puede producir un cambio drástico en el tamaño de los AgNWs, la formación de un mayor agregado de nanopartículas o variación en la concentración de producto final [96].

La microscopía electrónica de barrido proporciona una imagen a tamaño nanométrico de los AgNWs obtenidos, como se muestra en la **figura 34**.

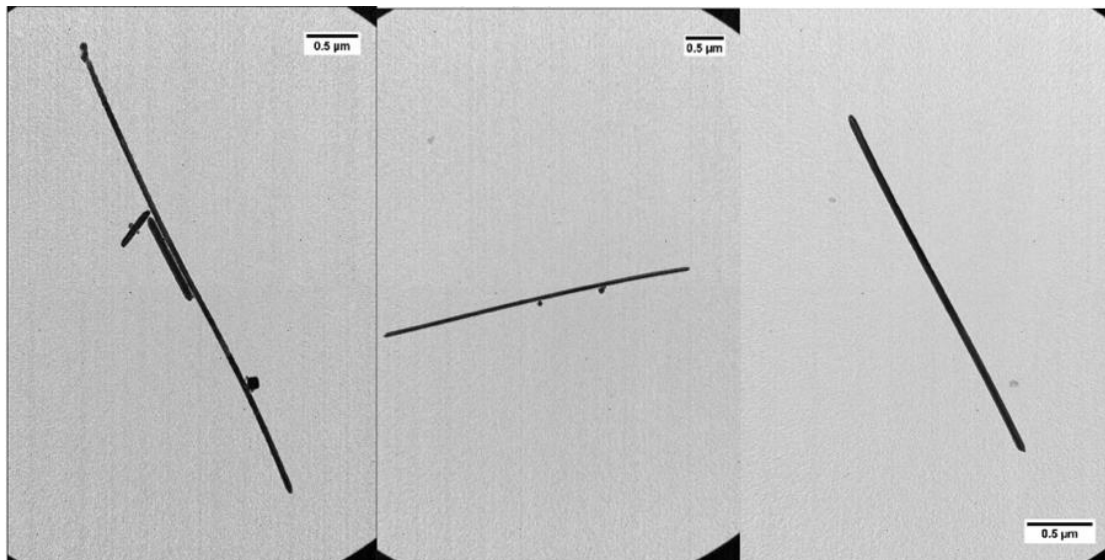


Figura 34. Imagen tomada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a una muestra de AgNWs.

La muestra analizada fue diluida para que se vieran con claridad los nanohilos aislados y así poder analizar su forma y tamaño. Las imágenes mostraron que el producto está compuesto mayormente por AgNWs con un diámetro medio de 40 nm y longitudes que oscilaron entre 6 y 20 μm, aproximadamente. También se observaron nanopartículas en una proporción inferior, como producto secundario, como se explicó en el apartado **2. Fundamento teórico**.

5.1.2. Difracción de rayos X (DRX)

El patrón de difracción de rayos X de los AgNWs se muestra en la **figura 35**. Como se puede observar, hay cinco picos de difracción, que se corresponden con los planos [111], [200], [220], [311] y [222], respectivamente.

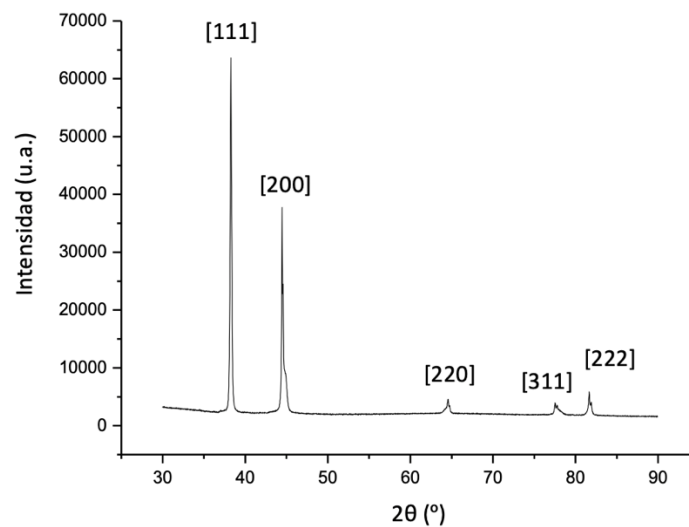


Figura 35. Patrón de difracción de rayos X de AgNWs.

Un nanohilo individual es un cristal único, que consta de dominios orientados simétricamente en el plano **[111]**, para un pico de difracción de $2\theta = 38,2^\circ$ y es el que mayor intensidad muestra, lo que indica una fuerte orientación cristalográfica a lo largo de esta dirección, es decir, los nanohilos de plata se orientan con su parte longitudinal en esta dirección [157, 158]. El pico de difracción $2\theta = 44,4^\circ$ corresponde al plano de plata **[200]** [158]. En cuanto al pico en el plano **[220]** se corresponde con $2\theta = 64,5^\circ$ [159]. Por último, los picos correspondientes a los planos **[311]** y **[222]**, se encuentran en $2\theta = 76,9^\circ$ [160] y $2\theta = 81,5^\circ$ [161], respectivamente.

Los picos de difracción en **[111]**, **[200]**, **[220]**, **[311]** y **[222]** para los AgNWs, corresponden a la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) [161]. No se observan picos adicionales, lo que implica una alta pureza de los AgNWs obtenidos [106].

5.1.3. Espectroscopía de absorción ultravioleta visible

Las propiedades ópticas de los nanohilos de plata se evaluaron utilizando la espectroscopía UV-Vis.

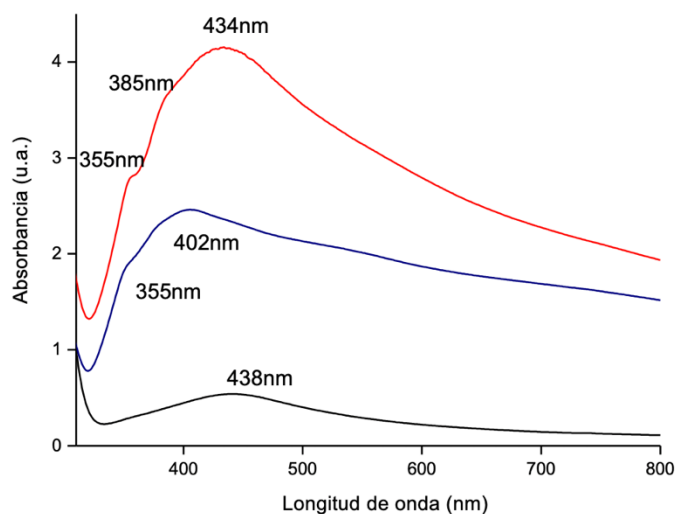


Figura 36. Caracterización de AgNWs mediante espectroscopía UV-Vis. En rojo, el producto de AgNWs sin lavar. En azul, el producto de AgNWs tras varios lavados. En negro, el sobrenadante en etanol (residuo).

La **figura 36** muestra los espectros de absorción del producto de AgNWs sin lavar, tras centrifugarse y el residuo eliminado tras los lavados.

En primer lugar, se analizó el espectro del producto sin lavar, en el que pueden observarse tres picos de absorción a 355, 385 y 434 nm. Los picos a 355 y 385 nm son característicos de los AgNWs y el pico en 434 nm, se atribuye a la presencia de nanopartículas de plata en el producto de reacción [162, 163].

En cuanto al espectro de los AgNWs tras los lavados con etanol, muestra un pico en la región visible en 355 nm, que se corresponde a la absorción longitudinal de los AgNWs, y otro pico en 402 nm, atribuible a la absorción transversal de los AgNWs [164]. La ausencia del pico en 434 nm, asignado a las nanopartículas, indica la eliminación efectiva de estas tras los lavados [162].

Por otro lado, también se muestra la respuesta del sobrenadante, es decir, del residuo eliminado tras los lavados, donde quedan retenidas las impurezas y nanopartículas de la reacción. Puede observarse la presencia de un pico en 438 nm, indicando la presencia de dichas partículas [162].

5.1.4. Técnicas electroquímicas: voltametría cíclica

5.1.4.1. Respuesta de ITO recubierto con AgNWs en tampón fosfato (blanco)

Se analizó la respuesta de dos ITO modificados con AgNWs en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 mediante voltametría cíclica, comparándolos con un ITO sin modificar. Los resultados obtenidos para el último ciclo fueron los mostrados en la **figura 37**.

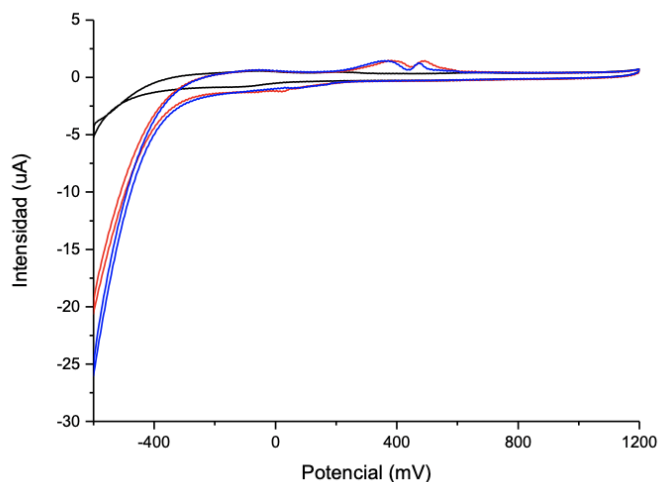


Figura 37. Voltamograma comparativo entre ITO sin modificar (negro), AgNWs (rojo) y su réplica (azul).

Como se puede observar en la **figura 38**, la reproducibilidad de ambos sensores es buena, ya que presenta un coeficiente de variación $CV = 3,7 \%$, además, presentan dos picos anódicos en los potenciales de 370 y 485 mV, aproximadamente, característicos de la presencia de la plata en los AgNWs, que representan la oxidación de Ag^0 a Ag^+ y de Ag^+ a Ag^{2+} , respectivamente. Mientras que, en la zona de reducción, se aprecia un ligero hombro alrededor de -130 mV que se corresponde con el solapamiento de los dos picos de reducción de Ag^+ a Ag^0 y de Ag^{2+} a Ag^+ [165].

5.1.4.2. Respuesta de ITO recubierto con AgNWs en galactosa y catecol

El estudio electroquímico de los sensores modificados con AgNWs se llevó a cabo en las disoluciones patrón galactosa y catecol 10^{-4} y 10^{-3} M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 y se comparó con la respuesta del mismo en tampón fosfato. Las respuestas voltamétricas del último ciclo se pueden observar en la **figura 38**.

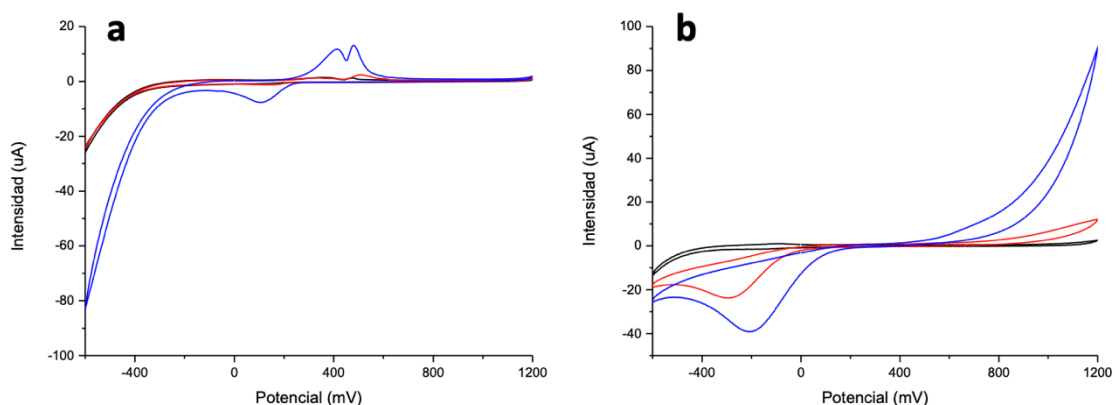


Figura 38. Respuesta voltamétrica de AgNWs (a) en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (negro), en muestra patrón de galactosa 10^{-4} M (rojo) y en muestra patrón de galactosa 10^{-3} M (azul); (b) en tampón fosfato 0,01 M a pH 7 (negro), en muestra patrón de catecol 10^{-4} M (rojo) y en muestra patrón de catecol 10^{-3} M (azul).

Como puede verse en la **figura 38**, tanto en disolución patrón de galactosa como de catecol, al aumentar la concentración de analito mejora la respuesta de los AgNWs debido a la reducción de la galactosa y el catecol.

En el caso de la respuesta del sensor en disolución de galactosa (**figura 38 (a)**), cuando la concentración es 10^{-4} M, la señal del pico anódico a 360 mV se mantiene constante, mientras que el pico anódico de la plata aumenta de 1,3 a 2,4 μA con respecto a la medida en el blanco a un potencial de 510 mV. También se observa un aumento en la intensidad del pico catódico, que va desde - 0,6 hasta - 1,4 μA , con respecto a la medida en tampón fosfato. Al aumentar la concentración a 10^{-3} M, los picos anódicos sufren un aumento hasta 11,8 y 13 μA , respectivamente, y el pico catódico decrece hasta - 7,7 μA .

En el caso de la respuesta del sensor en la disolución de catecol (**figura 38 (b)**), los picos anódicos desaparecen y se ve un incremento apreciable en el pico catódico a medida que aumenta la concentración de analito. Cuando la concentración es 10^{-4} M, la señal del pico catódico aumenta hasta - 22 μA para un potencial de - 300 mV. El pico se ve incrementado hasta - 40 μA para una disolución de catecol 10^{-3} M, desplazándose hacia la derecha, con un potencial de -200 mV. Además, se incrementa notablemente el pico a 1200 mV, alcanzando los 90 μA , debido a la oxidación del medio.

En ambos casos, queda demostrado que los AgNWs mejoran la transferencia de electrones entre el electrodo y el analito, ya que cuanto mayor es la concentración de analito de la muestra patrón, mayor es la intensidad de la señal.

5.2. Preparación de biosensores enzimáticos

5.2.1. Espectroscopía de absorción ultravioleta visible

Con el fin de caracterizar espectroscópicamente los biosensores, se evaluó su comportamiento mediante la técnica UV-Vis.

Se compararon los resultados obtenidos tras depositar sobre un sustrato de cuarzo AgNWs, AgNWs y la enzima correspondiente y las configuraciones modificadas con glutaraldehído y Nafion[®], para analizar su absorbancia frente a la longitud de onda.

Sensores basados en GaOx

Se comparó la respuesta espectroscópica de los AgNWs, AgNWs/GaOx y AgNWs/GaOx/GLU, como se puede ver en la **figura 39**.

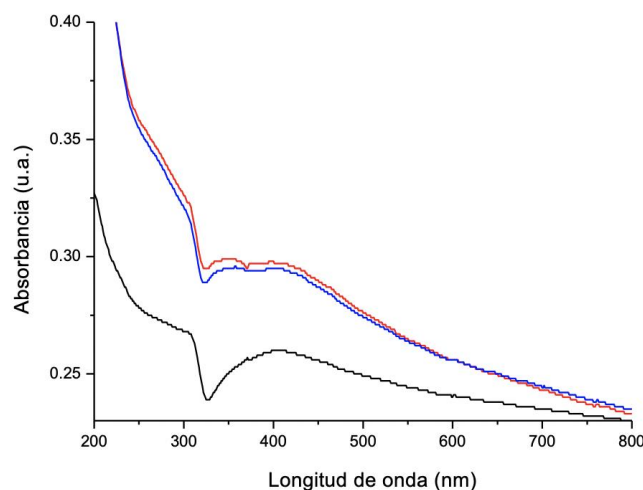


Figura 39. Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/GaOx (rojo) y AgNWs/GaOx/GLU (azul).

La **figura 39** compara los espectros de absorción de los biosensores y los resultados son mejorables, pero dadas las circunstancias no pudieron repetirse los espectros. Además de los picos característicos de los AgNWs ya mencionados en su caracterización, el biosensor posee un pico en 280 nm, producido por presencia de la enzima [166]. El someter al sensor a vapores de glutaraldehído no afecta

significativamente a la absorbancia del mismo, aunque aumentan ligeramente los picos mencionados.

En cuanto a las configuraciones con Nafion[®], la **figura 40** muestra los resultados obtenidos que, como en el espectro anterior, son mejorables.

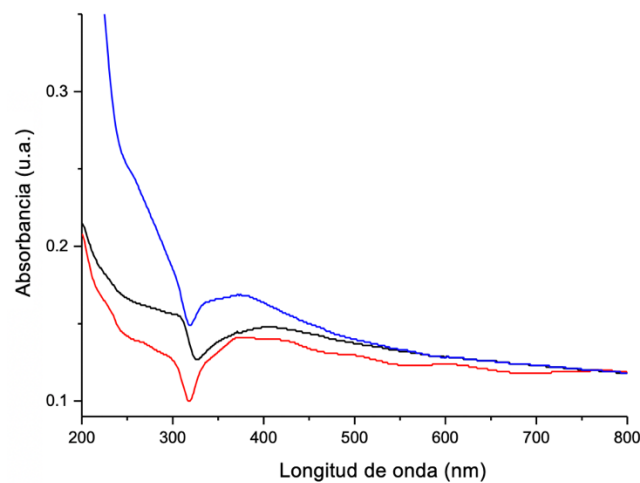


Figura 40. Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/NF (rojo) y AgNWs/GaOx/NF (azul).

Ante la adición de una película de Nafion[®] al sensor, surgen dos hombros, uno en 230 nm y otro en 273 nm [167]. De nuevo, la adición de la enzima GaOx, presenta los picos que se describieron en la configuración anterior.

Sensores basados en TYR

Se procedió del mismo modo para los casos de estudio con la enzima TYR. La **figura 41** muestra los espectros obtenidos para la configuración correspondiente sometiendo al sensor a vapores de glutaraldehído.

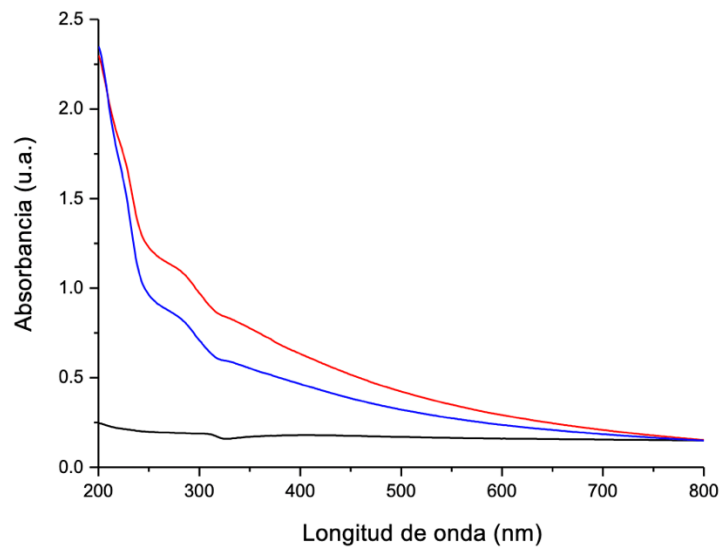


Figura 41. Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/TYR (rojo) y AgNWs/TYR/GLU (azul).

En la **figura 41** se pudo observar la presencia de un pico a 280 nm producido al depositar la enzima TYR. Este pico se ve significativamente incrementado tras someter a la enzima a los vapores de glutaraldehído.

Por último, se estudió el espectro de absorción de la configuración utilizando Nafion® como membrana inmovilizadora de la enzima TYR. En la **figura 42** se representan los resultados obtenidos, que como se explicó en los casos anteriores, se podrían mejorar.

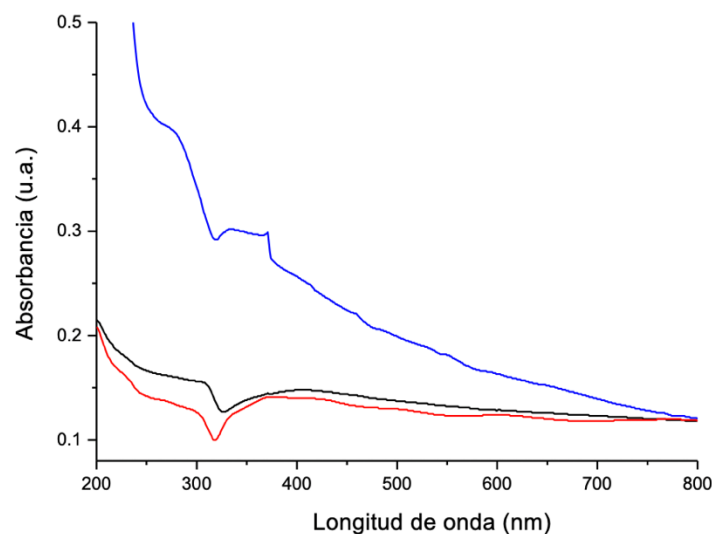


Figura 42. Espectro UV-Vis en el intervalo 200 a 800 nm de longitud de onda para los AgNWs (negro), AgNWs/NF (rojo) y AgNWs/TYR/NF (azul).

En la **figura 42** se pudo comprobar, que al depositar la enzima TYR se produce un hombro en 280 nm y dos picos correspondientes a las longitudes de onda 340 y 370 nm, producidos por la presencia de dicha enzima.

5.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Los diferentes sensores preparados, se estudiaron mediante espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR), con el objetivo de identificar los grupos funcionales de los compuestos depositados, registrados mediante sus bandas características.

Se compararon los resultados obtenidos para las configuraciones AgNWs, AgNWs/GaOx y AgNWs/TYR, para comprobar la inmovilización de las enzimas en la superficie recubierta por AgNWs, obteniéndose los resultados mostrados en la **figura 43**.

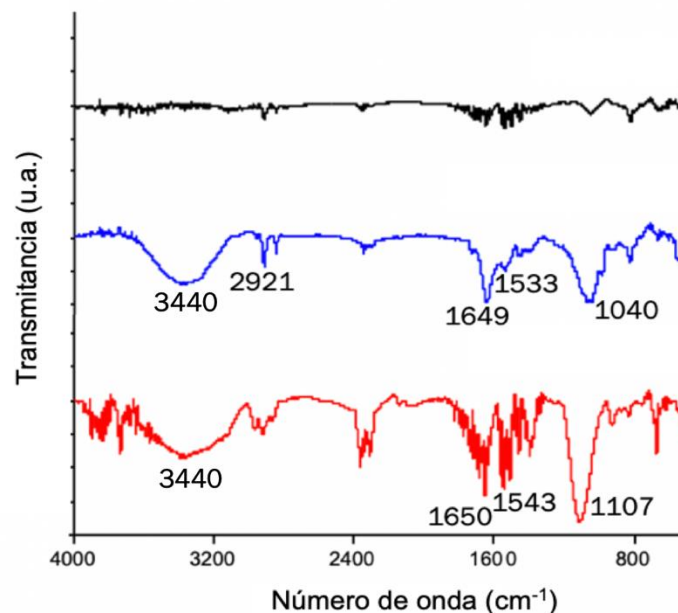


Figura 43. Espectro FT-IR de AgNWs (negro), AgNWs/ TYR (azul) y AgNWs/GaOx (rojo).

Al depositar la enzima TYR, se observó un pico a 2921 cm⁻¹ correspondientes al grupo -CH₃. El pico en 1040 cm⁻¹ se corresponde con la vibración de los enlaces -C-OH. El pico en 1649 cm⁻¹ para el grupo amida I se debe a la absorción de la vibración por estiramiento de los enlaces peptídicos -C=O. Por último, el pico a 1533 cm⁻¹ para la

amida II se debe a la absorción por flexión del enlace -NH y el estiramiento del enlace -CN [168].

Ante la presencia de GaOx, se observaron los picos característicos de la enzima en 1650 y 1543 cm^{-1} , correspondientes a las bandas de la amida I y amida II, respectivamente, de la GaOx. También pudo verse un pico intenso en 1107 cm^{-1} que se corresponde con los grupos hidroxilo de dicha enzima [166].

Para ambas enzimas, pudo observarse un pico en 3440 cm^{-1} que se corresponde con la vibración del grupo -OH [169].

Con estos resultados se comprobó la buena inmovilización de ambas enzimas sobre la película de AgNWs.

Se realizó un estudio del espectro AgNWs/NF para compararla con los AgNWs y con los biosensores, una vez inmovilizada la enzima. Los resultados se observan en la **figura 44**.

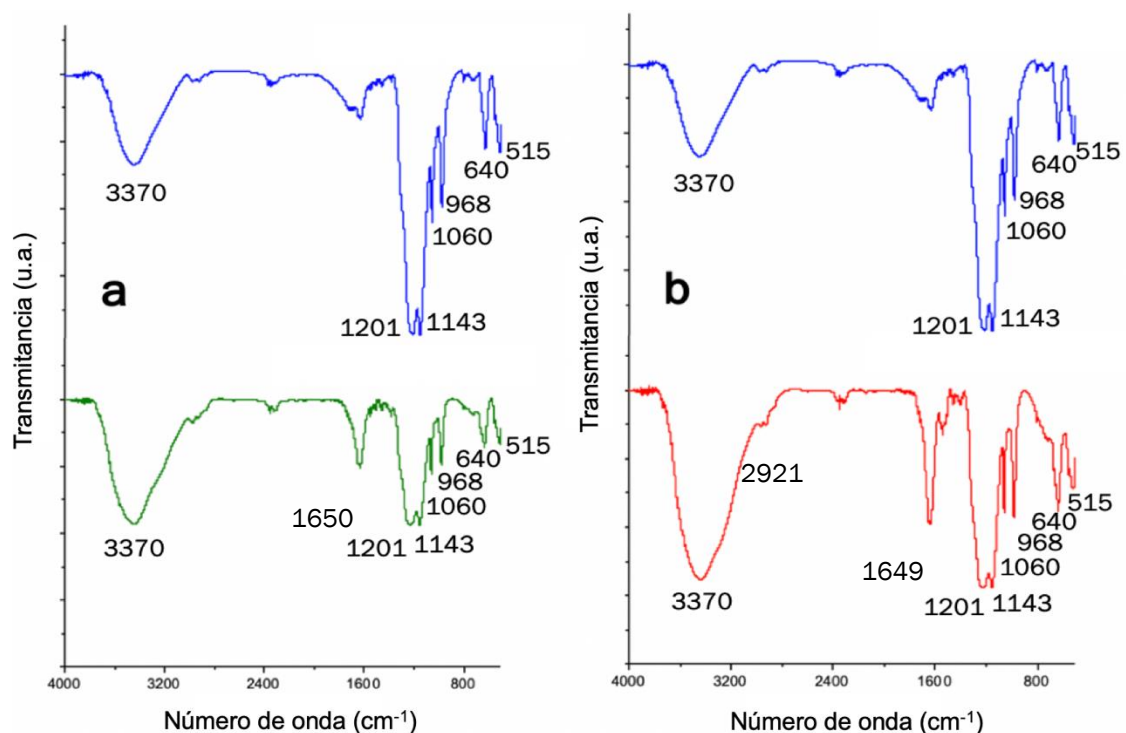


Figura 44. Espectro FT-IR comparativo de las configuraciones con Nafion®: a) Espectro AgNWs/NF (azul) y AgNWs/GaOx/NF (verde); b) Espectro AgNWs/NF (azul) y AgNWs/TY/NF (rojo).

Como representan tanto la **figura 44 a** como la **figura 44 b**, la presencia del Nafion® se constata con el pico en 3370 cm^{-1} , que se debe al enlace -OH del grupo -SO₃H [170]. Los picos en 1201 y 1143 cm^{-1} , se corresponden con el estiramiento

asimétrico y simétrico de los enlaces $-CF_2$. Por otro lado, el pico en 1060 cm^{-1} , se debe al estiramiento simétrico de los enlaces S-O del grupo $-SO_3H$. El pico en 968 cm^{-1} se debe al estiramiento simétrico de los enlaces C-O-C [171]. El pico a 640 cm^{-1} surge del estiramiento del grupo C-S. Por último, la banda observada en 515 cm^{-1} se debe al enlace O-S-O [172]. En cuanto a las configuraciones con las enzimas, pueden visualizarse los picos mencionados anteriormente y los picos correspondientes a cada una de ellas, estudiados en la **figura 44**, lo que corrobora su correcta absorción sobre la superficie del electrodo.

5.2.3. Respuesta voltamétrica de los biosensores

Con el objetivo de evaluar el funcionamiento de los biosensores enzimáticos y la conservación de la actividad de las enzimas, se realizó el estudio de la respuesta voltamétrica de los mismos. Además, se comparó su respuesta con aquellos que incluían alguna técnica de retención enzimática, con el fin de seleccionar el que mejor respuesta presentase ante la presencia de los analitos galactosa y catecol.

5.2.3.1. Estudio de la respuesta electroquímica de los biosensores

Respuesta frente a galactosa

En primer lugar, se evaluó el comportamiento de los biosensores formados al depositar los AgNWs y la enzima GaOx en el azúcar catalizado por esta. Se estudió su comportamiento en disolución de galactosa 10^{-3} M en tampón fosfato $0,01\text{ M}$ a pH 7, aplicando un intervalo de potencial de -600 a 1200 mV , con una velocidad de barrido de 100 mV/s y 5 ciclos.

Los resultados del último ciclo se muestran en la **figura 45**, donde se pueden comparar las respuestas obtenidas con las dos configuraciones utilizando vapores de glutaraldehído, antes y después de depositar la enzima. Ambas fueron explicadas en el apartado **4. Metodología y desarrollo experimental**.

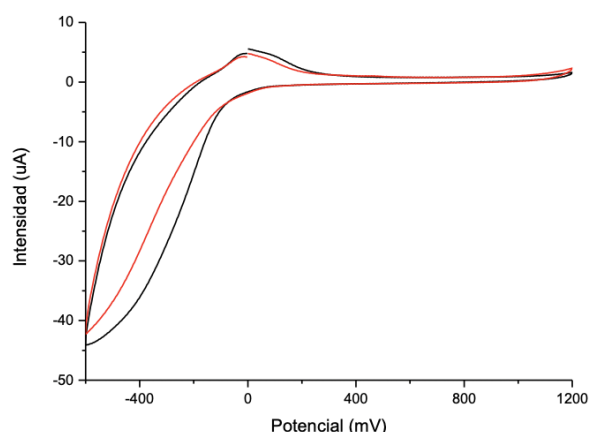


Figura 45. Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con glutaraldehído en disolución patrón de galactosa 10^{-3} M: AgNWs/GaOx/GLU (negro) y AgNWs/GLU/GaOx (rojo).

Se pudo comprobar que el par de picos en - 600 y 0 mV se deben al par redox Cu (II)/Cu (I) de la metaloenzima GaOx. El pico anódico en 0 mV representa la oxidación de Cu^+ a Cu^{2+} y el pico catódico en - 600 mV se produce debido a la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ [173].

El objetivo fue comparar el sensor en el que solo se depositó GaOx con ambas configuraciones (AgNWs/GaOx/GLU y AgNWs/GLU/GaOx) utilizando el agente reticulante glutaraldehído para comprobar la correcta inmovilización de la enzima y además comparar cuál de las dos configuraciones sometidas a vapores de glutaraldehído presentó una mayor sensibilidad ante la presencia del analito. En la **figura 45**, ambas configuraciones presentan respuestas similares, por lo que, para realizar la selección de la configuración más adecuada, se estudió su reproducibilidad para realizar la selección del biosensor y además se realizó un estudio de la repetitividad de los sensores, como se verá en apartados posteriores.

5.2.3.2. Estudio de la reproducibilidad de los biosensores de GaOx utilizando como inmovilizador vapores de glutaraldehído

Se realizó un estudio de la reproducibilidad de las configuraciones de los biosensores con glutaraldehído para la enzima GaOx, utilizando la voltametría cíclica, para seleccionar el sensor que mayor reproducibilidad presentara. Para ello, se elaboraron los biosensores por duplicado. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la **figura 46**.

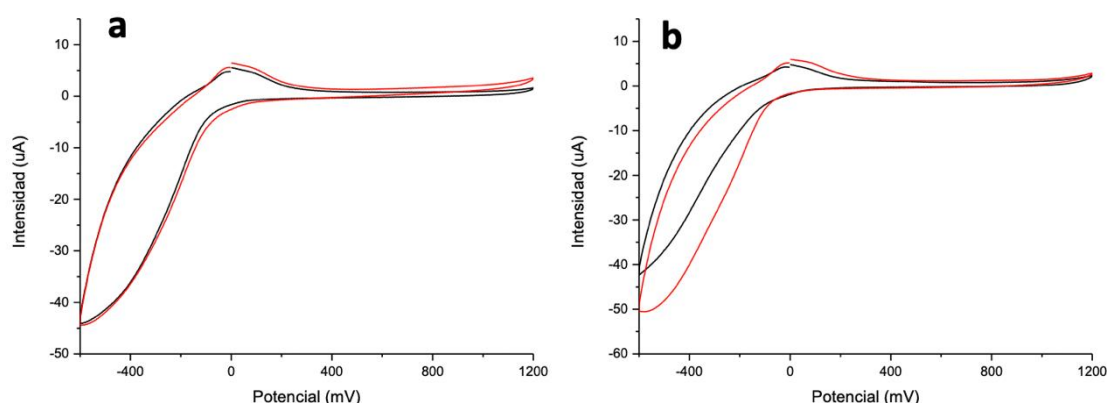


Figura 46. Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando vapores de glutaraldehído como inmovilizador enzimático de la GaOx en disolución de galactosa 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/GaOx/GLU; b) configuración AgNWs/GLU/GaOx.

Como se puede observar, la respuesta voltamétrica de los sensores con la configuración AgNWs/GaOx/GLU (**figura 46 a**) presentan una reproducibilidad muy buena, con un coeficiente de variación de CV = 0,5 % para el pico catódico. Sin embargo, la respuesta de la configuración AgNWs/GLU/GaOx (**figura 46 b**) tiene un coeficiente de variación de CV = 12,5 % para el pico catódico.

La mejor respuesta ante la presencia de analito de la configuración AgNWs/GaOx/GLU es debido al aumento de la estabilidad de la enzima al obtener un entramado covalente, es decir, la propia enzima actúa como soporte y su estructura terciaria es estabilizada por uniones covalentes intermoleculares fuertes, que hacen que, a través de los canales de su red, permita el paso del sustrato hasta su centro activo, donde se cataliza la reacción de oxidación-reducción [174]. En cambio, la configuración AgNWs/GLU/GaOx, no es tan estable, ya que el reticulado de glutaraldehído se realiza antes de depositar la enzima, lo cual puede dar lugar a la pérdida parcial de actividad enzimática o que parte de la enzima no quede anclada al soporte y se pierda en la disolución.

5.2.3.3. Estudio de la repetitividad de los biosensores de GaOx utilizando como inmovilizador vapores de glutaraldehído

El estudio de la repetitividad de los sensores se realizó con el objetivo de medir la estabilidad de cada uno de ellos ante la presencia del analito correspondiente, comparando los sensores en los que la enzima no se inmovilizó y aquellos en que se utilizó un agente reticulante como inmovilizador enzimático. Para ello, se realizaron, mediante voltametría cíclica, cinco ciclos consecutivos utilizando un intervalo de potencial de - 600 a 1200 mV a las configuraciones seleccionadas anteriormente.



A continuación, se presentan en la **figura 47** los resultados para la configuración en la que se ha depositado la enzima GaOx sin inmovilizador enzimático y aquellas configuraciones en las que se ha inmovilizado con glutaraldehído (AgNWs/GLU/GaOx y AgNWs/GaOx/GLU).

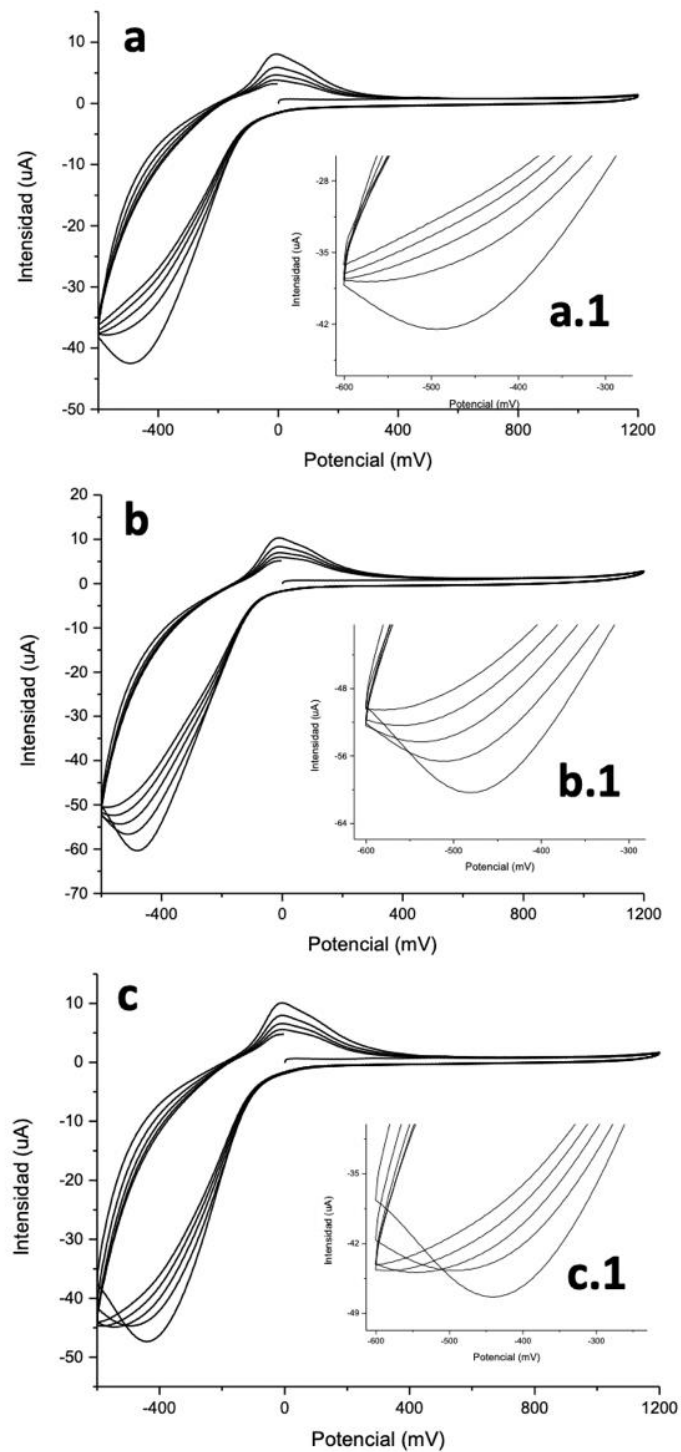


Figura 47. Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima GaOx: a) configuración AgNWs/GaOx; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/GLU/GaOx; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/GaOx/GLU; c.1) detalle del pico catódico.

Como se puede observar en la **figura 47**, para cada una de las configuraciones se graficaron los voltamogramas de cinco ciclos consecutivos. En la **tabla 1**, se recogen

los valores de las intensidades del pico catódico para las tres configuraciones con GaOx.

Tabla 1. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con glutaraldehído.

Ciclo\Configuración	AgNWs/GaOx	AgNWs/GLU/GaOx	AgNWs/GaOx/GLU
2	-36,4	-55,9	-42,8
3	-34,3	-52,4	-41,4
4	-32,6	-49,2	-40,2
5	-31	-46,6	-38,9

En las **figuras 47 (b) y 47 (c)**, se comprobó que el primer ciclo de las dos configuraciones presentó una mayor intensidad, que se desvía del resto de ciclos (-60,4 μ A para la configuración AgNWs/GLU/GaOx y -47 μ A para la configuración AgNWs/GaOx/GLU). El coeficiente de variación obtenido para estas configuraciones se muestra en la **tabla 2**.

Tabla 2. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con GaOx y glutaraldehído.

Configuración	AgNWs/GaOx	AgNWs/GLU/GaOx	AgNWs/GaOx/GLU
CV (%)	12,5	7,9	4,1

La **tabla 2** para la configuración AgNWs/GaOx muestra que el coeficiente de variación tras la realización de cinco ciclos consecutivos es de CV = 12,5 %, lo que indica una mala repetitividad. La diferencia entre un ciclo y el siguiente puede deberse a una pérdida parcial de la enzima en la disolución, al no estar ésta anclada al soporte con un reticulante. En el caso de la configuración AgNWs/GLU/GaOx, el coeficiente de variación es menor al del sensor sin inmovilizador enzimático (CV = 7,9%) pero sigue estando por encima de los valores habituales, por lo que se puede deducir que esta configuración no inmoviliza correctamente la enzima, lo cual se explicó en el apartado **2. Fundamento teórico**. Por último, en cuanto al sensor con la configuración AgNWs/GaOx/GLU, se puede observar una mejora en el coeficiente de variación (CV = 4,1 %), lo que corrobora la correcta fijación de la enzima al electrodo.

Con estos resultados, la configuración que mejor reproducibilidad y repetitividad presentó fue AgNWs/GaOx/GLU.

Una vez elegida la configuración, se estudió la respuesta de los distintos sensores para comprobar si se mejora o no la respuesta voltamétrica al inmovilizar la enzima con glutaraldehído. Los resultados se representan en la **figura 48**.

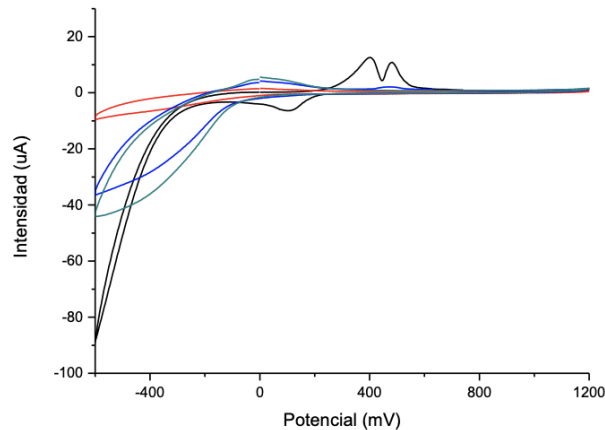


Figura 48. Respuesta voltamétrica comparativa de los sensores: AgNWs (negro), GaOx (rojo), AgNWs/GaOx (azul) y AgNWs/GaOx/GLU (verde) en disolución de galactosa 10^{-3} M.

Comparando la respuesta del sensor con GaOx y el sensor con AgNWs/GaOx se observa un incremento en la señal tanto para el pico catódico como el anódico. Para un potencial de - 600 mV, la intensidad del pico catódico aumenta de - 9,5 hasta - 36,5 μ A y para un potencial de 0 mV, la intensidad del pico anódico aumenta de 1,6 a 4,2 μ A, con lo que se demuestra que, efectivamente, la presencia de AgNWs mejora la respuesta de los sensores voltamétricos.

Además, ante el sometimiento del sensor a vapores de glutaraldehído la intensidad del pico catódico asciende a - 44,1 μ A y el anódico a 5,5 μ A, lo que evidencia que, al inmovilizar la enzima, se mejora la sensibilidad, como cabía esperar.

Por otro lado, se estudió el comportamiento de los biosensores con las configuraciones utilizando Nafion® comercial como membrana inmovilizadora de la enzima GaOx. Se depositó Nafion® mediante drop casting antes y después de la enzima para demostrar su actividad como reticulante de la enzima y se compararon las señales de ambos sensores. Las voltametrías se realizaron sobre una disolución patrón de galactosa 10^{-3} M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7, obteniendo los resultados que se muestran en la **figura 49**.

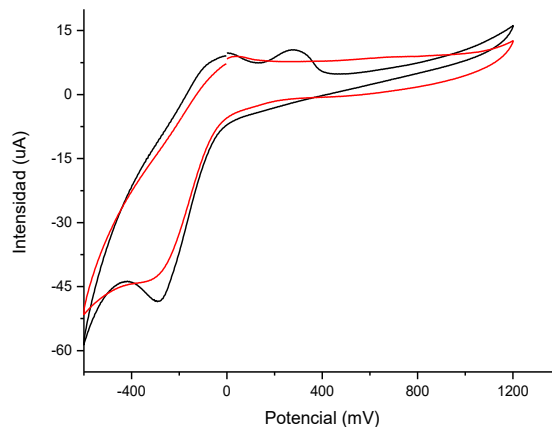


Figura 49. Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con Nafion® en disolución de galactosa 10^{-3} M: AgNWs/GaOx/NF (negro) y AgNWs/NF/GaOx (rojo).

Los resultados mostrados en la **figura 49** indican, al igual que en el caso anterior la oxidación/reducción de la GaOx para las dos configuraciones de los sensores utilizando Nafion® como inmovilizador de la enzima. La configuración AgNWs/GaOx/NF presentó una intensidad de $10 \mu\text{A}$ y $-48,5 \mu\text{A}$ para los picos anódico y catódico de la GaOx, respectivamente. Por otra parte, el pico anódico presente a 275 mV indica la oxidación del par $\text{Ag}^+/\text{Ag}^{2+}$, con una intensidad de $11 \mu\text{A}$. La aparición de este pico puede deberse a que el Nafion® es una membrana permeable a los protones, permitiendo la oxidación de la plata. En el caso de la configuración AgNWs/NF/GaOx, la intensidad del pico catódico alcanzó los $-45 \mu\text{A}$, mientras que el pico anódico se mantuvo en los $10 \mu\text{A}$.

Como en el caso anterior se realizó un estudio de la reproducibilidad y repetitividad de los sensores, para comprobar qué sensor presentó una mejor respuesta, ya que no hay mucha diferencia entre ellos.

5.2.3.4. Estudio de la reproducibilidad de los biosensores de GaOx utilizando como inmovilizador Nafion® comercial

Se analizó la reproducibilidad de las configuraciones de los biosensores con Nafion® para la enzima GaOx, como en el caso anterior, con el fin de seleccionar la configuración con mejor respuesta ante la presencia de analito. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la **figura 50**.

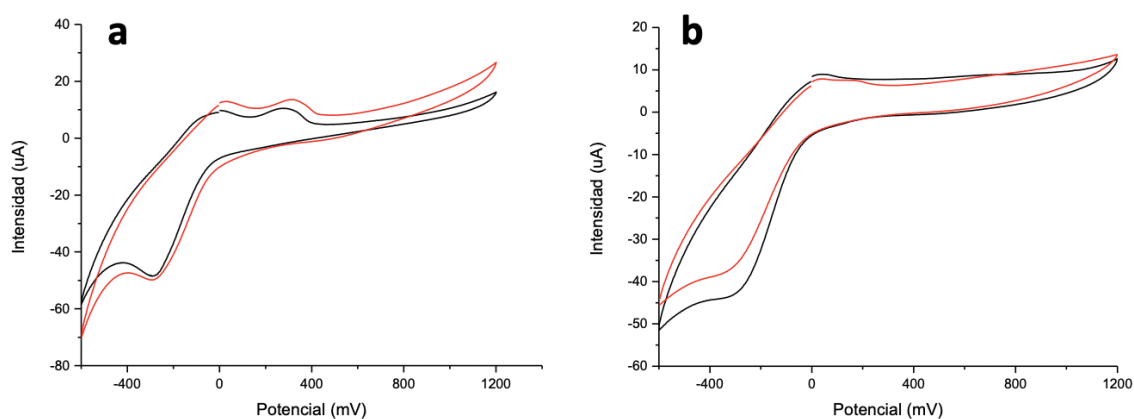


Figura 50. Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando Nafion® como inmovilizador enzimático de la GaOx en disolución de galactosa 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/GaOx/NF; b) configuración AgNWs/NF/GaOx.

Analizando la respuesta del pico catódico para ambas configuraciones, se obtuvo para la configuración AgNWs/GaOx/NF (**figura 50 a**) un coeficiente de variación de CV = 1,4 %, y para la configuración AgNWs/NF/GaOx (**figura 50 b**), de CV = 10,6 %. Por tanto, la configuración seleccionada fue AgNWs/GaOx/NF, ya que su reproducibilidad es mejor.

5.2.3.5. Estudio de la repetitividad de los biosensores de GaOx utilizando como inmovilizador Nafion® comercial

Para el estudio de la repetitividad de los sensores con Nafion® se procedió del mismo modo que para las configuraciones con glutaraldehído. Para ello, se realizaron, mediante voltametría cíclica, cinco ciclos consecutivos utilizando un intervalo de potencial de - 600 a 1200 mV a las configuraciones en las que se depositó la membrana.

A continuación, se presentan en la **figura 51** los resultados para la configuración en la que se ha depositado la enzima GaOx sin inmovilizador enzimático y aquellas configuraciones en las que se ha inmovilizado con Nafion® comercial (AgNWs/NF/GaOx y AgNWs/GaOx/NF).

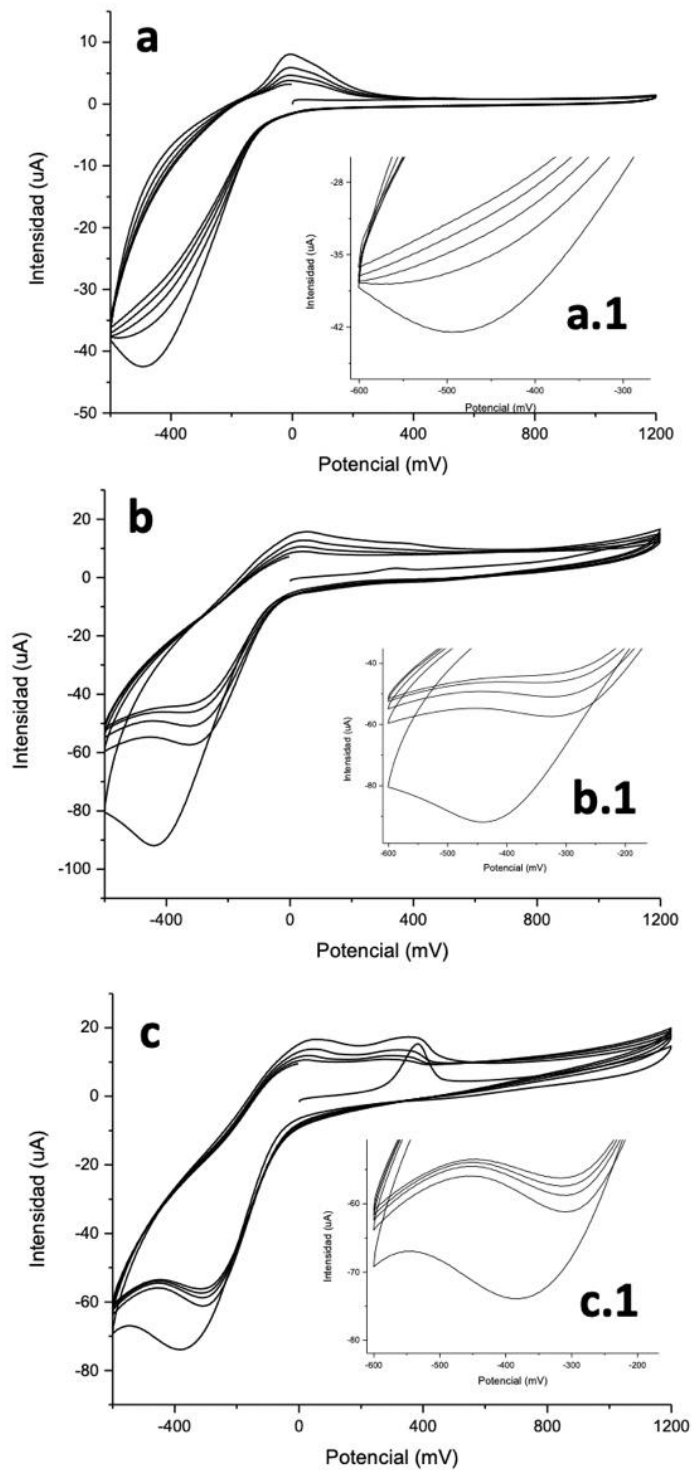


Figura 51. Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima GaOx: a) configuración AgNWs/GaOx; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/NF/GaOx; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/GaOx/NF; c.1) detalle del pico catódico.

Como se puede observar en la **figura 51**, para cada una de las configuraciones se representaron los voltamogramas de cinco ciclos consecutivos. En la **tabla 3**, se

recogen los valores de las intensidades del pico catódico para las tres configuraciones con GaOx.

Tabla 3. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con Nafion®.

Ciclo\Configuración	AgNWs/GaOx	AgNWs/NF/GaOx	AgNWs/GaOx/NF
2	-36,4	-57,4	-61,2
3	-34,3	-50,7	-58,8
4	-32,6	-46,3	-57,4
5	-31	-43,2	-56,1

En las **figuras 51 (b) y 51 (c)**, se comprobó que el primer ciclo de las dos configuraciones presentó una mayor intensidad, que se desvía del resto de ciclos (-92 μ A para la configuración AgNWs/NF/GaOx y -73,8 μ A para la configuración AgNWs/GaOx/NF). Los cuatro ciclos restantes poseen una intensidad similar por lo que se tuvieron en cuenta estos. Los coeficientes de variación son los mostrados en la **tabla 4**.

Tabla 4. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con GaOx y Nafion®.

Configuración	AgNWs/GaOx	AgNWs/NF/GaOx	AgNWs/GaOx/NF
CV (%)	12,5	12,5	3,7

El coeficiente de variación obtenido para la configuración AgNWs/GaOx es de CV = 12,5 %, como se indicó en el análisis de las configuraciones con glutaraldehído. En el caso de la configuración AgNWs/NF/GaOx, el coeficiente de variación es igual al del sensor sin inmovilizador enzimático (CV = 12,5 %) por lo que esta configuración no inmoviliza correctamente la enzima. Por último, en cuanto al sensor con la configuración AgNWs/GaOx/NF, se puede observar una gran mejora en el coeficiente de variación (CV = 3,7 %) con respecto a ambos sensores, lo que corrobora la correcta fijación de la enzima al electrodo.

Con estos resultados, la configuración que mejor reproducibilidad y repetitividad presentó fue AgNWs/GaOx/NF.

Una vez seleccionada la configuración con Nafion®, se comparó la respuesta voltamétrica de los sensores para comprobar que la inmovilización enzimática con Nafion® resultaba en una mayor intensidad de los picos. Los voltamogramas resultantes se observan en la **figura 52**.

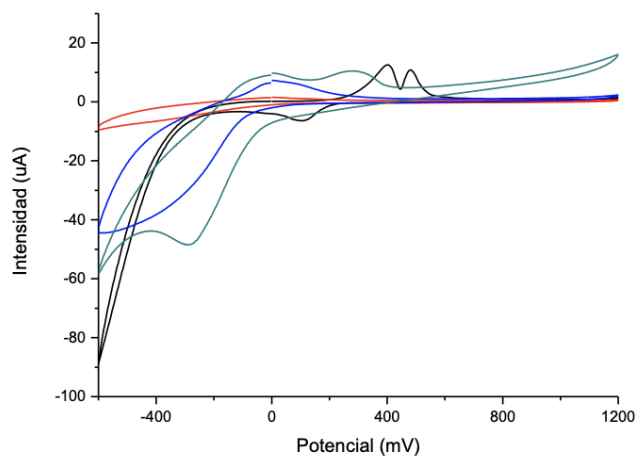


Figura 52. Respuesta voltamétrica de AgNWs(negro), GaOx (rojo), AgNWs/GaOx (azul) AgNWs/GaOx/NF (verde) en disolución de galactosa 10^{-3} M.

Se comprobó que la presencia de AgNWs en los sensores mejora notablemente la respuesta voltamétrica, produciéndose un aumento de la intensidad de la señal del pico catódico de $-9,5$ a $-44,2 \mu\text{A}$, y del pico anódico de $1,4$ a $7,3 \mu\text{A}$ con respecto al sensor que solo tiene GaOx.

Por otro lado, la inmovilización de la enzima con la membrana mejora la respuesta de los sensores voltamétricos, tanto del pico anódico como del catódico. El pico catódico aumenta de $-44,2$ a $-48,6 \mu\text{A}$, sufriendo un desplazamiento de -500 a -280 mV y el pico anódico aumenta de $7,3$ a $9,8 \mu\text{A}$; además, ante la presencia de Nafion[®], se visualiza claramente el pico anódico correspondiente a la oxidación de la plata a un potencial de 275 mV con una intensidad de $10,6 \mu\text{A}$.

Respuesta frente a catecol

Una vez determinado el comportamiento de los biosensores modificados con GaOx en disolución patrón de galactosa, se determinaron las respuestas ofrecidas por los biosensores modificados con TYR en catecol, siguiendo el mismo protocolo de trabajo.

En primer lugar, se estudió la respuesta voltamétrica de los biosensores ante una disolución de catecol 10^{-3} M en tampón fosfato a pH 7, en el mismo intervalo de potencial y a la misma velocidad de barrido que para los sensores anteriores.

Como puede observarse en la **figura 53**, la intensidad del pico catódico se vio incrementada de $-83 \mu\text{A}$ a $-100 \mu\text{A}$ cuando se sometió al sensor a vapores de glutaraldehído después de depositar la enzima TYR.

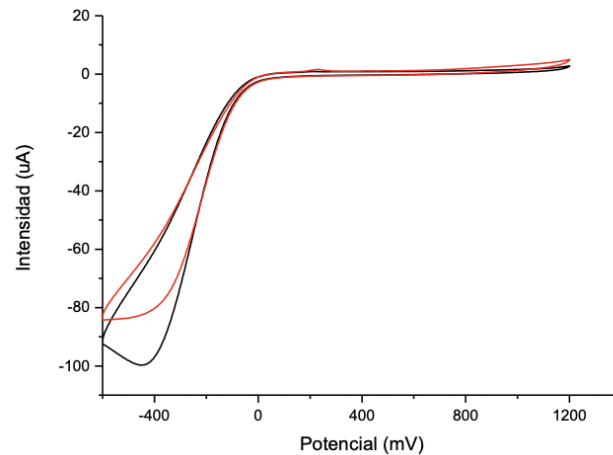


Figura 53. Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con glutaraldehído en disolución patrón de catecol 10^{-3} M: AgNWs/TYR/GLU (negro) y AgNWs/GLU/TYR (rojo).

Como en los sensores con GaOx, se realizó un estudio de la reproducibilidad y la repetitividad de los sensores para hacer la selección del sensor que mejor respuesta presentase, que se puede ver en los siguientes apartados.

5.2.3.6. Estudio de la reproducibilidad de los biosensores de TYR utilizando como inmovilizador vapores de glutaraldehído

Para el caso de los biosensores modificados con la enzima TYR, se operó de la misma manera, comparando la reproducibilidad de las dos configuraciones en disolución de catecol 10^{-3} M. La **figura 54** recoge los resultados de las configuraciones con glutaraldehído.

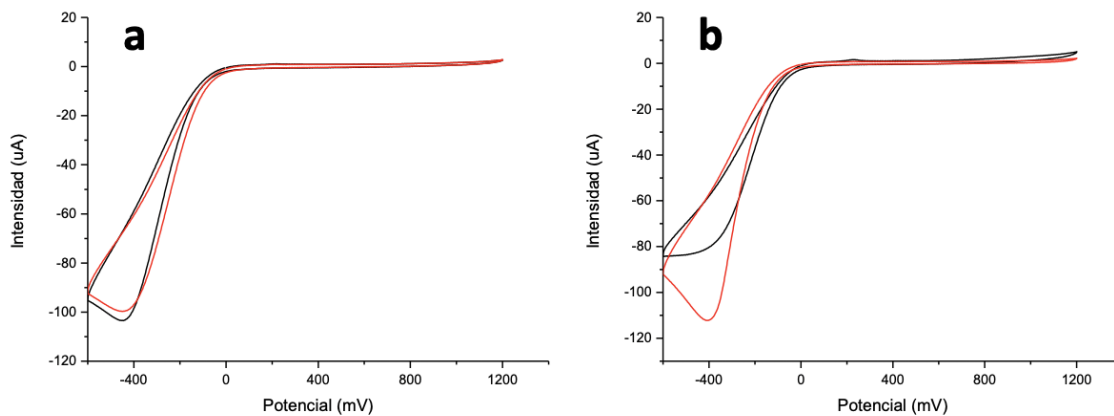


Figura 54. Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando vapores de glutaraldehído como inmovilizador enzimático de la TYR en disolución de catecol 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/TYR/GLU; b) configuración AgNWs/GLU/TYR.

En este caso, no hay duda que el sensor que mejor reproducibilidad presentó fue el de la configuración AgNWs/TYR/GLU (**figura 54 a**) con un coeficiente de variación de CV = 2,6 % frente al coeficiente obtenido con la configuración AgNWs/GLU/TYR (**figura 54 b**), CV = 22,9 %.

Como se explicó anteriormente, en la configuración AgNWs/TYR/GLU la enzima queda fijada al soporte de forma homogénea, al haberla sometido a vapores de glutaraldehído tras depositarla, de una manera mucho más estable que cuando se utiliza el agente reticulante antes de depositarla.

5.2.3.7. Estudio de la repetitividad de los biosensores de TYR utilizando como inmovilizador vapores de glutaraldehído

Para las configuraciones con la enzima TYR inmovilizada con vapores de glutaraldehído, se obtuvieron los resultados mostrados en la **figura 55**.

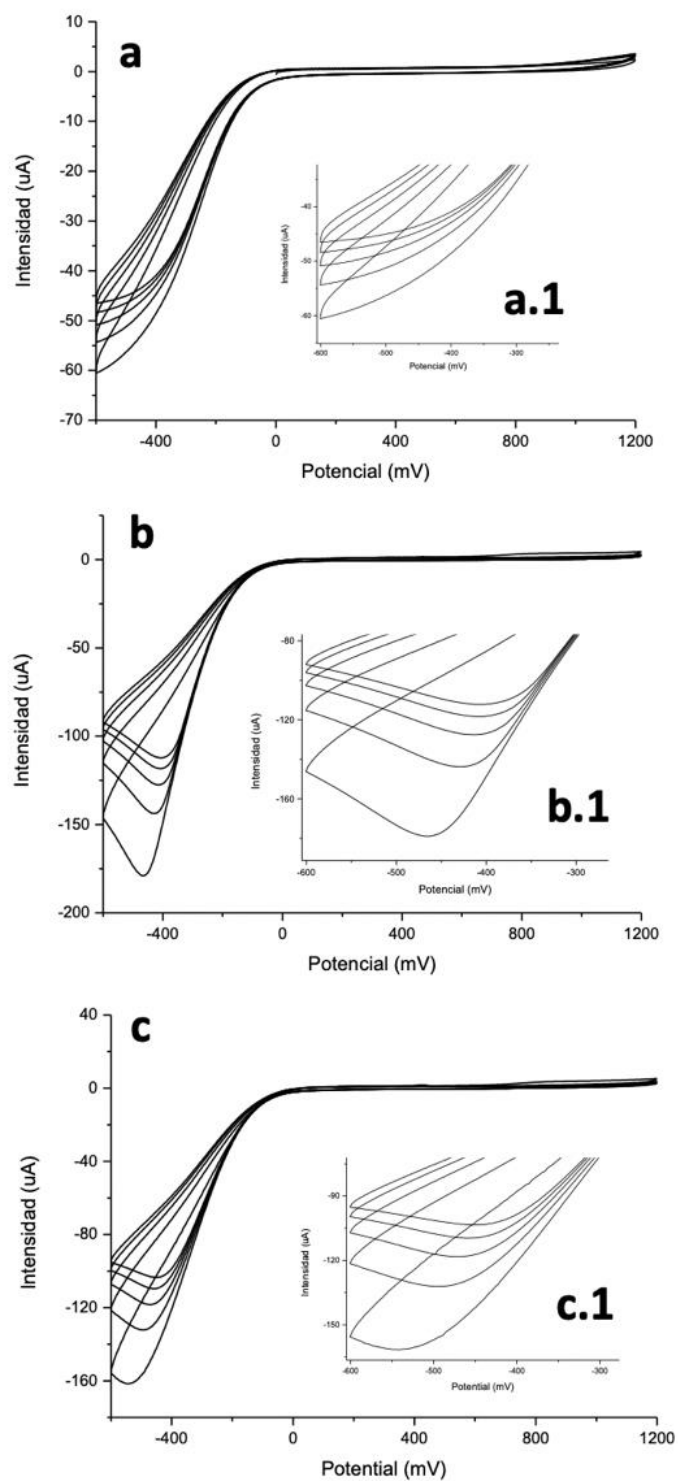


Figura 55. Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima TYR: a) configuración AgNWs/TYR; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/GLU/TYR; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/TYR/GLU; c.1) detalle del pico catódico.

La variación de intensidad de los cinco ciclos para las configuraciones con glutaraldehído se resumió en la **tabla 5**.

Tabla 5. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con glutaraldehído.

Ciclo\Configuración	AgNWs/TYR	AgNWs/GLU/TYR	AgNWs/TYR/GLU
2	-51,9	-143,3	-131,9
3	-48,9	-127,7	-118,2
4	-46,8	-117,9	-109,4
5	-45,3	-111,6	-103,2

En las **figuras 55 (b) y 55 (c)**, se comprobó que el primer ciclo de las dos configuraciones presentó una mayor intensidad, que se desvía del resto de ciclos (-179,6 μ A para la configuración AgNWs/GLU/TYR y -161,1 μ A para la configuración AgNWs/TYR/GLU). Si se tuviesen en cuenta solo los cuatro ciclos, los coeficientes de variación serían los mostrados en la **tabla 6**.

Tabla 6. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con TYR y glutaraldehído.

Configuración	AgNWs/TYR	AgNWs/GLU/TYR	AgNWs/TYR/GLU
CV (%)	9,5	11	10,8

El coeficiente de variación obtenido para la configuración AgNWs/TYR tras la realización de cinco ciclos consecutivos es de CV = 9,5 %, lo que indica una mala repetitividad, como en el caso de la GaOx. La diferencia entre un ciclo y el siguiente se debe a la pérdida de la enzima en la disolución. En el caso de la configuración AgNWs/GLU/TYR, el coeficiente de variación es mayor al del sensor sin inmovilizador enzimático (CV = 11 %). Esto se debe a que la intensidad del pico se duplica y entre ciclo y ciclo la señal experimenta una disminución más acusada. Debe compararse, por tanto, con la otra configuración para determinar cuál de ellas posee mejor repetitividad. El sensor con la configuración AgNWs/TYR/GLU, mejora su coeficiente de variación (CV = 10,8 %) con respecto a la configuración AgNWs/GLU/TYR, aunque no demasiado, por lo que se seleccionó la configuración con glutaraldehído al final por el estudio de la reproducibilidad realizado en el apartado anterior.

Una vez seleccionada la configuración más sensible al analito, se compararon las señales de los sensores en presencia del fenol con el fin de evaluar si el biosensor presenta una mejora en la señal y, también, si los AgNWs provocan una mejora en la detección de catecol. La **figura 56** reúne todos estos resultados.

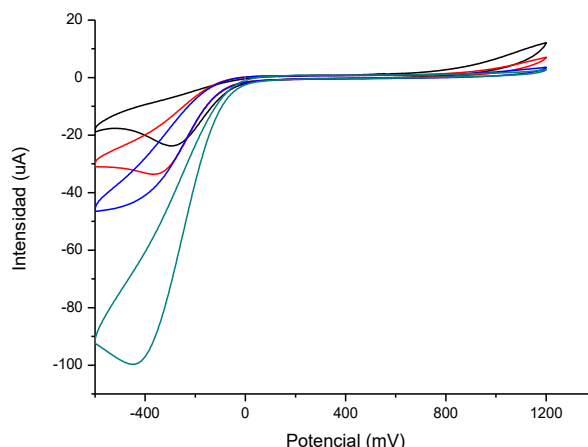


Figura 56. Respuesta voltamétrica de los AgNWs (negro), TYR (rojo), AgNWs/TYR (azul) y AgNWs/TYR/GLU (verde) en disolución de catecol 10^{-3} M.

Se evidenció en la **figura 56**, que la presencia de AgNWs en el sensor mejoró la respuesta del mismo, gracias a su efecto como mediador electrónico, incrementándose la intensidad de - 33,5 a - 46,4 μA con respecto al sensor que tiene exclusivamente TYR depositada y, además, al anclar la enzima utilizando glutaraldehído, se obtuvo el doble de intensidad (- 99,7 μA). Esto se debe a que, si no se fija la enzima, parte de ella se transfiere a la disolución, lo que ocasiona una respuesta voltamétrica menos intensa, lo cual se comprobó en el estudio de la repetitividad de los biosensores.

En cuanto a la configuración de los sensores utilizando Nafion[®] como inmovilizador de la enzima TYR, siguiendo el mismo procedimiento que para los sensores anteriores, se depositó una película de Nafion[®] comercial antes y después de la fijación de la enzima en el electrodo. Los resultados de ambas configuraciones se muestran en la **figura 57**.

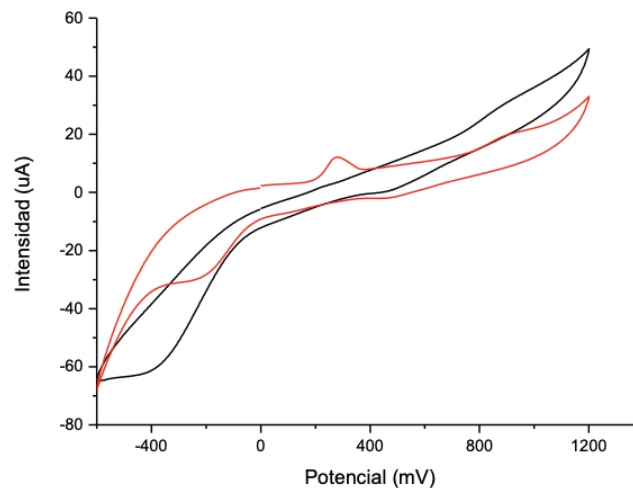


Figura 57. Respuesta voltamétrica de las configuraciones de los biosensores modificados con Nafion® en disolución de catecol 10^{-3} M: AgNWs/NF/TYR (negro) y AgNWs/TYR/NF (rojo).

En este caso, se seleccionó la configuración AgNWs/TYR/NF, no tanto por la intensidad de la señal, sino por la reproducibilidad del sensor, como se puede comprobar a continuación.

5.2.3.8. Estudio de la reproducibilidad de los biosensores de TYR utilizando como inmovilizador Nafion® comercial

La reproducibilidad de las configuraciones con Nafion® se pueden observar en la figura 58.

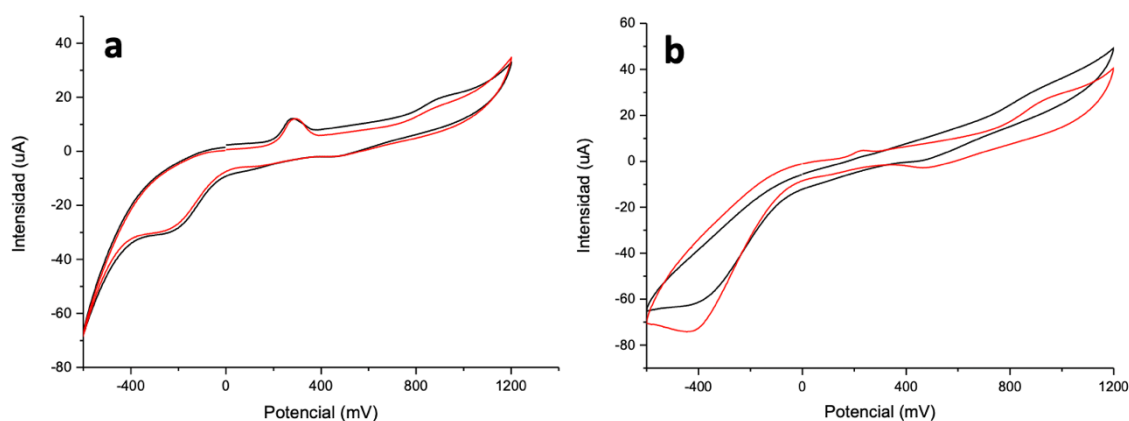


Figura 58. Respuesta voltamétrica de la reproducibilidad de los sensores nanoestructurados utilizando Nafion® como inmovilizador enzimático de la TYR en disolución de catecol 10^{-3} M: a) configuración AgNWs/TYR/NF; b) configuración AgNWs/NF/TYR.

En el caso de la configuración con AgNWs/TYR/NF (**figura 58 a**), el coeficiente de variación fue de $CV = 2,9 \%$, frente a $CV = 27,7 \%$, de la configuración AgNWs/NF/TYR (**figura 58 b**). Los resultados de la configuración AgNWs/TYR/NF fueron prácticamente idénticos, además de presentar una sensibilidad mayor, por lo tanto, fue esta última la configuración seleccionada.

5.2.3.9. Estudio de la repetitividad los biosensores de TYR utilizando como inmovilizador Nafion® comercial

Para el estudio de la repetitividad de los sensores con Nafion® se repitió el procedimiento de los sensores anteriores. Para ello, se realizaron, mediante voltametría cíclica, cinco ciclos consecutivos utilizando un intervalo de potencial de -600 a 1200 mV.

A continuación, se presentan en la **figura 59** los resultados para la configuración en la que se ha depositado la enzima TYR sin inmovilizador enzimático y aquellas configuraciones en las que se ha inmovilizado con Nafion® comercial (AgNWs/NF/TYR y AgNWs/TYR/NF).

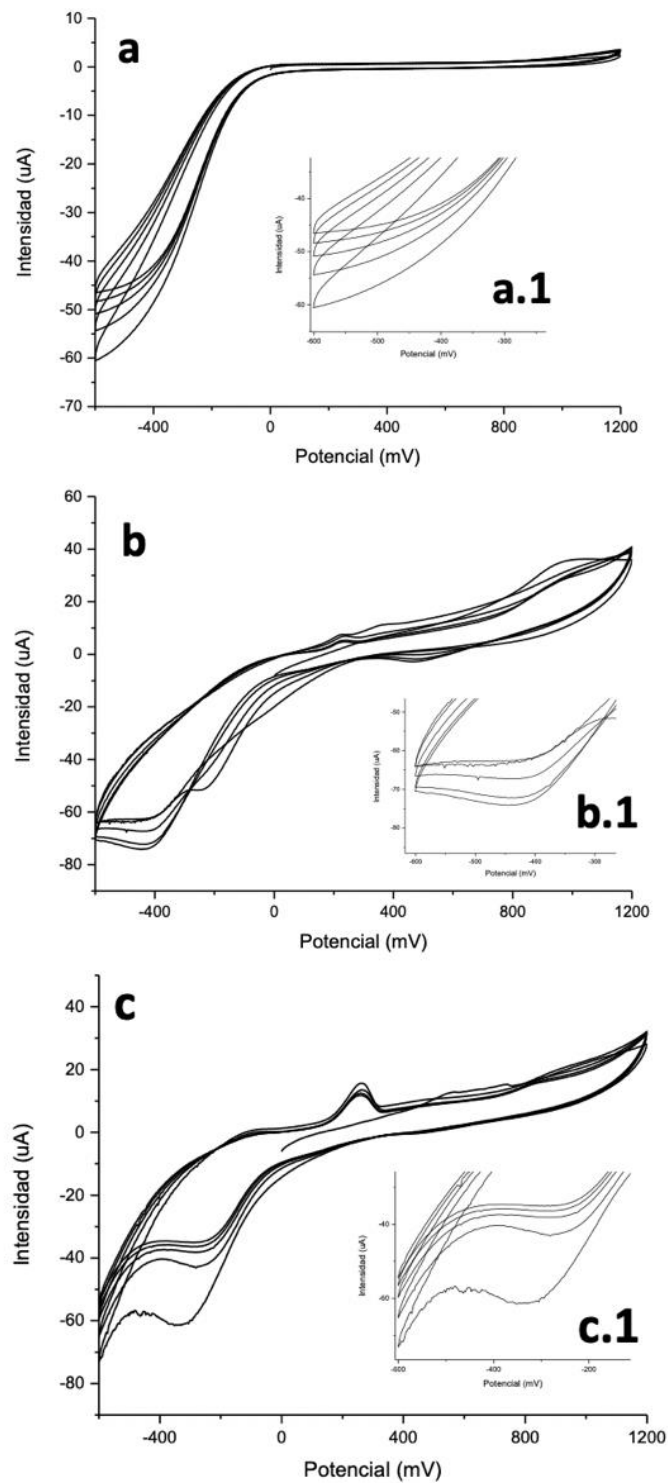


Figura 59. Estudio de la repetitividad de los sensores con la enzima TYR: a) configuración AgNWs/TYR; a.1) detalle del pico catódico; b) configuración AgNWs/NF/TYR; b.1) detalle del pico catódico; c) configuración AgNWs/TYR/NF; c.1) detalle del pico catódico.

Como se puede observar en la **figura 59**, para cada una de las configuraciones se representaron los voltamogramas de cinco ciclos consecutivos. En la **tabla 7**, se

recogen los valores de las intensidades del pico catódico para las tres configuraciones con TYR.

Tabla 7. Intensidad del pico catódico para los cuatro últimos ciclos de las configuraciones con Nafion®.

Ciclo\Configuración	AgNWs/TYR	AgNWs/NF/TYR	AgNWs/TYR/NF
2	-51,9	-72,1	-41,2
3	-48,9	-67,1	-38,6
4	-46,8	-62,8	-36,5
5	-45,3	-62,4	-35,1

En las **figuras 59 (b) y 59 (c)**, se comprobó que el primer ciclo de las dos configuraciones presentó una mayor intensidad, que se desvía del resto de ciclos (-74 μ A para la configuración AgNWs/NF/TYR y -61,2 μ A para la configuración AgNWs/TYR/NF). Sin embargo, los cuatro ciclos posteriores, presentaron unas intensidades similares, como se indicó en la **tabla 7**. Si se tuviesen en cuenta solo los cuatro ciclos, los coeficientes de variación serían los mostrados en la **tabla 8**.

Tabla 8. Cálculo del coeficiente de variación para las configuraciones con TYR y Nafion®.

Configuración	AgNWs/TYR	AgNWs/NF/TYR	AgNWs/TYR/NF
CV (%)	9,5	6,9	7

El coeficiente de variación obtenido para la configuración AgNWs/TYR es de CV = 9,5 %, como se indicó en el análisis de las configuraciones con glutaraldehído. En el caso de la configuración AgNWs/NF/TYR, el coeficiente de variación es menor que en el caso del sensor sin membrana (CV = 6,9 %), por lo que se observa una mejora de la repetitividad de estos sensores al anclar la enzima con Nafion®. Por último, en cuanto al sensor con la configuración AgNWs/TYR/NF, se puede observar un coeficiente de variación similar a la otra configuración (CV = 7 %), por lo que los resultados de repetitividad no fueron relevantes en la selección del sensor. Sin embargo, el estudio realizado en el apartado anterior sobre la reproducibilidad mostró que la configuración AgNWs/TYR/NF tuvo una mejor respuesta, por lo que es la configuración seleccionada.

Una vez hecha la selección del biosensor, se comparó la respuesta en catecol 10^{-3} M de los sensores con el fin de determinar si mejoró la respuesta ante la presencia de AgNWs y al inmovilizar la enzima con Nafion®. Los resultados se muestran a continuación en la **figura 60**.

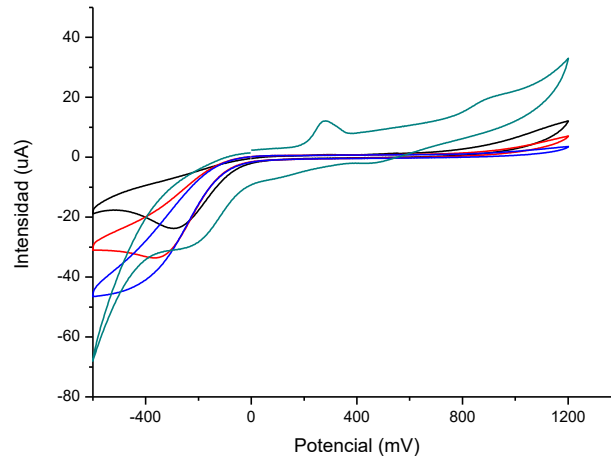


Figura 60. Respuesta voltamétrica de AgNWs(negro), TYR (rojo), AgNWs/TYR (azul) AgNWs/TYR/NF (verde) en disolución de galactosa 10^{-3} M.

En la **figura 60** se puede observar que, ante la presencia de Nafion®, el pico correspondiente a la reducción de la enzima TYR se ve desplazado de - 450 a - 240 mV con una intensidad inferior. Sin embargo, se produce un aumento notable en la zona anódica, apareciendo un pico a $11,5 \mu\text{A}$ para un potencial de 280 mV correspondiente a la oxidación del par $\text{Ag}^+/\text{Ag}^{2+}$ de los AgNWs.

5.2.3.10. Estudio de los límites de detección

Para el cálculo de los límites de detección (LOD) de los biosensores basados en AgNWs ante la presencia de analito, se realizaron ensayos mediante voltametría de diferencial de pulsos en la zona de reducción característico de las especies químicas objeto de estudio. Este estudio consistió en la utilización de una disolución de tampón fosfato 0,01 M como muestra de partida y se adicionaron cantidades idénticas de analito antes de cada medida. No se utilizó agitación durante la recogida de los datos para esta experiencia dado que alteraba la respuesta de las configuraciones seleccionadas de los sensores, por lo que se esperó cinco minutos entre la adición y el inicio de la medida para que difundiese el analito a la disolución con ayuda de agitación.

Para hallar el LOD se analizó la intensidad de corriente del pico correspondiente obtenida y se representó la regresión entre dicha intensidad y la concentración de analito en la disolución patrón objeto de estudio. Además, la desviación típica se

calculó tomando tres medidas en tampón fosfato 0,01 M para cada uno de los biosensores desarrollados.

Límite de detección para los biosensores de GaOx en galactosa

Se evaluó la intensidad del pico catódico para los sensores con la enzima GaOx inmovilizada, partiendo de un volumen de 50 mL de tampón fosfato 0,01 M y, a continuación, adicionando 500 μ L de galactosa 10^{-3} M en cada medida.

En las **figuras 61** y **62** se representan la respuesta voltamétrica del sensor con la configuración AgNWs/GaOx/GLU tras cada una de las adiciones (con su correspondiente concentración de galactosa en disolución en μ M) y la recta de calibrado obtenida al representar la concentración de analito en disolución frente a la intensidad del pico, respectivamente. Se obtuvo un coeficiente de regresión del 99,53 %.

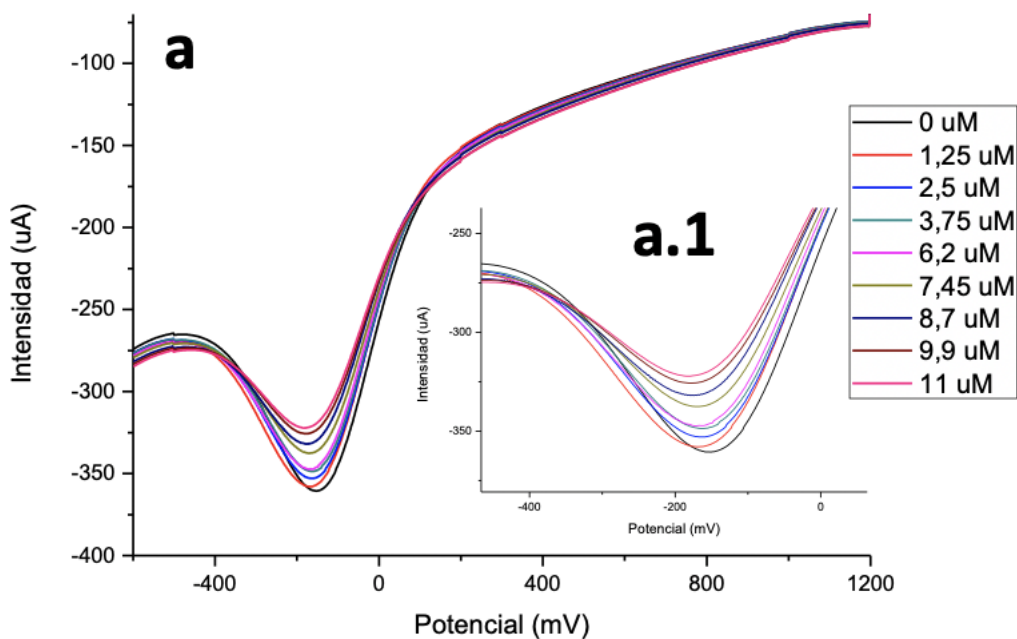


Figura 61. a) Respuesta de la voltametría diferencial de pulsos para la configuración AgNWs/GaOx/GLU ante adiciones de galactosa 10^{-3} M; a.1) detalle del pico catódico.

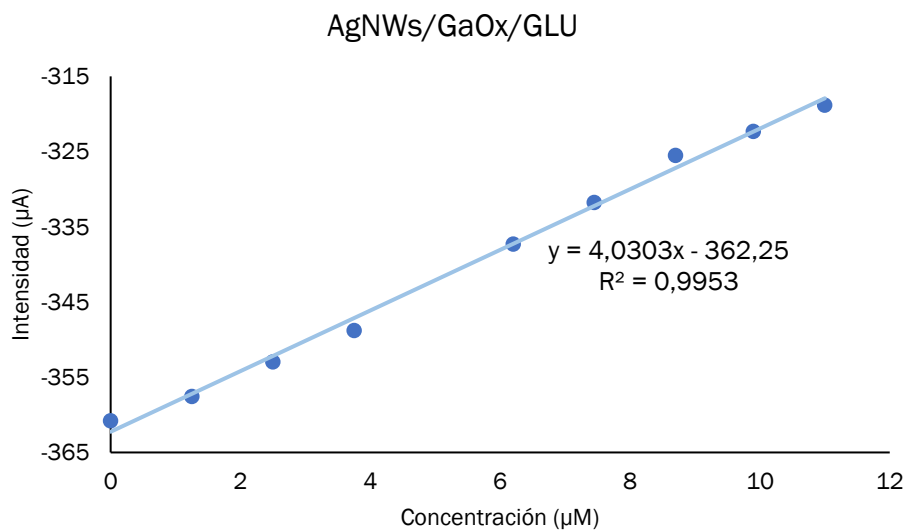


Figura 62. Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de galactosa en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/GaOx/GLU.

Para realizar el cálculo del límite de detección, se utilizó la **ecuación 18**, obteniéndose $\text{LOD (galactosa)} = 1,97 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

En el caso de la configuración AgNWs/GaOx/NF, se procedió de manera idéntica al caso anterior, estudiando también el pico catódico. Los resultados obtenidos mediante voltametría de pulso diferencial se muestran a continuación, en la **figura 63**.

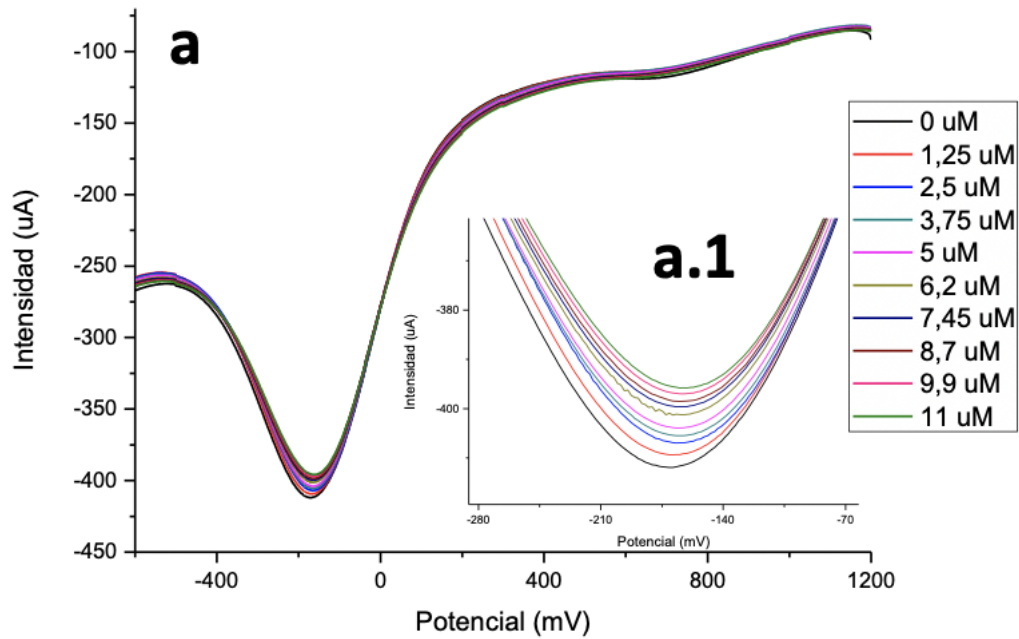


Figura 63. a) Respuesta de la voltametría diferencia de pulsos para la configuración AgNWs/GaOx/NF ante adiciones de galactosa 10^{-3} M; a.1) detalle del pico catódico.

La regresión lineal para la intensidad del pico catódico se muestra en la figura 64, donde se obtuvo un coeficiente de regresión que se ajustó en un 99,15 % a la linealidad.

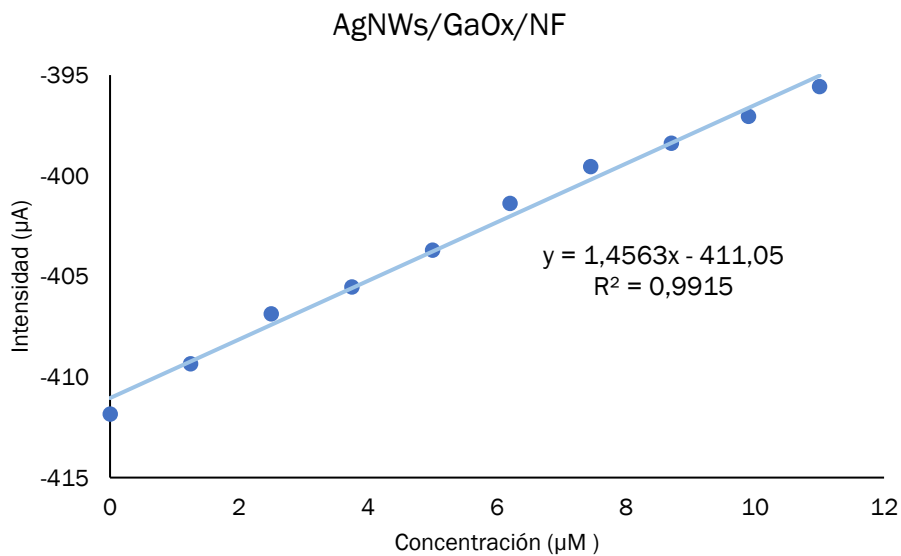


Figura 64. Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de galactosa en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/GaOx/NF.

El LOD obtenido en este caso fue LOD (galactosa) = $9,24 \cdot 10^{-6}$ M.

Límite de detección para los biosensores de TYR en catecol

En el caso de las configuraciones de los sensores utilizando la enzima TYR, se analizó el pico catódico, tras realizar adiciones de 500 μ L de catecol 10^{-3} M a un volumen inicial de 50 mL de tampón fosfato 0,01 M.

La respuesta voltamétrica del sensor AgNWs/TYR/GLU se observa en la **figura 65**.

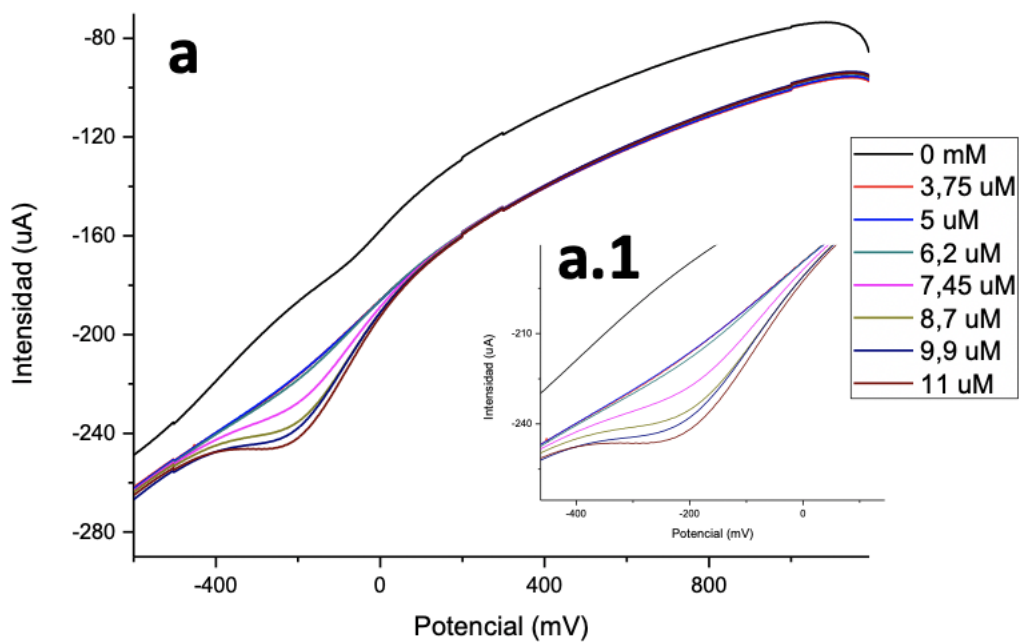


Figura 65. a) Respuesta de la voltametría diferencial de pulsos para la configuración AgNWs/TYR/GLU ante adiciones de catecol 10^{-3} M; a.1) detalle del pico catódico.

La intensidad de la señal frente a la concentración de catecol se muestra en la **figura 66**. Donde la señal se ajusta en un 93,37 % a una línea recta.

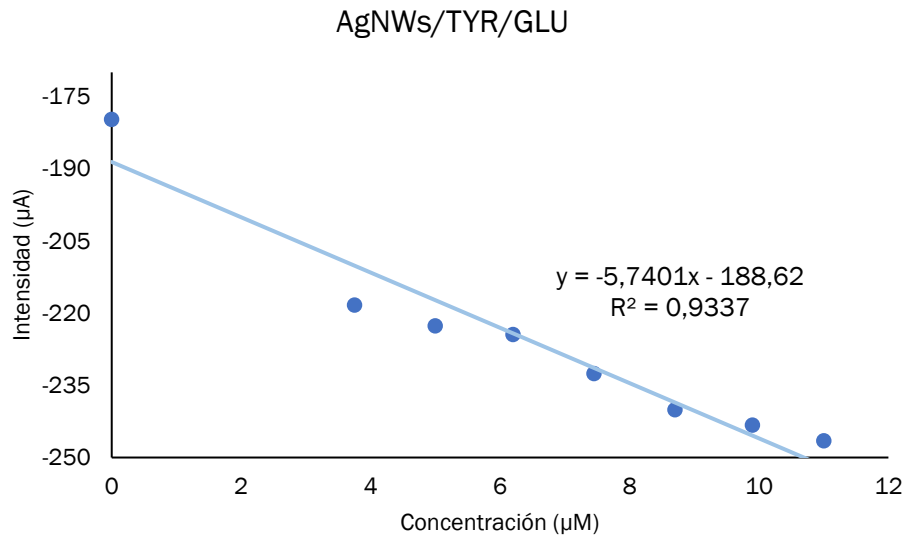


Figura 66. Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de catecol en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/TYR/GLU.

Para el estudio del LOD del sensor en catecol, se utilizó la **ecuación 18** como en los casos anteriores. El resultado en este caso fue LOD (catecol) = $6,69 \cdot 10^{-7}$ M.

Por último, la configuración AgNWs/TYR/NF, presentó la respuesta voltamétrica que se ve en la **figura 67**.

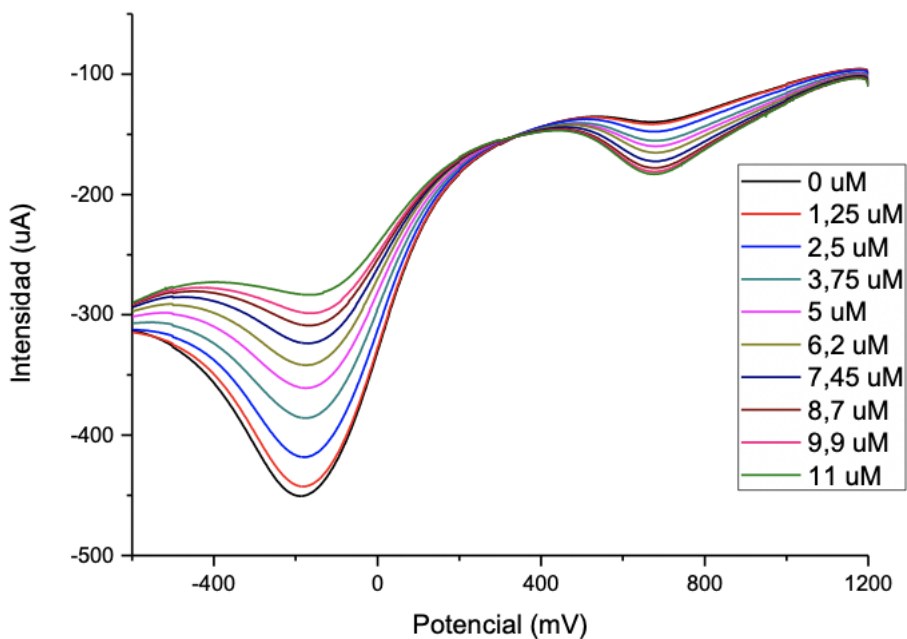


Figura 67. Respuesta de la voltametría diferencial de pulsos para la configuración AgNWs/TYR/NF ante adiciones de catecol 10^{-3} M.

La representación de la intensidad del pico catódico a -200 mV frente a la concentración de catecol en disolución se muestra en la **figura 68**. El coeficiente de regresión en este caso fue del 98,31 %.

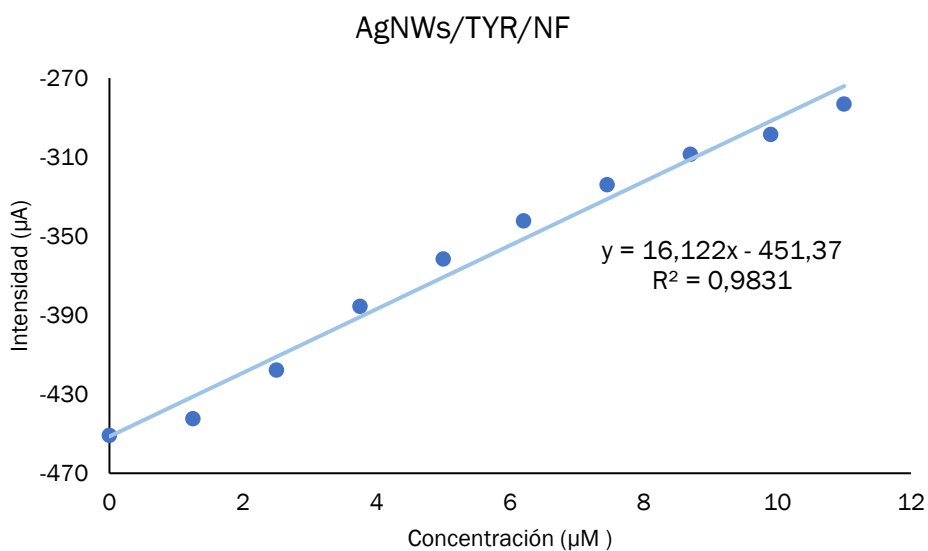


Figura 68. Regresión lineal de la intensidad del pico catódico frente a la concentración de catecol en la disolución tras las adiciones para el sensor AgNWs/TYR/NF.

El límite de detección calculado en catecol fue $\text{LOD (catecol)} = 1,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

En las **tablas 9 y 10** se resumen los datos recogidos de la voltimetría diferencial de pulsos para las cuatro configuraciones de los sensores seleccionadas.

Tabla 9. Resumen de datos de las configuraciones con GaOx.

Configuración	AgNWs/GaOx/GLU	AgNWs/GaOx/NF
R ² (%)	99,53	99,15
LOD (M)	$1,97 \cdot 10^{-6}$	$9,24 \cdot 10^{-6}$
Sensibilidad ($\mu\text{A}/\mu\text{M}$)	4,03	1,46

Tabla 10. Resumen de datos de las configuraciones con TYR.

Configuración	AgNWs/TYR/GLU	AgNWs/TYR/NF
R ² (%)	93,37	98,31
LOD (M)	$6,69 \cdot 10^{-7}$	$1,15 \cdot 10^{-6}$
Sensibilidad ($\mu\text{A}/\mu\text{M}$)	5,74	16,12

Analizando los resultados obtenidos en la **tabla 9**, se pudo comprobar que la sensibilidad, asociada al límite de detección de los sensores con GaOx, aumenta para las configuraciones utilizando glutaraldehído como inmovilizador enzimático sobre la disolución patrón de galactosa. Además, la regresión lineal se ajusta mejor a una recta, con un coeficiente de regresión del 99,53 % frente al 99,15 % de la configuración con Nafion®. Si se comparan las pendientes de las rectas de ambas configuraciones puede verse que la sensibilidad es mayor en el caso de la configuración con glutaraldehído. Por lo que se puede concluir que la configuración AgNWs/GaOx/GLU es la que mayor sensibilidad presenta.

En el caso de los sensores en los que se inmovilizó la enzima TYR, la **tabla 10** muestra cómo el biosensor con glutaraldehído presenta un mejor límite de detección frente a la configuración con Nafion®. Sin embargo, la pendiente de la recta y el coeficiente de regresión son mejores para la configuración con la membrana. En este caso la configuración seleccionada por su sensibilidad es la de AgNWs/TYR/NF.

5.2.3.11. Estudio cinético de los sensores

Otro de los objetivos de este trabajo fue el estudio del proceso de transferencia de los electrones y el comportamiento de los biosensores a diferentes velocidades. Para ello, se realizaron barridos en el intervalo de potencial de - 600 a 1200 mV a los biosensores en una disolución del analito correspondiente. Con las **ecuaciones 12** y **16** se pudo comprobar qué mecanismo controla la reacción en cada una de las configuraciones estudiadas. Además, se calculó para cada uno de los biosensores, el número de sitios activos que posee la enzima para catalizar las reacciones que tienen lugar con la **ecuación 17**. El número de electrones que se transfieren en las disoluciones patrón de galactosa y catecol durante el proceso redox es dos en ambos casos [175, 176].

En la **figura 69**, se muestran los resultados obtenidos para la configuración seleccionada AgNWs/GaOx/GLU en una disolución de galactosa 10^{-3} M en tampón fosfato 0,01 M a pH 7, empleando las velocidades de barrido de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mV/s.

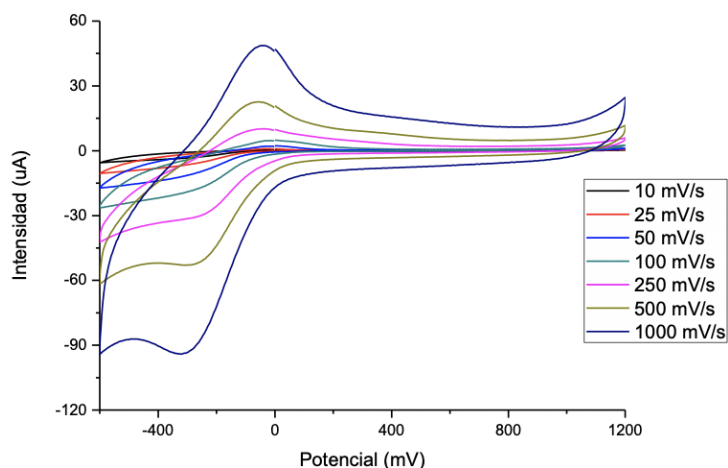


Figura 69. Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/GaOx/GLU en una disolución de galactosa 10^{-3} M.

A continuación, se recogieron los datos de intensidad de la señal, correspondientes al pico catódico mostrado para cada una de las velocidades empleadas en las mediciones con el propósito de comprobar el mecanismo que limita el proceso redox. Se graficaron estos resultados, obteniendo la regresión lineal que se observa en la **figura 70**.

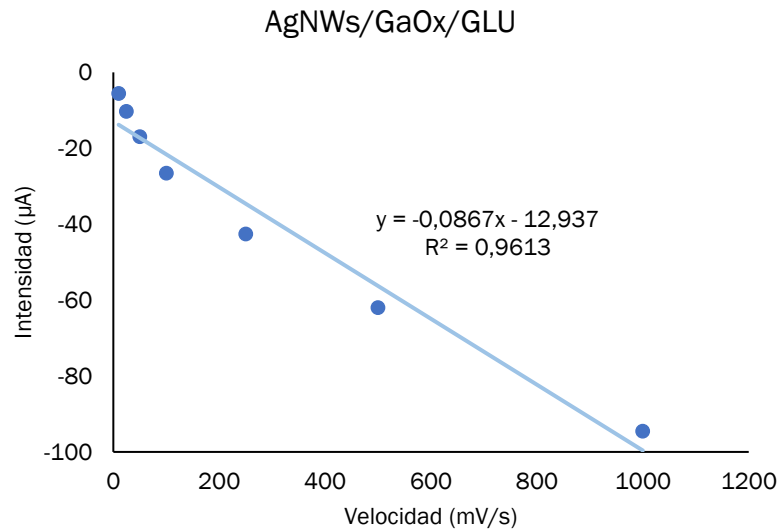


Figura 70. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/GLU para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido.

Con la pendiente de la recta representada en la **figura 70** se pudo determinar el número de sitios activos de la GaOx, que en esta configuración fue de $2,31 \cdot 10^{-8}$ mol/cm².

En la **figura 70**, se obtuvo un coeficiente de regresión lineal del 96,13 %, por lo que se realizó el mismo estudio, esta vez analizando la intensidad de la señal del pico catódico frente a la raíz cuadrada de la velocidad. Los resultados se muestran en la **figura 71**.

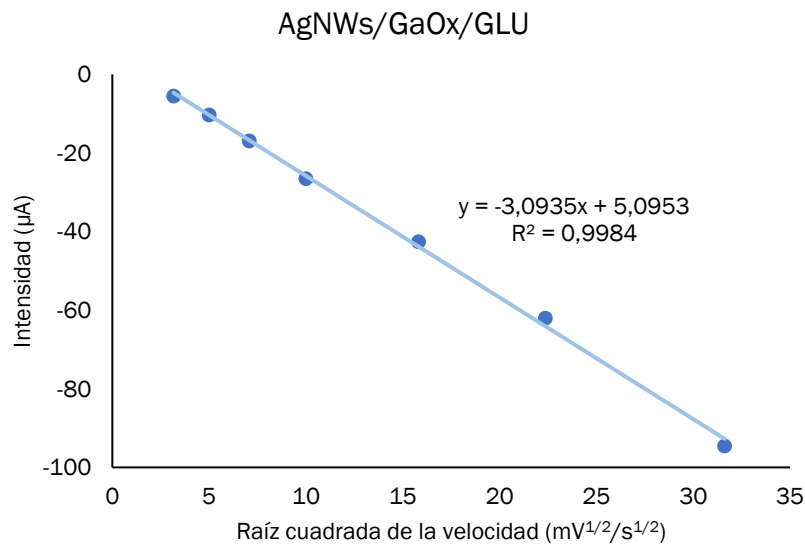


Figura 71. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/GLU para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Dado que se obtuvo una recta con un coeficiente de regresión de 99,84 % (**figura 71**), se puede afirmar que el mecanismo controlante del proceso es la difusión de iones desde la disolución de galactosa hacia electrodo.

Para la configuración AgNWs/GaOx/NF, procediendo del mismo modo, se obtuvieron los resultados mostrados en la **figura 72** para las mismas velocidades de barrido en disolución patrón de galactosa 10^{-3} M.

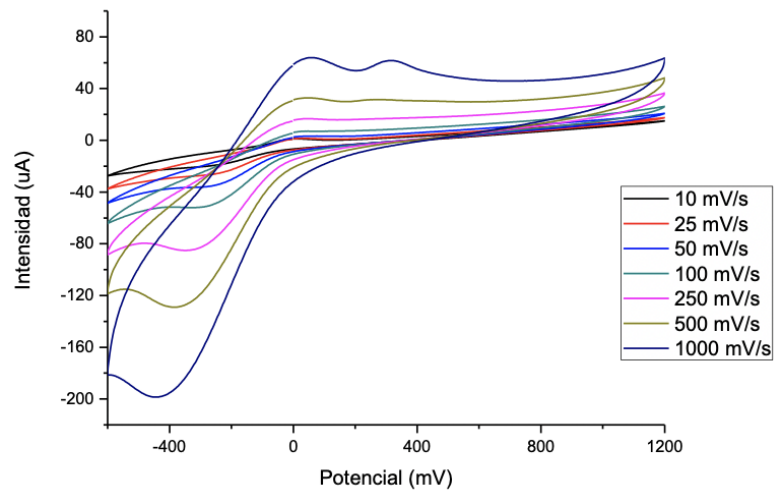


Figura 72. Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/GaOx/NF en una disolución de galactosa 10^{-3} M.

A continuación, se representaron los datos de la intensidad del pico catódico frente a la velocidad y frente a su raíz cuadrada. Los resultados se muestran en las **figuras 73 y 74**.

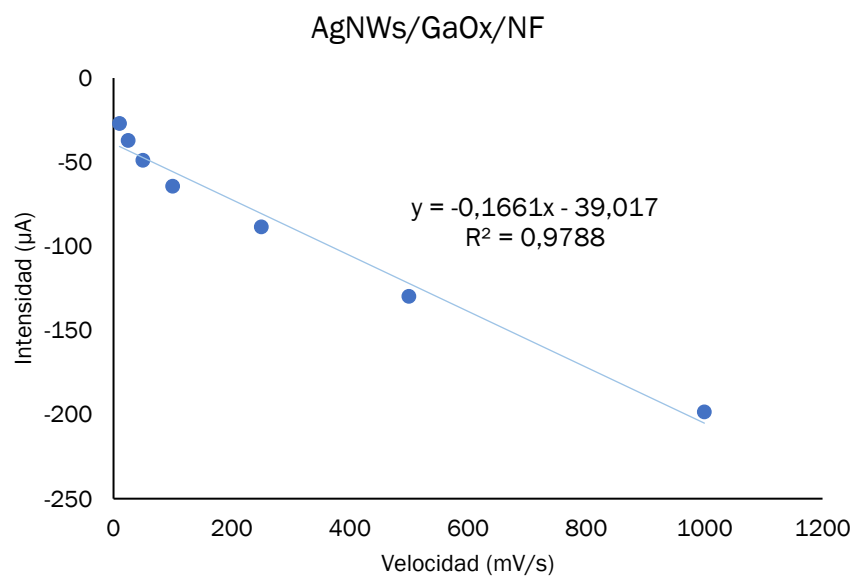


Figura 73. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/NF para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido.

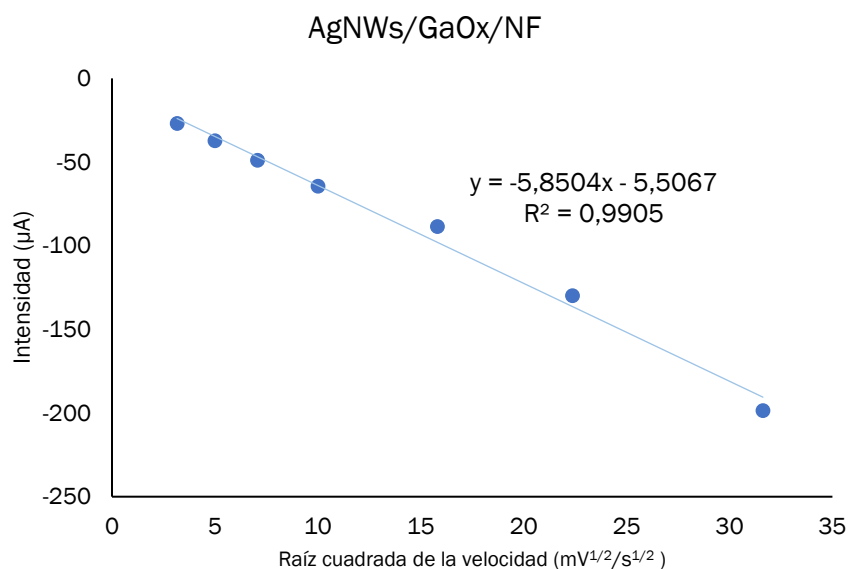


Figura 74. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/GaOx/NF para el análisis de galactosa 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

En la **figura 73**, se obtuvo un coeficiente de regresión del 97,88 %, mientras que en la **figura 74** los datos se ajustan a una recta con un coeficiente de regresión del 99,05 %. Por tanto, los resultados obtenidos muestran evidencias de que el proceso redox está controlado por la difusión de iones desde el seno de la disolución al electrodo de trabajo. En esta configuración se estimó que el número de sitios activos es de $4,42 \cdot 10^{-8}$ mol/cm².

Se realizó el mismo procedimiento para los sensores con las dos configuraciones seleccionadas para la enzima TYR, utilizando en esta ocasión una disolución de catecol 10^{-3} M.

En la **figura 75** se observa la respuesta voltamétrica de la configuración AgNWs/TYR/GLU para las diferentes velocidades de barrido.

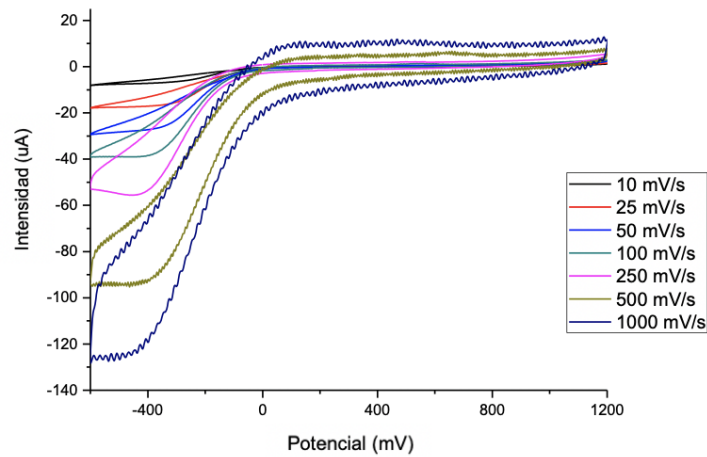


Figura 75. Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/TYR/GLU en una disolución de catecol 10^{-3} M.

A continuación, se representaron los datos de la intensidad del pico catódico frente a la velocidad y frente a su raíz cuadrada. Los resultados se muestran en las **figuras 76 y 77**.

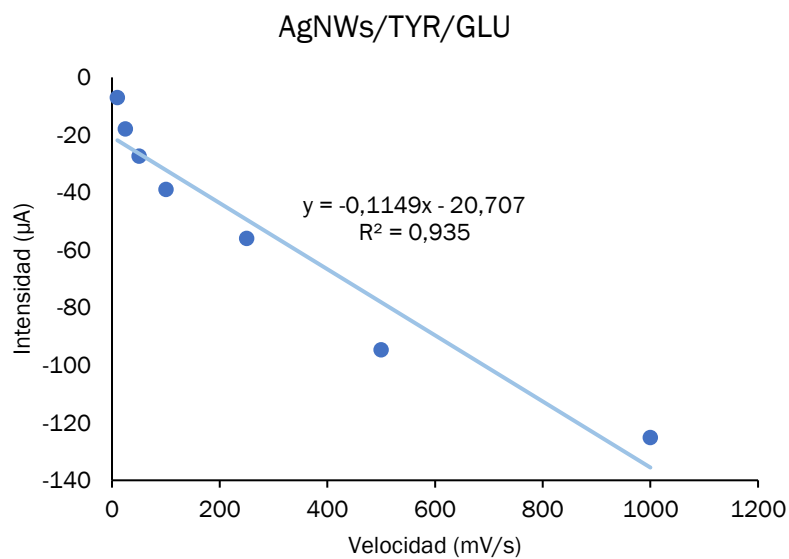


Figura 76. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/GLU para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido.

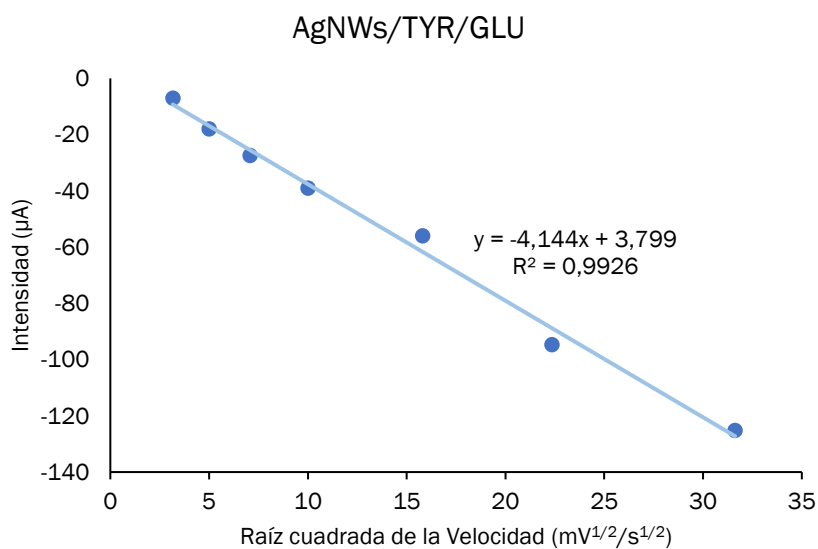


Figura 77. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/GLU para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Como se puede ver en la **figura 76**, la regresión se ajusta a la linealidad en un 93,50 %, sin embargo, en la **figura 77** se pudo comprobar que la regresión se ajusta a una línea recta en un 99,26 %, por lo que el mecanismo que controla el proceso es la difusión de iones. El número de sitios activos para la TYR en esta configuración fue de $3,06 \cdot 10^{-8}$ mol/cm².

Por último, se representó, en la **figura 78**, el voltamograma correspondiente al estudio cinético de la configuración AgNWs/TYR/NF en disolución de catecol 10^{-3} M.

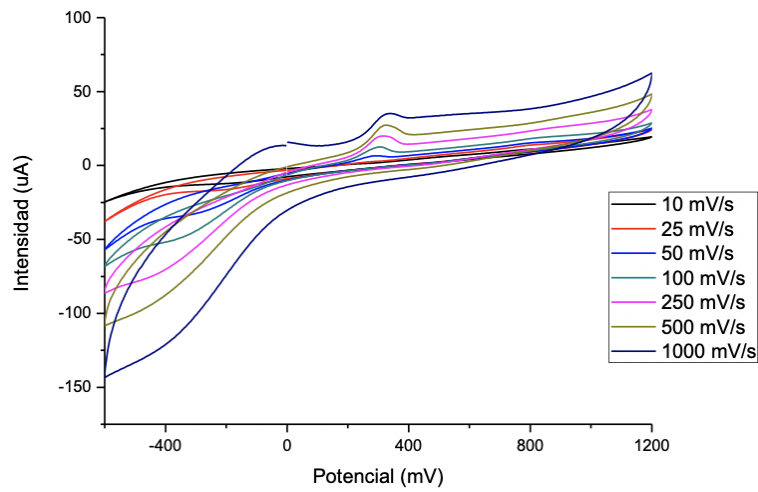


Figura 78. Voltamograma de las diferentes velocidades de barrido para la configuración AgNWs/TYR/NF en una disolución de catecol 10^{-3} M.

Al igual que en las configuraciones anteriores se representó la intensidad del pico catódico frente a la velocidad de barrido y frente a su raíz cuadrada, obteniendo las figuras 79 y 80.

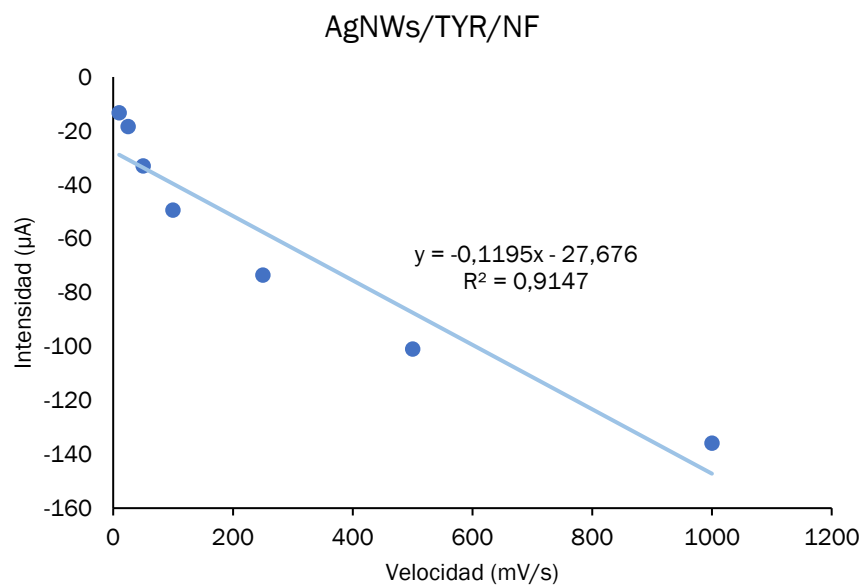


Figura 79. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/NF para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la velocidad de barrido.

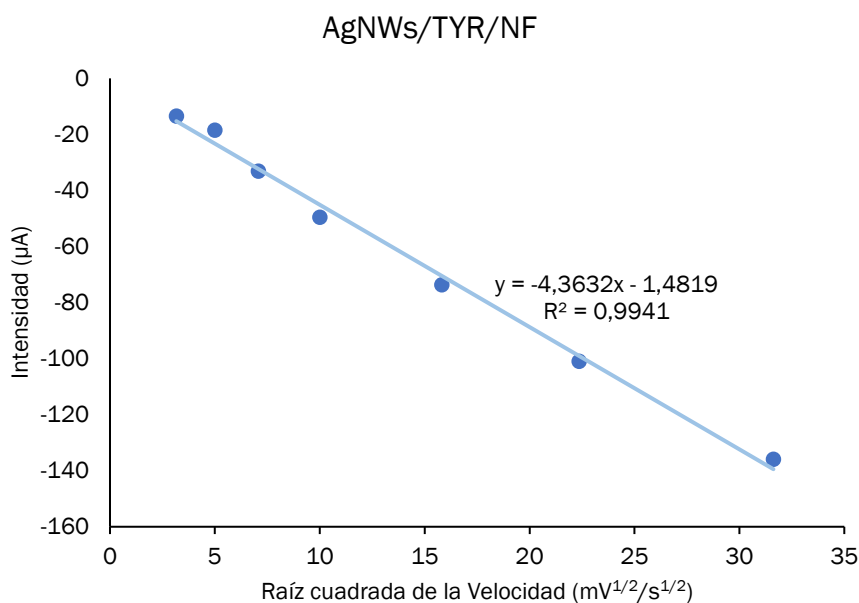


Figura 80. Intensidad de la señal de la configuración AgNWs/TYR/NF para el análisis de catecol 10^{-3} M frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

En la **figura 79**, se obtuvo un coeficiente de regresión del 91,47 %, mientras que en la **figura 80** los datos se ajustan a una recta con un coeficiente de regresión del 99,41 %. Por tanto, los resultados obtenidos muestran evidencias de que el proceso redox está controlado por la difusión de iones desde el seno de la disolución al electrodo de trabajo. El número de sitios activos de la enzima se estimó de $3,18 \cdot 10^{-8}$ mol/cm².

En la **tabla 11** se resumen los datos obtenidos del estudio de la cinética para las cuatro configuraciones seleccionadas.

Tabla 11. Resumen de datos de la cinética para las configuraciones seleccionadas.

Configuración	R ² (%)	Mecanismo de control del proceso	Número de sitios activos, Γ (mol/cm ²)
AgNWs/GaOx/GLU	99,84	Difusión	$2,31 \cdot 10^{-8}$
AgNWs/GaOx/NF	99,05	Difusión	$4,42 \cdot 10^{-8}$
AgNWs/TYR/GLU	99,26	Difusión	$3,06 \cdot 10^{-8}$
AgNWs/TYR/NF	99,41	Difusión	$3,18 \cdot 10^{-8}$



Con los resultados obtenidos, se pudo comprobar que el mecanismo que controla el proceso redox, que tiene lugar para cada una de las configuraciones seleccionadas, se corresponde con la difusión de iones desde la matriz de la disolución patrón hacia la superficie del electrodo de trabajo. De las configuraciones con GaOx, la que mayor linealidad presentó fue AgNWs/GaOx/GLU mientras que, en las configuraciones con TYR, el coeficiente de regresión fue mayor en el caso del sensor AgNWs/TYR/NF. Además, estas dos configuraciones fueron seleccionadas en apartados anteriores por presentar una mayor sensibilidad y reproducibilidad respecto a los otros dos sensores, con lo que se corrobora su buen funcionamiento.

En cuanto al número de sitios activos, fueron las configuraciones con Nafion® comercial las que presentaron un aumento en el número de sitios activos tanto para la enzima GaOx como para la TYR.



VI. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid

6. Conclusiones y trabajo futuro

En el desarrollo de este proyecto se obtuvieron las conclusiones que se describen a continuación:

- Se desarrollaron biosensores nanoestructurados a partir de AgNWs, depositados mediante spin coating sobre un sustrato ITO y posteriormente, inmovilizando las enzimas GaOx y TYR sobre dicha película. Se demostró que la presencia de AgNWs como mediador electrónico mejoró la respuesta de los sensores ante la presencia de los analitos galactosa y catecol, respectivamente. Por lo que se pudo afirmar, que estas configuraciones generan sensores de calidad.
- Se desarrollaron biosensores utilizando cross-linking con glutaraldehído como una de las técnicas de inmovilización de las enzimas o bien, utilizando una membrana hidrofóbica como es el Nafion[®], que debido a su estructura porosa permite que los cationes se muevan fácilmente en su interior. El uso de Nafion[®] como membrana selectiva para inmovilizar las enzimas condujo a una detección de los analitos sin interferencias.
- El glutaraldehído y el Nafion[®] como inmovilizadores enzimáticos, mejoran la adhesión de las enzimas, ya que, al realizar un estudio comparativo entre los biosensores, pudo comprobarse que, sin ayuda de estos compuestos, la enzima se perdía mayoritariamente en la disolución, disminuyendo la intensidad de los picos notablemente, de un ciclo al siguiente.
- Los biosensores desarrollados han demostrado tener un correcto comportamiento electroquímico frente a los analitos estudiados, por lo que se podrían utilizar para otros compuestos de características similares presentes en leches o vinos.
- Se demostró que la preparación de los sensores nanoestructurados utilizando AgNWs, poseen una alta reproducibilidad y sensibilidad ante la presencia de los analitos de interés.
- Se demostró que la presencia de Nafion[®] como última capa en los biosensores para la detección de catecol y galactosa mostró unos LOD de $1,15 \cdot 10^{-6}$ y $9,24 \cdot 10^{-6}$ M, respectivamente; mientras que para la reticulación enzimática con glutaraldehído los LOD obtenidos fueron $6,69 \cdot 10^{-7}$ y $1,97 \cdot 10^{-6}$, respectivamente. Esto demuestra la diferente interacción de los analitos con la enzima en función del agente reticulante empleado.

- Se comprobó que el comportamiento cinético de los biosensores con las configuraciones utilizando GaOx y TYR, se rige por la difusión de iones de la disolución hacia la superficie del electrodo de trabajo.
- Los resultados obtenidos para los biosensores auguran una prometedora implementación en la Industria alimentaria, realizando de una forma más rápida y eficiente controles de calidad de compuestos fenólicos y azúcares, de multitud de productos, como es el caso de leches y vinos.

En cuanto a las posibles investigaciones futuras de este sector, se pueden incluir las siguientes:

- Mejoras en la inmovilización enzimática de los sensores desarrollados con AgNWs, para obtener mayor reproducibilidad, repetitividad y disminuir los límites de detección.
- Desarrollar los sensores sobre diferentes sustratos, que mejoren el comportamiento electroquímico de los mismos, como sustrato de diamante, papel de carbono o placas de platino.
- Modificar los sensores utilizando otros inmovilizadores enzimáticos, como el chitosán, que se ha utilizado para numerosos sensores nanoestructurados en trabajos previos.
- Aplicar estos biosensores en el análisis de muestras de leches, vinos y mostos para discriminarlas por su contenido, en función de marcas, tiempo del producto, etc.
- Realizar un estudio de los interferentes para demostrar la selectividad de los sensores.
- Realizar un estudio de la morfología de los sensores mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).



VII. BIBLIOGRAFÍA



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



7. Bibliografía

- [1] D. E. Berkowitz, M. Malagíe, G. Jensen, and J. C. Graham, “Vol. III. Capítulo 67. Industria alimentaria,” in *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, 3ª edición., B. Chantal Dufresne, Ed. 2001, pp. 67.1-67.32.
- [2] “Gobierno de España, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación @ www.mapa.gob.es.” [Online]. Available: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/marco-estrategico/>. [Accessed: 25-Jun-2019].
- [3] J. de C. y León, “La industria agroalimentaria en Castilla y León.” [Online]. Available: http://www.jcyl.es/web/jcyl/AgriculturaGanaderia/es/Plantilla100Detalle/1284250174899/_/1284252974154/Redaccion. [Accessed: 25-Jun-2019].
- [4] A. Luque, M. E. Peralta, A. de las Heras, and A. Córdoba, “State of the Industry 4.0 in the Andalusian food sector,” *Procedia Manuf.*, vol. 13, pp. 1199–1205, 2017.
- [5] E. de I. I. Universidad de Valladolid, “SensorGroup UVa.” [Online]. Available: <http://www.eis.uva.es/inorganica/index.php/component/content/article/73-grupo-uvasens>. [Accessed: 25-Jun-2020].
- [6] D. Sun-Waterhouse and G. I. N. Waterhouse, “Recent advances in the application of nanomaterials and nanotechnology in food research,” in *Novel Approaches of Nanotechnology in Food*, Elsevier Inc., 2016, pp. 21–66.
- [7] M. Rossi *et al.*, *Nanotechnology for Food Packaging and Food Quality Assessment*, 1st ed., vol. 82. Elsevier Inc., 2017.
- [8] V. D. Krishna, K. Wu, D. Su, M. C. J. Cheeran, J. P. Wang, and A. Perez, “Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety,” *Food Microbiol.*, vol. 75, pp. 47–54, 2018.
- [9] C. Karunakaran, R. Rajkumar, and K. Bhargava, “Introduction to Biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, no. June, pp. 1–68, 2015.
- [10] C. Adley, “Past, Present and Future of Sensors in Food Production,” *Foods*, vol. 3, no. 3, pp. 491–510, 2014.
- [11] F. R. Simões and M. G. Xavier, *6 - Electrochemical Sensors*. Elsevier Inc., 2017.
- [12] J. E. Pearson, A. Gill, and P. Vadgama, “Analytical aspects of biosensors,” *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 37, no. 2, pp. 119–145, 2000.
- [13] A. Sadana, *Engineering Biosensors*. 2002.

- [14] E. Cortón, “Development and Applications of Enzymatic and Microbial Biosensors,” 2000.
- [15] M. I. Pividori, “Química Bioanalítica. Objetivos,” no. 3000, 2008.
- [16] R. Pallas, *Sensores Y Acondicionadores De Señal*. 2003.
- [17] R. PDB., “Tyrosinase.” [Online]. Available: <https://www.rcsb.org/structure/3NM8>. [Accessed: 22-Jun-2019].
- [18] M. B. González García and A. Costa García, “Los biosensores electroquímicos : herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico,” *Real Acad. Nac. Farm.*, vol. 11, pp. 197–222, 2010.
- [19] P. Parkhey and S. V. Mohan, *Biosensing Applications of Microbial Fuel Cell*. Elsevier B.V., 2019.
- [20] V. Gaudin, *Receptor-based electrochemical biosensors for the detection of contaminants in food products*. 2019.
- [21] M. Farré, L. Kantiani, S. Pérez, and D. Barceló, “Sensors and biosensors in support of EU Directives,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2009.
- [22] A. Walcarius, M. Etienne, G. Herzog, V. Urbanova, and N. Vilà, “Electrode Materials (Bulk Materials and Modification),” in *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors. Vol. 1 Fundamentals.*, 1st. editi., K. Moretto, LM. Kalcher, Ed. Springer, 2014, pp. 403–495.
- [23] S. Hrapovic and J. H. T. Luong, “Picoamperometric detection of glucose at ultrasmall platinum-based biosensors: Preparation and characterization,” *Anal. Chem.*, 2003.
- [24] Z. Yang *et al.*, “High specific surface gold electrode on polystyrene substrate: Characterization and application as DNA biosensor,” *Talanta*, 2016.
- [25] S. H. Choi, Y. L. Kim, and K. M. Byun, “Graphene-on-silver substrates for sensitive surface plasmon resonance imaging biosensors,” *Opt. Express*, 2011.
- [26] M. Vidotti, R. F. Carvalhal, R. K. Mendes, D. C. M. Ferreira, and L. T. Kubota, “Biosensors based on gold nanostructures,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011.
- [27] N. German, A. Ramanaviciene, J. Voronovic, and A. Ramanavicius, “Glucose biosensor based on graphite electrodes modified with glucose oxidase and colloidal gold nanoparticles,” *Microchim. Acta*, 2010.



- [28] J. H. Kim, S. Cho, T. S. Bae, and Y. S. Lee, "Enzyme biosensor based on an N-doped activated carbon fiber electrode prepared by a thermal solid-state reaction," *Sensors Actuators, B Chem.*, 2014.
- [29] W. Tang, L. Li, L. Wu, J. Gong, and X. Zeng, "Glucose biosensor based on a glassy carbon electrode modified with polythionine and multiwalled carbon nanotubes," *PLoS One*, 2014.
- [30] Y. Yu, Y. Zhou, L. Wu, and J. Zhi, "Electrochemical Biosensor Based on Boron-Doped Diamond Electrodes with Modified Surfaces," *Int. J. Electrochem.*, 2012.
- [31] M. A. Rahman, P. Kumar, D. S. Park, and Y. B. Shim, "Electrochemical sensors based on organic conjugated polymers," *Sensors*. 2008.
- [32] D. Centonze, I. Losito, C. Malitesta, F. Palmisano, and P. G. Zambonin, "Electrochemical immobilisation of enzymes on conducting organic salt electrodes: Characterisation of an oxygen independent and interference-free glucose biosensor," *J. Electroanal. Chem.*, 1997.
- [33] A. A., M. Alhoshan, M. S. Alsalhi, and A. S. Aldwayy, "Nanostructured Metal Oxides Based Enzymatic Electrochemical Biosensors," in *Biosensors*, 2010.
- [34] Z. Xu, X. Chen, and S. Dong, "Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2006.
- [35] L. D. Mello and L. T. Kubota, "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries," *Food Chemistry*. 2002.
- [36] M. Z. H. Khan, "Nanoparticles Modified ITO Based Biosensor," *J. Electron. Mater.*, vol. 46, no. 4, pp. 2254–2268, 2017.
- [37] E. B. Aydın and M. K. Sezgintürk, "Indium tin oxide (ITO): A promising material in biosensing technology," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017.
- [38] H. Tang *et al.*, "A new amperometric method for rapid detection of *Escherichia coli* density using a self-assembled monolayer-based bienzyme biosensor," *Anal. Chim. Acta*, 2006.
- [39] G. M. Swain, "Handbook of Electrochemistry," *Handb. Electrochem.*, pp. 111–V, 2007.
- [40] M. A. Aziz, S. Park, S. Jon, and H. Yang, "Amperometric immunosensing using an indium tin oxide electrode modified with multi-walled carbon nanotube and poly(ethylene glycol)-silane copolymer," *Chem. Commun.*, 2007.
- [41] H. Akter, A. A. Shaikh, T. R. Chowdhury, M. S. Rahman, P. K. Bakshi, and A. J. S. Ahammad, "Gold nanoparticle-modified indium tin oxide electrode for highly sensitive electrochemical detection of melamine," *ECS Electrochem. Lett.*, 2013.

- [42] Q. Wu *et al.*, “Amperometric cholesterol biosensor based on zinc oxide films on a silver nanowire-graphene oxide modified electrode,” *Anal. Methods*, 2016.
- [43] C. Karunakaran, T. Madasamy, and N. K. Sethy, *Enzymatic Biosensors*. Elsevier Inc., 2015.
- [44] P. K. Robinson, “Correction: Enzymes: principles and biotechnological applications,” *Essays Biochem.*, vol. 59, no. 0, pp. 75–75, 2015.
- [45] J. F. Wong, C. A. Simmons, and E. W. K. Young, *Modeling and Measurement of Biomolecular Transport and Sensing in Microfluidic Cell Culture and Analysis Systems*, 1st ed. Elsevier Inc., 2017.
- [46] G. B. Antonio Blanco, “Enzymes are biological catalysts,” *Med. Biochem.*, pp. 153–175, 2017.
- [47] K. Parikka, E. Master, and M. Tenkanen, “Oxidation with galactose oxidase: Multifunctional enzymatic catalysis,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 120, pp. 47–59, 2015.
- [48] R. PDB., “Galactose Oxidase.” [Online]. Available: <https://www.rcsb.org/3d-view/2JKX>. [Accessed: 21-Jun-2019].
- [49] R. Monosik, M. Stredansky, J. Tkac, and E. Sturdik, “Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages,” *Food Anal. Methods*, vol. 5, no. 1, pp. 40–53, 2012.
- [50] N. Lehninger, “Principios de Bioquímica,” *Lehninger - Principios de Bioquímica 5ed.* 2009.
- [51] E. P. L. Gasparotto, S. C. C. Abrão, S. Y. Inagaki, D. J. Tessmann, C. Kemmelmeier, and I. P. B. Tessmann, “Production and characterization of galactose oxidase produced by four isolates of *Fusarium graminearum*,” *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 49, no. 4, pp. 557–564, 2006.
- [52] F. Charmantray, N. Touisni, L. Hecquet, and C. Mousty, “Amperometric Biosensor Based on Galactose Oxidase Immobilized in Clay Matrix,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 3, pp. 630–635, 2013.
- [53] A. Messerschmidt, “Copper Metalloenzymes,” *Compr. Nat. Prod. II*, vol. 2, pp. 489–545, 2010.
- [54] J. A. COOPER, W. SMITH, M. BACILA, and H. MEDINA, “Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr.,” *J. Biol. Chem.*, 1959.
- [55] M. K. Nobles and C. Madhosingh, “*Dactylium dendroides* (Bull.) Fr. Misnamed as *Polyporus circinatus* Fr.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963.



- [56] P. Kanyong, F. D. Krampa, Y. Aniweh, and G. A. Awandare, "Enzyme-based amperometric galactose biosensors: a review," *Microchim. Acta*, vol. 184, no. 10, pp. 3663–3671, 2017.
- [57] M. Al-Ruweidi, "Literature Review on Tyrosinase Enzyme," no. December, 2017.
- [58] S. Y. Seo, V. K. Sharma, and N. Sharma, "Mushroom tyrosinase: Recent prospects," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 10, pp. 2837–2853, 2003.
- [59] T. Xing, X. li, S. Guo, R. C. Tang, J. he Cai, and S. Q. Zhou, "Preparation and properties of silk fabric grafted with ϵ -polylysine by tyrosinase," *Text. Res. J.*, vol. 85, no. 16, pp. 1743–1748, 2015.
- [60] K. U. Zaidi, A. S. Ali, and S. A. Ali, "Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom," *Enzyme Res.*, vol. 2014, 2014.
- [61] I. A. Koval, P. Gamez, C. Belle, K. Selmeczi, and J. Reedijk, "Synthetic models of the active site of catechol oxidase: Mechanistic studies," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 9, pp. 814–840, 2006.
- [62] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, and R. A. Wahab, "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes," *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 29, no. 2, pp. 205–220, 2015.
- [63] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [64] T. Tamer, A. Omer, and M. Hassan, "Methods of Enzyme Immobilization," *Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res.*, vol. 7, no. December, pp. 385–392, 2016.
- [65] L. A. Prado Barragán, J. J. Buenrostro-Figueroa, C. N. A. González, and I. Marañón, *Production, Stabilization, And Uses Of Enzymes From Fruit and Vegetable Byproducts*. Elsevier Inc., 2016.
- [66] N. U.S. National Library of Medicine, "Glutaraldehyde." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutaraldehyde>. [Accessed: 12-Mar-2019].
- [67] M. E. Nimni, D. Cheung, B. Strates, M. Kodama, and K. Sheikh, "Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement," *J. Biomed. Mater. Res.*, 1987.

- [68] J. H. Bowes and C. W. Cater, "The interaction of aldehydes with collagen," *BBA - Protein Struct.*, 1968.
- [69] H. Chen, Q. Zhang, Y. Dang, and G. Shu, "The Effect of Glutaraldehyde Cross-Linking on the Enzyme Activity of Immobilized β -Galactosidase on Chitosan Bead," vol. 5, no. 7, pp. 932–935, 2013.
- [70] J. A. Salazar-Leyva *et al.*, "Utilization of chitin and chitosan based materials for protease immobilization: Stabilization effects and applications," *Rev. Mex. Ing. Qum.*, 2014.
- [71] R. Fajardo-Ochoa, J. Osuna-Castro, C. VillaVelázquez-Mendoza, P. Escalante-Minakata, V. Ibarra-Junquera, and T. Manzanillo, "Inmovilización de células y enzimas," *Rev. Científica*, 2011.
- [72] G. B. Broun, "Chemically Aggregated Enzymes," *Methods Enzymol.*, pp. 263–280, 1976.
- [73] T. Klotzbach, M. Watt, Y. Ansari, and S. D. Minteer, "Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization," vol. 282, pp. 276–283, 2006.
- [74] C. Heitner-Wirguin, "Recent advances in perfluorinated ionomer membranes: Structure, properties and applications," *Journal of Membrane Science*. 1996.
- [75] K. A. Mauritz and R. B. Moore, "State of understanding of Nafion," *Chem. Rev.*, 2004.
- [76] R. Maalouf, H. Chebib, Y. Saïkali, O. Vittori, M. Sigaud, and N. Jaffrezic-Renault, "Amperometric and impedimetric characterization of a glutamate biosensor based on Nafion® and a methyl viologen modified glassy carbon electrode," *Biosens. Bioelectron.*, 2007.
- [77] C. M. Moore, N. L. Akers, A. D. Hill, Z. C. Johnson, and S. D. Minteer, "Immobilizing Oxidoreductase Enzymes in Surfactant and Symmetrical Ammonium Treated Nafion," *Polym. Prepr.*, 2004.
- [78] A. R. Pereira, G. C. Sedenho, J. C. P. de Souza, and F. N. Crespilho, "Advances in enzyme bioelectrochemistry," *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2018.
- [79] T. L. Klotzbach, M. Watt, Y. Ansari, and S. D. Minteer, "Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers," *J. Memb. Sci.*, vol. 311, no. 1–2, pp. 81–88, 2008.
- [80] L. Lvova, D. Kirsanov, C. Di Natale, and A. Legin, *Multisensor systems for chemical analysis: Materials and sensors*. 2013.



- [81] L. Valli, "Phthalocyanine-based Langmuir-Blodgett films as chemical sensors," *Advances in Colloid and Interface Science*. 2005.
- [82] A. Arrieta, M. L. Rodriguez-Mendez, and J. A. De Saja, "Langmuir-Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste," in *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2003.
- [83] S. Kudaibergenov, G. Tatykhanova, N. Bakranov, and R. Tursunova, "Layer-by-Layer Thin Films and Coatings Containing Metal Nanoparticles in Catalysis," in *Thin Film Processes - Artifacts on Surface Phenomena and Technological Facets*, 2017.
- [84] V. Erokhin, M. K. Ram, and Ö. Yavuz, "Chapter 1 - Layer-by-Layer assembly," in *The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology*, 2008, pp. 1-44.
- [85] R. Colorado and T. R. Lee, "Thiol-based Self-assembled Monolayers: Formation and Organization," in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 2001.
- [86] Y. Liu *et al.*, "Controllable fabrication of oriented micro/nanowire arrays of dibenzo-tetrathiafulvalene by a multiple drop-casting method," *Nanoscale*, vol. 6, no. 3, pp. 1323-1328, 2014.
- [87] A.S.H.Makhlouf, *Nanocoatings and Ultra-Thin Films. Technologies and Applications*. 2011.
- [88] M.G.Buonomenna, *Smart Composite Coatings and Membranes*. 2016.
- [89] N.-T. Nguyen, *Micromixers. Fundamentals, Design and Fabrication (Second Edition)*. 2012.
- [90] X. Luo, A. Morrin, A. J. Killard, and M. R. Smyth, "Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors," *Electroanalysis*. 2006.
- [91] Y. Liu and M. Liu, "Growth of aligned square-shaped SnO₂ tube arrays," *Adv. Funct. Mater.*, 2005.
- [92] C. Wang, X. Chu, and M. Wu, "Detection of H₂S down to ppb levels at room temperature using sensors based on ZnO nanorods," *Sensors Actuators, B Chem.*, 2006.
- [93] X. Shuai *et al.*, "Highly Sensitive Flexible Pressure Sensor Based on Silver Nanowires-Embedded Polydimethylsiloxane Electrode with Microarray Structure," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017.
- [94] J. R. ed. Rumble, *Handbook of Chemistry and Physics 99th Edition*. 2018.
- [95] L. Xu *et al.*, "Electrochemical sensor based on a silver nanowires modified electrode for the determination of cholesterol," *Anal. Methods*, 2015.

- [96] P. Zhang *et al.*, “Silver nanowires: Synthesis technologies, growth mechanism and multifunctional applications,” *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 223, pp. 1–23, 2017.
- [97] X. Tang and M. Tsuji, “Syntheses of Silver Nanowires in Liquid Phase,” in *Nanowires Science and Technology*, 2010.
- [98] K. E. Korte, S. E. Skrabalak, and Y. Xia, “Rapid synthesis of silver nanowires through a CuCl- or CuCl₂-mediated polyol process,” *J. Mater. Chem.*, 2008.
- [99] K. K. Caswell, C. M. Bender, and C. J. Murphy, “Seedless, surfactantless wet chemical synthesis of silver nanowires,” *Nano Lett.*, 2003.
- [100] Z. Wang, J. Liu, X. Chen, J. Wan, and Y. Qian, “A simple hydrothermal route to large-scale synthesis of uniform silver nanowires,” *Chem. - A Eur. J.*, 2005.
- [101] K. Zou, X. H. Zhang, X. F. Duan, X. M. Meng, and S. K. Wu, “Seed-mediated synthesis of silver nanostructures and polymer/ silver nanocables by UV irradiation,” *J. Cryst. Growth*, 2004.
- [102] M. R. Johan *et al.*, “Synthesis and growth mechanism of silver nanowires through different mediated agents (CuCl₂ and NaCl) polyol process,” *J. Nanomater.*, 2014.
- [103] S. E. Skrabalak, B. J. Wiley, M. Kim, E. V. Formo, and Y. Xia, “On the polyol synthesis of silver nanostructures: Glycolaldehyde as a reducing agent,” *Nano Lett.*, 2008.
- [104] M. B. Gebeyehu, T. F. Chala, S. Y. Chang, C. M. Wu, and J. Y. Lee, “Synthesis and highly effective purification of silver nanowires to enhance transmittance at low sheet resistance with simple polyol and scalable selective precipitation method,” *RSC Adv.*, 2017.
- [105] S. Hemmati, M. T. Harris, and D. P. Barkey, “Polyol Silver Nanowire Synthesis and the Outlook for a Green Process,” *Journal of Nanomaterials*. 2020.
- [106] K. Sheng Lau *et al.*, “Silver nanowires as flexible transparent electrode: Role of PVP chain length,” *J. Alloys Compd.*, vol. 803, pp. 165–171, 2019.
- [107] D. R. Bagal-Kestwal, M. H. Pan, and B. H. Chiang, “Electrically nanowired-enzymes for probe modification and sensor fabrication,” *Biosensors and Bioelectronics*. 2018.
- [108] S. Subbaiyan, S. Rangarajalu, and L. Sriram, “Synthesis and characterization of silver nanowires,” in *Advanced Materials Research*, 2013.
- [109] B. Liu *et al.*, “Stable and Controllable Synthesis of Silver Nanowires for Transparent Conducting Film,” *Nanoscale Res. Lett.*, 2017.



- [110] D. Doganay, S. Coskun, C. Kaynak, and H. E. Unalan, “Electrical, mechanical and thermal properties of aligned silver nanowire/poly lactide nanocomposite films,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 99, pp. 288–296, 2016.
- [111] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, and D. Joy, “Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM),” in *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 2007.
- [112] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. M. Ritchie, J. H. J. Scott, and D. C. Joy, *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. 2017.
- [113] “Scanning Electron Microscopy. 2020 Nanoscience Instruments.” [Online]. Available: <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>. [Accessed: 25-Apr-2019].
- [114] F. N. Sima, C. Ristoscu, L. M. Duta, O. Gallet, K. Anselme, and I. N. Mihailescu, *Laser Surface Modification of Biomaterials*. 2016.
- [115] S. L. Sarkar, X. Aimin, and D. Jana, *Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology*. 2001.
- [116] P. Andrewes, “Indirect detection of lipase in UHT milk by measuring methyl ester formation,” *Int. Dairy J.*, 2018.
- [117] J. Bergström, “Experimental Characterization Techniques,” in *Mechanics of Solid Polymers*, 2015.
- [118] G. Pérez, “Espectro Electromagnético.” [Online]. Available: https://www.espectrometria.com/espectro_electromagnético. [Accessed: 26-Apr-2019].
- [119] G. Ramaiah and D. Bhatia, “Structural Analysis Of Merino Wool, Pashmina And Angora Fibers Using Analytical Instruments Like Scanning Electron Microscope And Infra-Red Spectroscopy,” *Int. J. Eng. Technol. Sci. Res.* 2394-3386, vol. 4, no. August, pp. 112–125, 2017.
- [120] A. A. Ismail, F. R. van de Voort, and J. Sedman, “Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications,” *Tech. Instrum. Anal. Chem.*, vol. 18, no. C, pp. 93–139, 1997.
- [121] B. S. Hameed, C. S. Bhatt, B. Nagaraj, and A. K. Suresh, *Chromatography as an Efficient Technique for the Separation of Diversified Nanoparticles*. Elsevier Inc., 2018.
- [122] Royal Society of Chemistry, “Spectroscopy in a Suitcase: Ultraviolet -Visible Spectroscopy (UV),” pp. 1–7, 2009.
- [123] D. Phillips, “Photophysics,” *J. Photochem.*, vol. 25, no. 1, pp. 29–32, 1984.

- [124] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. 1998.
- [125] S. Mendoza, E. Bustos, J. Manríquez, and L. A. Godínez, "Voltammetric Techniques," *Agric. Food Electroanal.*, pp. 21–48, 2015.
- [126] D. A. Skoog, "Potenciometría," in *Fundamentos de Química Analítica*, 2015.
- [127] S. Roy and S. Pandit, *Microbial Electrochemical System*. Elsevier B.V., 2019.
- [128] J. Hoyos-Arbeláez, M. Vázquez, and J. Contreras-Calderón, "Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1371–1381, 2017.
- [129] L. G. Dias, S. G. Meirinho, A. C. A. Veloso, L. R. Rodrigues, and A. M. Peres, "Electronic tongues and aptasensors," in *Bioinspired Materials for Medical Applications*, 2017.
- [130] K. Scott, "Electrochemical Principles and Characterization of Bioelectrochemical Systems," in *Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and Applications*, 2016.
- [131] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry," *J. Chem. Educ.*, 2018.
- [132] K. A. Rubinson and J. F. Rubinson, *Análisis Instrumental*. 2001.
- [133] C. G. Zoski, *Handbook of electrochemistry*. 2007.
- [134] J. M. Pingarrón and P. Sanchez Batanero, *Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones.*, Madrid, Ed. 1999.
- [135] M. J. Esplandiú, M. Pacios, L. Cyganek, J. Bartroli, and M. Del Valle, "Enhancing the electrochemical response of myoglobin with carbon nanotube electrodes," *Nanotechnology*, 2009.
- [136] D. Aşangil, I. Hüdai Taşdemir, and E. Kılıç, "Adsorptive stripping voltammetric methods for determination of aripiprazole," *J. Pharm. Anal.*, 2012.
- [137] J. Hong, Y. X. Zhao, B. L. Xiao, A. A. Moosavi-Movahedi, H. Ghourchian, and N. Sheibani, "Direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on a functionalized multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles nanocomplex-modified glassy carbon electrode," *Sensors (Switzerland)*, 2013.
- [138] P. Raghu, T. M. Reddy, P. Gopal, K. Reddaiah, and N. Y. Sreedhar, "A novel horseradish peroxidase biosensor towards the detection of dopamine: A voltammetric study," *Enzyme Microb. Technol.*, 2014.



- [139] N. Nasirizadeh, Z. Shekari, A. Nazari, and M. Tabatabaee, "Fabrication of a novel electrochemical sensor for determination of hydrogen peroxide in different fruit juice samples," *J. Food Drug Anal.*, vol. 24, no. 1, pp. 72–82, 2016.
- [140] K. Scott, *Electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems*. Elsevier Ltd., 2016.
- [141] M. D. Harris, S. Tombelli, G. Marazza, and A. P. F. Turner, *Affibodies as an alternative to antibodies in biosensors for cancer markers*. Elsevier Masson SAS., 2012.
- [142] S. Paulo, S. Carlos, and S. Paulo, *Nanostructured materials and nanoparticles for point of care (POC) medical biosensors*, vol. 7. Elsevier Ltd, 2017.
- [143] ISO 11843, "Capability of detection- Part 1: Terms and definitions," *This Br. Stand. is UK Implement. ISO 11843-12000, incorporating corrigendum Oct. 2003, which should be read conjunction with BS ISO 11843-12000.*, 2000.
- [144] L. A. Currie, "International union of pure and applied chemistry analytical chemistry division commission on analytical nomenclature*+ nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995) Prepa," *Pure & Appl. Chem*, vol. 67, no. 10, pp. 1699–1723, 1995.
- [145] L. G. Wade and J. W. Simek, *Organic Chemistry*, 9th editio. Pearson, 2016.
- [146] K. C. Huber and J. N. BeMiller, *Carbohydrates*, no. vitamin C. Elsevier Inc., 2017.
- [147] R. Jelinek and S. Kolusheva, "Carbohydrate biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 12, pp. 5987–6015, 2004.
- [148] M. Fedoroňko, "The electrochemistry of carbohydrates and their derivatives," *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, vol. 29, no. C, pp. 107–171, 1974.
- [149] S. J. Enna and D. B. Bylund, "Galactose," *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.*, pp. 1–1, 2011.
- [150] J. Ma, X. Hou, B. Zhang, Y. Wang, and L. He, "The analysis of carbohydrates in milk powder by a new 'heart-cutting' two-dimensional liquid chromatography method," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 91, pp. 24–31, 2014.
- [151] Ministerio para la Transición Ecológica, "PRTR España. Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes: Fenoles," 2017. [Online]. Available: <http://www.prtr-es.es/Fenoles,15658,11,2007.html>. [Accessed: 21-Apr-2020].
- [152] B. G. Swanson, "Tannins and Polyphenols," *Encycl. Food Sci. Nutr.*, pp. 5729–5733, 2004.

- [153] U. Imeh and S. Khokhar, "Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 22, pp. 6301–6306, 2002.
- [154] N. C. for B. I. P. D. U.S. National Library of Medicine, "Catechol (Compound)." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Catechol#section=Solubility>. [Accessed: 13-Jun-2019].
- [155] G. A. M. Mersal, "Electrochemical sensor for voltammetric determination of catechol based on screen printed graphite electrode," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 4, no. 8, pp. 1167–1177, 2009.
- [156] A. Waterhouse, "Chapter 20 - The Phenolic Wine Antioxidants," in *Handbook of Antioxidants*, 2nd Editio., L. Packer, Ed. 2001, pp. 401–416.
- [157] B. Sun, X. Jiang, S. Dai, and Z. Du, "Single-crystal silver nanowires : Preparation and Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) property," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 29, pp. 2570–2573, 2009.
- [158] Y. Kim, B. Hwang, K. Lee, and J. Kim, "Ambient-Stable and Durable Conductive Ag-Nanowire-Network 2-D Films Decorated with a Ti Layer," 2018.
- [159] K. Ni, L. Chen, and G. Lu, "Synthesis of silver nanowires with different aspect ratios as alcohol-tolerant catalysts for oxygen electroreduction," *Electrochem. commun.*, vol. 10, no. 7, pp. 1027–1030, 2008.
- [160] S. A. Kazmi, S. Hameed, and A. Azam, "Synthesis and characterization of Ag nanowires: Improved performance in dye sensitized solar cells," *Perspect. Sci.*, vol. 8, pp. 577–579, 2016.
- [161] Y. Li, S. Guo, H. Yang, Y. Chao, S. Jiang, and C. Wang, "One-step synthesis of ultra-long silver nanowires of over 100 μm and their application in flexible transparent conductive films," *RSC Adv.*, 2018.
- [162] H. Mao, J. Feng, X. Ma, C. Wu, and X. Zhao, "One-dimensional silver nanowires synthesized by self-seeding polyol process," *J. Nanoparticle Res.*, 2012.
- [163] Z. Yang, H. Qian, H. Chen, and J. N. Anker, "One-pot hydrothermal synthesis of silver nanowires via citrate reduction," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 352, no. 2, pp. 285–291, 2010.
- [164] Z. Zhang, T. Si, J. Liu, K. Han, and G. Zhou, "Controllable synthesis of AgNWs@PDA@AgNPs core-shell nanocobs based on a mussel-inspired polydopamine for highly sensitive SERS detection," *RSC Adv.*, 2018.



- [165] 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 MoS₂," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 8, 2017.
- [166] 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.
- [167] S. H. De Almeida and Y. Kawano, "Ultraviolet-visible spectra of Nafion membrane," *Eur. Polym. J.*, vol. 33, no. 8, pp. 1307–1311, 1997.
- [168] B. X. Gu, C. X. Xu, G. P. Zhu, S. Q. Liu, L. Y. Chen, and X. S. Li, "Tyrosinase immobilization on ZnO nanorods for phenol detection," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 1, pp. 377–381, 2009.
- [169] Y. Li, S. Li, and K. Zhang, "Influence of hydrophilic carbon dots on polyamide thin film nanocomposite reverse osmosis membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 537, no. May, pp. 42–53, 2017.
- [170] B. A. Aragaw, W. N. Su, J. Rick, and B. J. Hwang, "Highly efficient synthesis of reduced graphene oxide-Nafion nanocomposites with strong coupling for enhanced proton and electron conduction," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 45, pp. 23212–23221, 2013.
- [171] Z. Liang *et al.*, "FT-IR study of the microstructure of Nafion® membrane," *J. Memb. Sci.*, vol. 233, no. 1–2, pp. 39–44, 2004.
- [172] J. Li *et al.*, "Electrospun silica/nafion hybrid products: Mechanical property improvement, wettability tuning and periodic structure adjustment," *J. Mater. Chem. A*, vol. 2, no. 39, pp. 16569–16576, 2014.
- [173] J. Xie, C. Chen, Y. Zhou, J. Fei, Y. Ding, and J. Zhao, "A Galactose Oxidase Biosensor Based on Graphene Composite Film for the Determination of Galactose and Dihydroxyacetone," *Electroanalysis*, vol. 28, no. 1, pp. 183–188, 2016.
- [174] M. Arroyo, "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones," *Ars Pharm.*, vol. 39, no. 2, pp. 111–127, 1998.
- [175] J. W. Whittaker, "The radical chemistry of galactose oxidase," *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005.
- [176] Q. Lin, Q. Li, C. Batchelor-Mcauley, and R. G. Compton, "Two-electron, Two-proton oxidation of catechol: Kinetics and apparent catalysis," *J. Phys. Chem. C*, 2015.



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid